

Aus der Klinik für Neonatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Auswirkung von Wachstumsfaktoren auf das neonatale
Gehirn am Beispiel Hyperoxie- und MDMA-induzierter
Neurotoxizität**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Daniela Brait

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. U. Felderhoff-Müser
2. Prof. Dr. med. R. Trollmann
3. Priv.-Doz. Dr. Dipl. M. Keller

Datum der Promotion: 09.09.2011

INHALTSVERZEICHNIS

ABSTRACT.....	1
1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG.....	2
1.1 Hyperoxie und Erythropoietin	2
1.2 MDMA und Neurotrophine.....	3
2 MATERIAL UND METHODEN.....	4
2.1 Arbeitsmethoden	4
2.2 Schädigungsmodell Hyperoxie	5
2.3 Schädigungsmodell MDMA.....	5
3 ERGEBNISSE	6
3.1 Hyperoxie und Erythropoietin	6
3.1.1 Sifringer <i>et al.</i> 2009.....	6
3.1.2 Sifringer, Brait <i>et al.</i> 2010.....	8
3.2 MDMA und Neurotrophine.....	11
3.2.1 Dzierko, Sifringer <i>et al.</i> 2010.....	11
4 DISKUSSION	14
4.1 Hyperoxie und Erythropoietin	14
4.1.1 Sifringer <i>et al.</i> 2009.....	15
4.1.2 Sifringer, Brait <i>et al.</i> 2010.....	16
4.2 MDMA und Neurotrophine.....	18
4.2.1 Dzierko, Sifringer <i>et al.</i> 2010.....	18
5 REFERENZEN	20
ANHANG	28
Anteilerklärung	
Lebenslauf	
Publikationsliste	
Selbstständigkeitserklärung	
Danksagung	
Ausgewählte Publikationen	

Abstract

Einleitung: Trotz erheblicher Fortschritte in der medizinischen Behandlung frühgeborener Kinder gehen die sinkenden Mortalitätsraten noch immer mit einem hohen Anteil neurologischer Folgeschäden einher. Diesbezüglich konnten in der Vergangenheit diverse Schädigungsmechanismen aber auch protektive Faktoren im vulnerablen neonatalen Gehirn exploriert werden. Die nachfolgende Arbeit beschäftigt sich daher mit der weiteren Evaluation zweier relevanter neurotoxischer Faktoren, Hyperoxie und 3,4-Methylenedioxy-N-Methamphetamin (MDMA, „Ecstasy“), ihrer potentiellen Abschwächung und der dadurch vermittelten Neuroprotektion durch Wachstumsfaktoren wie Erythropoietin und Neurotrophine.

Material und Methoden: Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wurden die Auswirkungen einer 2- bis 48-stündigen Exposition 6-Tage alter Ratten gegenüber Hyperoxie (80% Sauerstoff) in Verbindung mit der Applikation von 20.000 IE/kg Körpergewicht rekombinantem Erythropoietin (rEPO) evaluiert. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung der Auswirkungen von 20, 40 und 60 mg/kg Körpergewicht MDMA auf das unreife Gehirn 6-, 14- und 21-Tage alter Ratten und 6-Tage alter CD1/BDNF Knockout Mäuse. Die Untersuchung der neuronalen Veränderungen erfolgte anhand diverser molekularbiologischer und histologischer Arbeitsmethoden.

Ergebnisse: Die durch Hyperoxie ausgelösten Schädigungsmechanismen im unreifen Gehirn beinhalteten die Induktion neuroinflammatorischer Prozesse, die Erzeugung von oxidativem Stress und die Veränderung der Regulation körpereigener antioxidativer Systeme. Durch Applikation des Wachstumsfaktors Erythropoietin konnten sämtliche Hyperoxie-bedingten Störungen signifikant beeinflusst und vermindert werden. Die Gabe von MDMA führte im neonatalen Gehirn zu einer breiten kortikalen Neurodegeneration, welche mit einem Anstieg der Neurotrophine Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) und Neurotrophin-3 (NT-3) vergesellschaftet war. Die Exploration 6-Tage alter CD1/BDNF Knockout Mäuse ergab im Gegensatz zu den Kontrolltieren eine erhöhte Sensitivität gegenüber MDMA.

Diskussion: Die vorgestellten Ergebnisse lassen vermuten, dass rekombinantes Erythropoietin seinen neuroprotektiven Effekt durch eine Reduktion von proinflammatorischen Prozessen und oxidativem Stress, sowie der Reduktion der stressinduzierten Veränderung antioxidativer Systeme vermittelt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Neurotrophine BDNF und NT-3 vermutlich wichtige kompensatorische Mechanismen bezüglich des Überlebens neuro-

naler Zellen im Rahmen der MDMA-induzierten Neurodegeneration im neonatalen Gehirn von Ratte und Maus darstellen.

1 Einleitung und Zielstellung

1.1 Hyperoxie und Erythropoietin

Fortschritte in der medizinischen neonatologischen Versorgung und Therapie haben das Behandlungsergebnis und das Überleben frühgeborener Kinder in den letzten Jahren verbessert. Bedauerlicherweise konnte jedoch die neurologische Morbidität im Gegensatz zur Mortalität nicht in gleichem Ausmaß vermindert werden (1-3). Diese tritt noch immer bei einem großen Anteil der insbesondere kleinen Frühgeborenen auf und betrifft sowohl motorische als auch kognitive Funktionsbereiche (4-5). Untersucht man unreif geborene Kinder im Alter von 2 Jahren, leiden bis zu 14,6% unter einer milden und bis zu 7% unter einer moderaten bis schweren Beeinträchtigung der neurologischen Entwicklung (6). Um Gründe für die mit der Frühgeburtlichkeit assoziierten Einschränkungen zu evaluieren, wurden in der Vergangenheit eine Reihe klinischer und experimenteller Studien durchgeführt, welche diverse Risikofaktoren für die Hirnschädigung identifizieren konnten (1-10).

Der schädigende Effekt unphysiologisch hoher Sauerstoffkonzentrationen der Atemluft auf das sich entwickelnde Gehirn der unreifen Ratte wurde kürzlich nachgewiesen (10). Sauerstoffbedingte Toxizität verursacht Zelltod und ist mit oxidativem Stress, verminderter Expression von Neurotrophen, einem Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen und Veränderungen von Proteinen, welche in die Prozesse von Zellwachstum und Zellerhaltung, neuronaler Aussprossung und synaptischer Aktivität eingebunden sind, vergesellschaftet (11-13). Intrauterin beträgt der Sauerstoffpartialdruck beim Feten etwa 25-30 mmHg, postpartal steigt er durch das Einsetzen der Atmung auf etwa 90 mmHg an. Dies belegt, dass ein Sauerstoffgehalt von 21% in normaler Atemluft für das frühgeborene Kind im Vergleich zu intrauterinen Verhältnissen unphysiologisch hoch ist. Zusätzlich findet Sauerstoff als wichtiges Medikament in der Reanimation und Behandlung frühgeborener Kinder regelmäßige Anwendung, wodurch sich die pathologische Situation für das Neugeborene intensiviert. Daher wird Sauerstoff heutzutage in der Therapie neonatologischer Patienten zunehmend zurückhaltender und differenzierter eingesetzt (14-15). Da die Anwendung nicht vollkommen vermieden oder durch alternative Behandlungsstrategien ersetzt werden kann, ist es von Bedeutung, die durch Sau-

erstoff verursachte neuronale Schädigung weiter zu explorieren und neuroprotektive Strategien zu evaluieren.

Es ist bekannt, dass Wachstumsfaktoren schützend in Mechanismen der Nervenschädigung eingreifen können. Erythropoietin ist ein essentieller Wachstums- und Überlebensfaktor für erythroide Vorläuferzellen, welcher schon seit langer Zeit in der Therapie der Anämie bei frühgeborenen Kindern angewandt wird und dessen Verträglichkeit somit klinisch erprobt ist. Seine potentielle Bedeutung für das unreife Gehirn ergibt sich aus diversen experimentellen Studien, in denen mittlerweile seine Fähigkeit zur Neuroprotektion nachgewiesen und für das unreife Gehirn bestätigt werden konnte (16-23). Die Mechanismen, über die Erythropoietin seine neuroprotektiven Eigenschaften initiiert sind jedoch noch unzureichend verstanden und sollten durch die vorliegende Arbeit näher beleuchtet werden. Hierzu erfolgte die Untersuchung einiger körpereigener Systeme, deren Bedeutung in der jeweiligen Publikation eingehend beschrieben ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Determinierung des Wirkmechanismus von Erythropoietin bei der Protektion vor Hyperoxie-induzierten Hirnschädigungen im unreifen Gehirn der Ratte. Hierfür wurden die Rolle von proinflammatorischen Systemen, wie den Zytokinen Interleukin (IL)-1 β und IL-18 und den Matrix Metalloproteinasen (MMP)-2 und MMP-9 im Schädigungsmodell der Hyperoxie, sowie der Effekt von zusätzlich appliziertem Erythropoietin auf ihre Regulation, Aktivierung und Expression evaluiert. Des Weiteren erfolgte die Untersuchung der Lipidperoxidation und des Glutathion-Systems nach Hyperoxie-Exposition als Marker für oxidativen Stress und ihre Veränderungen durch gleichzeitige Erythropoietin-Gabe. Das Verhalten von antioxidativen Faktoren, wie der Hämoxigenase-1 und der Acetylcholinesterase, sowie deren Regulation in Kombination mit Erythropoietin wurden ebenfalls überprüft.

1.2 MDMA und Neurotrophine

3,4-Methylenedioxy-N-Methamphetamin (MDMA) ist eine auch als Ecstasy bekannte Droge aus der Gruppe der Amphetamine, welche von Jugendlichen und jungen Erwachsenen mit einer Prävalenz von 4-12% verwendet wird (24). Die antenatale Applikation von MDMA bei trächtigen Ratten führt zu relevanten intrauterinen Amphetamin-Konzentrationen und kann somit die Entwicklung der Nachkommen beeinflussen. MDMA diffundiert in das Fruchtwasser und die beim Muttertier gemessenen Spiegel entsprechen den Konzentrationen im fetalen

Gehirn (25). Beim Menschen resultiert daraus nachweislich ein erhöhtes Risiko für kongenitale kardiovaskuläre und muskuloskeletale Anomalien, kleinere Hirnvolumina und kognitive Defizite und Veränderungen in der Myelinisierung (26-28). Trotz hoher Prävalenzen der perinatalen Einnahme von MDMA und den damit möglicherweise verbundenen Folgen in Bezug auf die Entwicklung der ungeborenen Kinder sind die Kenntnisse über die Konsequenzen noch limitiert (29-30). Eine weitere Exploration ist daher wünschenswert.

Neurotrophine, wie beispielsweise der Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3) und der Nerve Growth Factor (NGF), sind Proteine, welche für neuronale Verbindungen von Bedeutung sind. Sie reagieren auf Schädigungen im sich entwickelnden zentralen Nervensystem und initiieren einen neuroprotektiven Effekt (10, 31-34). Des Weiteren spielt BDNF bei der Funktion und dem Fortbestand der Serotonin-Rezeptoren (5-HT) eine wesentliche Rolle (35-37).

Da Neurotrophine vermutlich auch einen neuroprotektiven Effekt im durch MDMA ausgelösten Schädigungsmodell der neonatalen Ratte initiieren, bestand ein weiteres Ziel der durchgeführten Untersuchungen in der Determinierung der Effekte von MDMA auf das sich entwickelnde Gehirn der Ratte und der Veränderungen in der Regulation und Expression der Neurotrophine BDNF, NT-3 und NGF. Zur eingehenden Evaluierung von BDNF wurde zusätzlich die Auswirkung von MDMA auf das unreife Gehirn BDNF-defizienter Mäuse ermittelt.

2 Material und Methoden

2.1 Arbeitsmethoden

Für die experimentelle Bearbeitung der verschiedenen Fragestellungen wurden diverse molekularbiologische (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR), *realtime* PCR, Western Blot, Gelatin-Zymographie, Chromatographie, Spektrophotometrie, Fluoreszenzspektroskopie) und histologische (DeOlmos Kupfersilberfärbung, *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling* (TUNEL)-Färbung, Fluoro-Jade B-Färbung) Arbeitsmethoden verwendet. Die relevanten Protokolle und die statistischen

Testmethoden werden in den einzelnen Veröffentlichungen detailliert beschrieben. $P < 0,05$ wurde jeweils als statistisch signifikant akzeptiert.

2.2 Schädigungsmodell Hyperoxie

Für die Erhebung der Hyperoxie-induzierten zerebralen Veränderungen sowie deren Protektion durch rekombinantes Erythropoietin (rEPO) wurden 6 Tage alte Han Wistar Rattenjunge wurfübergreifend randomisiert, in vier verschiedene, geschlechtsgleiche Versuchsgruppen eingeteilt und wie nachfolgend beschrieben behandelt:

(1) Normoxie (21% Sauerstoff) und intraperitoneale Injektion von 0,9%iger Natriumchlorid (NaCl)-Lösung, (2) Normoxie und intraperitoneale Injektion von 20.000 IE/kg rEPO, (3) Hyperoxie (80% Sauerstoff) und intraperitoneale Injektion von 0,9%iger NaCl-Lösung, (4) Hyperoxie und intraperitoneale Injektion von 20.000 IE/kg rEPO.

Vor Beginn der Norm- bzw. Hyperoxie erhielten die Tiere die bekannte protektive intraperitoneale Injektion von 20.000 IE/kg rEPO oder äquivalente Mengen isotoner Kochsalzlösung (23). Danach wurden sie für verschiedene Zeitspannen (0, 2, 6, 12, 24 oder 48 Stunden) einer definierten und kontrollierten Umgebung mit einer Sauerstoffkonzentration von 21% oder 80% ausgesetzt. Nach Beendigung des Versuchs erfolgte die Dekapitation der Tiere mit anschließender Präparation der Gehirne.

Eine ausführlichere Beschreibung der durchgeführten Tierversuche und Bedingungen findet sich in den Publikationen.

2.3 Schädigungsmodell MDMA

Die Erhebung der zerebralen Veränderungen nach MDMA-assoziiierter Hirnschädigung erfolgten auf der Grundlage von Tierversuchen mit Han Wistar Ratten und CD1/BDNF heterozygoten (+/-) und Wildtyp (+/+) Mäusen.

Männliche Han Wistar Rattenjunge wurden wurfübergreifend in verschiedene Versuchsgruppen eingeteilt. Die MDMA-exponierten Tiere erhielten im Alter von 6, 13 oder 20 Lebenstagen eine intraperitoneale Injektion mit 20, 40 oder 60 mg/kg Körpergewicht MDMA oder im Alter von 6 Tagen im 8-stündlichen Rhythmus drei intraperitoneale Injektionen mit 20 mg/kg Körpergewicht MDMA. Der Kontrollgruppe wurde eine adäquate Menge isotoner Kochsalzlösung appliziert. 6-Tage alte CD1/BDNF heterozygote (+/-) und Wildtyp (+/+) Mäuse erhielten eine intraperitoneale Einzeldosis von 60 mg/kg Körpergewicht MDMA oder ebenfalls

adäquate Mengen isotoner Kochsalzlösung. Die Gewichtsentwicklung der Tiere wurde an Tag 3, 7, 14 und 21 dokumentiert.

Für die zerebralen histologischen Untersuchungen erhielten die Ratten und Mäuse 24 Stunden nach der ersten MDMA- oder Kochsalz-Injektion eine letale Dosis Chloralhydrat und wurden umgehend transkardial mit heparinisiertem 0,1 molarem PBS und 4%igem Paraformaldehyd in Cacodylatpuffer perfundiert. Für die zerebralen molekulargenetischen Untersuchungen erfolgte die Dekapitation der Ratten zu definierten Zeitpunkten (2, 6, 12 oder 24 Stunden) nach 20 oder 60 mg/kg Körpergewicht MDMA- oder Kochsalzlösungs-Injektion. Alle Gehirne wurden nach Abschluss der Behandlungen je nach weiterführender Untersuchungsmethode präpariert.

Auch hier wird für eine ausführlichere Beschreibung des erfolgten Tierversuchs auf die zugrunde liegende Publikation verwiesen.

3 Ergebnisse

3.1 Hyperoxie und Erythropoietin

3.1.1 Sifringer *et al.* 2009

Erythropoietin inhibiert die Hyperoxie-induzierte Produktion der Interleukine IL-1 β und IL-18 und die Induktion der Matrix Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 im unreifen Gehirn der Ratte.

Abbildung 1: Die Hyperoxie-bedingte Produktion proinflammatorischer Zytokine im sich entwickelnden Gehirn der Ratte wird durch Erythropoietin signifikant vermindert.

Die Auswertung des mRNA-Niveaus von IL-1 β und IL-18 zeigte nach 2- bis 12-stündiger Hyperoxie-Exposition verglichen mit Normoxie signifikant erhöhte Werte. Die mittels Western Blot untersuchte Veränderung der Proteinkonzentration der beiden Interleukine ergab im Gegensatz zur Normoxie einen signifikanten Anstieg nach 12- bis 48-stündiger Hyperoxie-Exposition. Durch die Gabe von rekombinantem Erythropoietin wurde die inflammatorische Reaktion in Form des Interleukin-Anstiegs sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene signifikant reduziert.

Die Ergebnisse der Western Blot Quantifizierung (A-B) sowie eine Western Blot Serie (C) sind repräsentativ abgebildet. Eine ausführlichere Beschreibung der Ergebnisse und Abbildungen der mRNA-Expression finden sich in der zugehörigen Publikation.

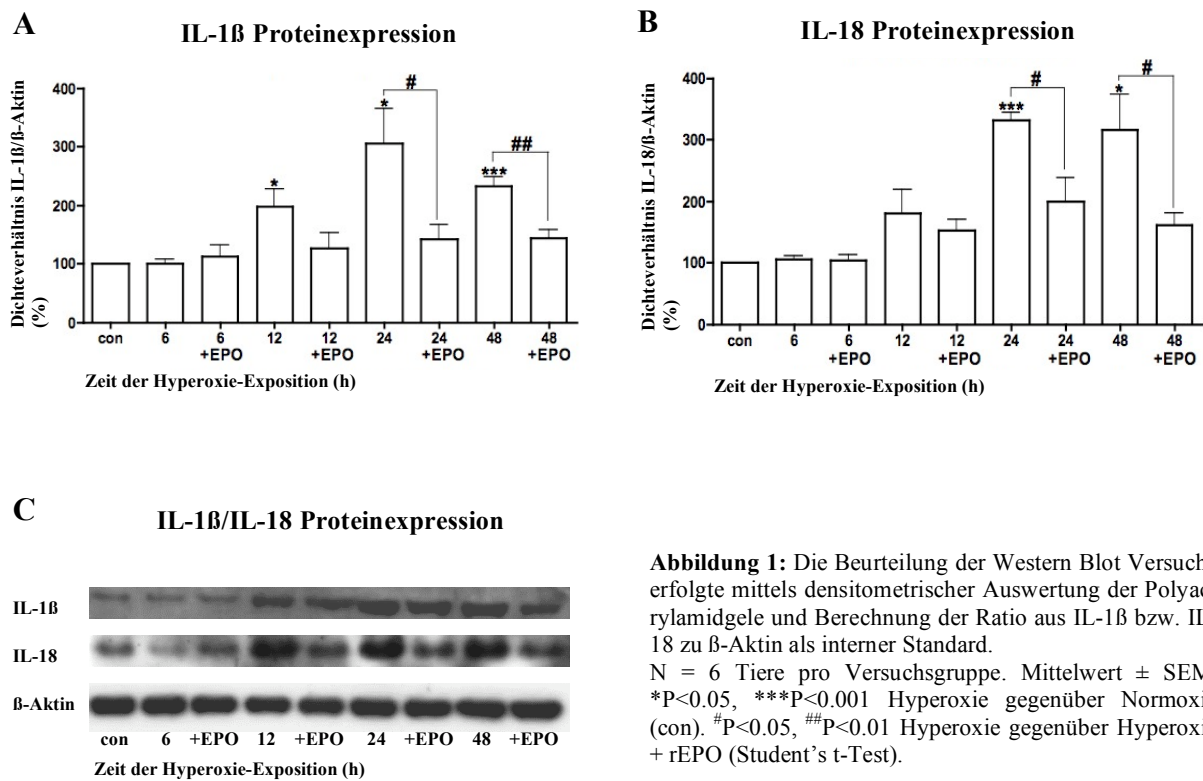
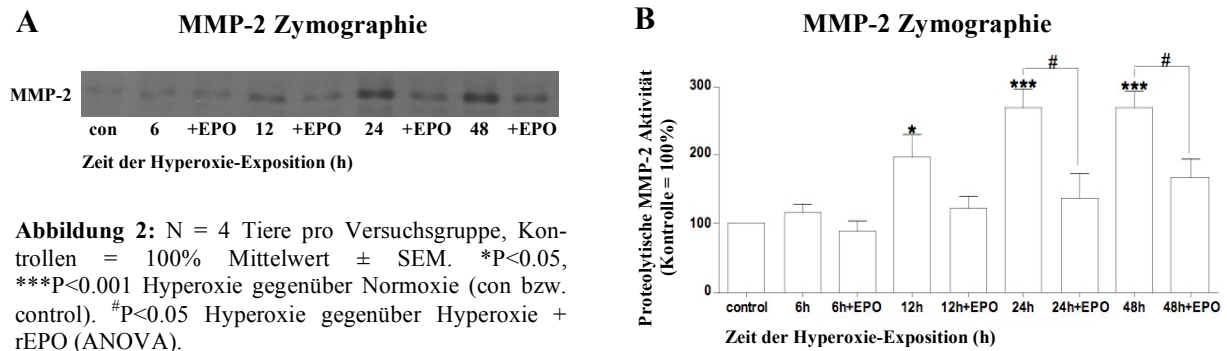


Abbildung 1: Die Beurteilung der Western Blot Versuche erfolgte mittels densitometrischer Auswertung der Polyacrylamidgele und Berechnung der Ratio aus IL-1 β bzw. IL-18 zu β -Aktin als interner Standard. N = 6 Tiere pro Versuchsgruppe. Mittelwert \pm SEM. *P<0.05, ***P<0.001 Hyperoxie gegenüber Normoxie (con). #P<0.05, ##P<0.01 Hyperoxie gegenüber Hyperoxie + rEPO (Student's t-Test).

Abbildung 2: Erythropoietin vermindert die Hyperoxie-bedingte Induktion von Matrix Metalloproteinasen im neonatalen Hirn der Ratte.

Die Exploration der Enzymaktivität von MMP-2 erfolgte mittels Zymographie. Hier zeigte sich nach Hyperoxie im Gegensatz zur Normoxie ein deutlicher Anstieg der MMP-2-Aktivität nach 12- bis 48-stündiger Exposition bei 80% Sauerstoff. Aufgrund der geringen Mengen an aktiver MMP-9 in Proben aus kompletten Gehirnhälften konnte eine Untersuchung mittels Zymographie nicht erfolgen. Das Niveau an aktiver MMP-9 wurde daher mittels Western Blot evaluiert. Dabei fanden sich erhöhte Werte nach 24- bis 48-stündiger Hyperoxie-Exposition. Die zusätzliche Gabe von rEPO verminderte die Konzentrationen der beiden untersuchten Matrix Metalloproteinasen signifikant.

Repräsentativ ist das Beispiel einer Zymographie (A) sowie das Ergebnis der densitometrischen Quantifizierung von MMP-2 dargestellt (B). Detaillierte Informationen sowie die Darstellung der MMP-9-Expression finden sich in der zugrunde liegenden Publikation.



3.1.2 Sifringer, Brait *et al.* 2010

Erythropoietin beeinflusst die durch Hyperoxie veränderten Gehalte an reduziertem und oxidiertem Glutathion, reduziert die Hyperoxie-bedingte Induktion der Lipidperoxidation, induziert den Anstieg der Hämoxxygenase-1-Konzentration und reduziert den Hyperoxie-induzierten Anstieg von synaptischer Acetylcholinesterase im unreifen Gehirn der Ratte.

Abbildung 3: Erythropoietin modifiziert die Hyperoxie-induzierte Veränderung von reduziertem (GSH) und oxidiertem (GSSG) Glutathion und der Lipidperoxidation im sich entwickelnden Gehirn der Ratte.

Reduziertes (GSH) und oxidiertes (GSSG) Glutathion wurden durch Reaktion mit DTNB und spektrophotometrischer Messung bei 412 nm evaluiert. GSH wurde durch 12- bis 48-stündige Hyperoxie im Gegensatz zur Normoxie vermindert, während GSSG im Sinne einer Oxidierung anstieg. Die zusätzliche Gabe von rEPO normalisierte die GSH- und GSSG-Werte signifikant.

Das Ausmaß der Lipidperoxidation wurde durch Messung des Endabbauprodukts Malondialdehyd (MDA) erfasst. Die 24- bis 48-stündige Exposition gegenüber Hyperoxie führte im Gegensatz zur Normoxie zu einem signifikanten Anstieg des MDA-Niveaus, welches durch die zusätzliche Applikation von rEPO signifikant reduziert werden konnte.

Die Auswertung der spektrophotometrischen Messung von GSSG (**A**) sowie der spektroskopischen Messung von MDA (**B**) sind repräsentativ abgebildet. Die Auswertung der GSH-Level findet sich in der Publikation.

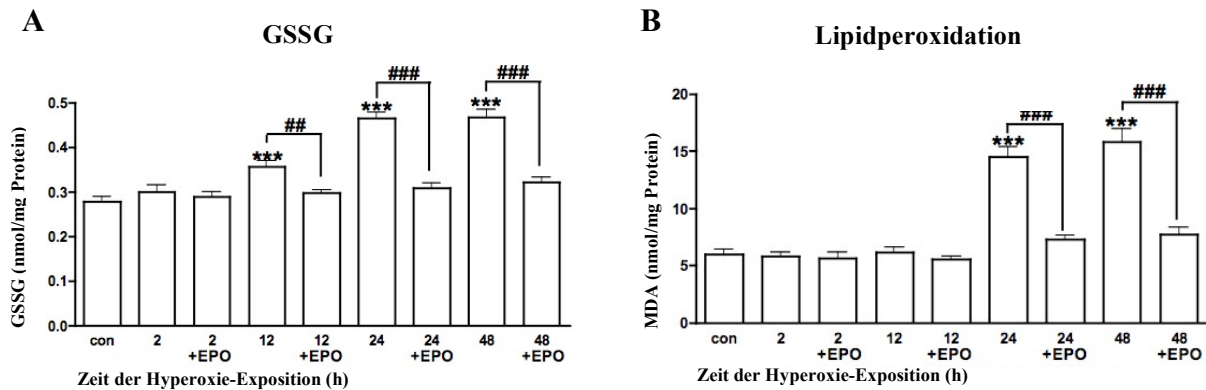


Abbildung 3: N = 6 Tiere pro Versuchsgruppe. Mittelwert \pm SEM. ***P<0.001 Hyperoxie gegenüber Normoxie (con). ###P<0.001 Hyperoxie gegenüber Hyperoxie + rEPO (Student's t-Test, ANOVA).

Abbildung 4: Erythropoietin induziert erhöhte Konzentrationen an Hämoxxygenase-1 (HO-1) im sich entwickelnden Gehirn der Ratte.

Die Konzentrationsänderungen an Hämoxxygenase-1 (HO-1) wurden mittels realtime PCR und Western Blot auf mRNA- und Proteinebene bestimmt. Außerdem wurde die HO-1-Aktivität gaschromatographisch ermittelt. Die alleinige Exposition gegenüber Hyperoxie führte hierbei nicht zu einem Anstieg. Bei den Tieren, die zusätzlich zur Hyperoxie-Exposition rEPO erhielten, konnten dagegen erhöhte Gehalte an HO-1 nachgewiesen werden. Ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression wurde nach 2- bis 48-stündiger Hyperoxie mit kombinierter rEPO-Applikation beobachtet, die Protein- und Aktivitätsniveaus stiegen in ebenfalls signifikantem Ausmaß nach 12- bis 48-stündiger Hyperoxie in Kombination mit rEPO an.

Die Ergebnisse der HO-1 Aktivität (**A**), die densitometrischen Western Blot Quantifizierung (**B**) und eine repräsentative Western Blot Serie (**C**) sind graphisch dargestellt. Die Darstellung der mRNA-Expression findet sich in der zugehörigen Publikation.

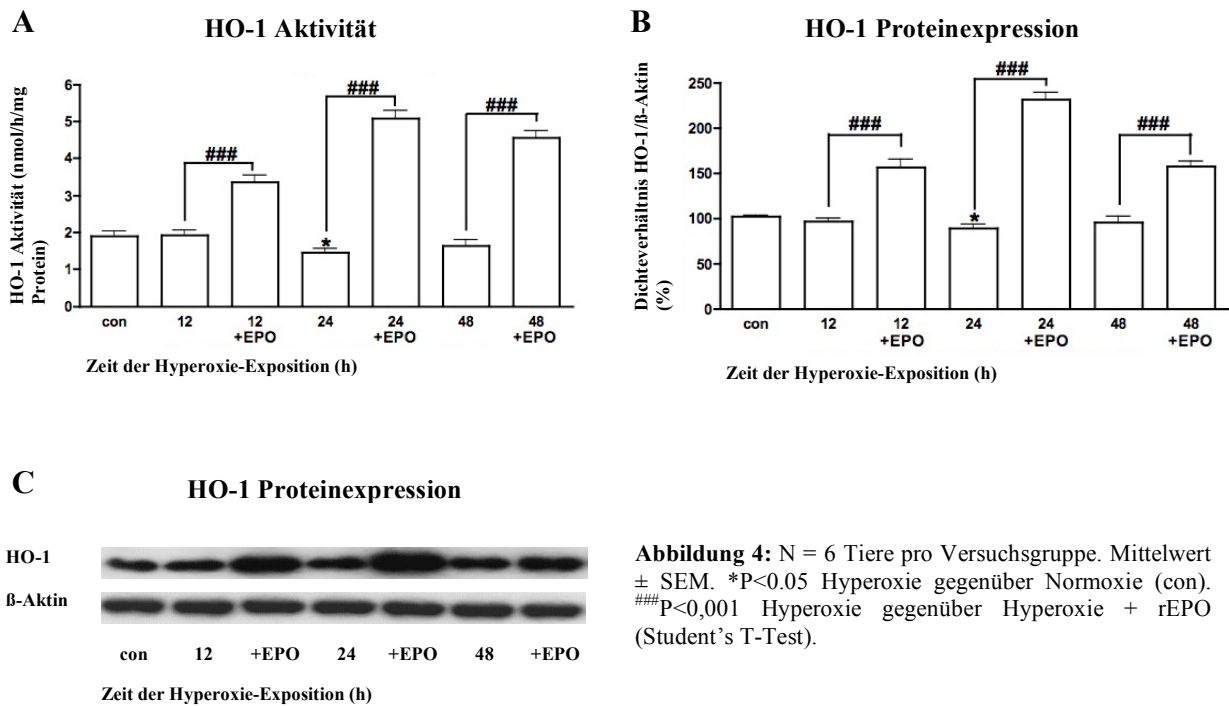


Abbildung 4: N = 6 Tiere pro Versuchsgruppe. Mittelwert ± SEM. *P<0.05 Hyperoxie gegenüber Normoxie (con). ###P<0,001 Hyperoxie gegenüber Hyperoxie + rEPO (Student's T-Test).

Abbildung 5: Erythropoietin reduziert die Hyperoxie-bedingte Akkumulation synaptischer Acetylcholinesterase-S (AChE-S) im neonatalen Hirn der Ratte.

Die Expressionsniveaus der beiden untersuchten Acetylcholinesterase-Spleißvarianten AChE-S und AChE-R wurden mittels realtime PCR untersucht. Durch Exposition gegenüber Hyperoxie nahm die Expression von AChE-S deutlich zu und erreichte nach 24-stündiger Hyperoxie signifikant erhöhte Werte. Bei Tieren, die gleichzeitig mit rEPO behandelt wurden, veränderte sich die AChE-S mRNA-Expression nicht. Die mRNA-Expression von AChE-R wurde durch Hyperoxie und rEPO nicht beeinflusst.

Die Ergebnisse der realtime PCR sind graphisch dargestellt (A).

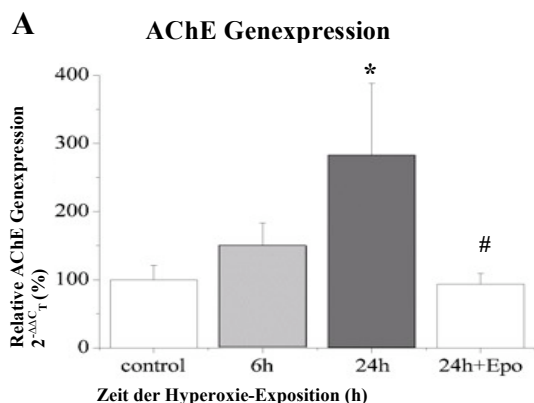


Abbildung 5: N = 6 Tiere pro Versuchsgruppe. Mittelwert ± SEM. *P<0.05 Hyperoxie gegenüber Normoxie (control). #P<0.05 Hyperoxie gegenüber Hyperoxie + rEPO (Student's t-Test).

3.2 MDMA und Neurotrophine

3.2.1 Dzierko, Sifringer *et al.* 2010

MDMA induziert physische und neurodegenerative Veränderungen und führt zu einem Anstieg von Neurotrophinen im unreifen Gehirn der Ratte.

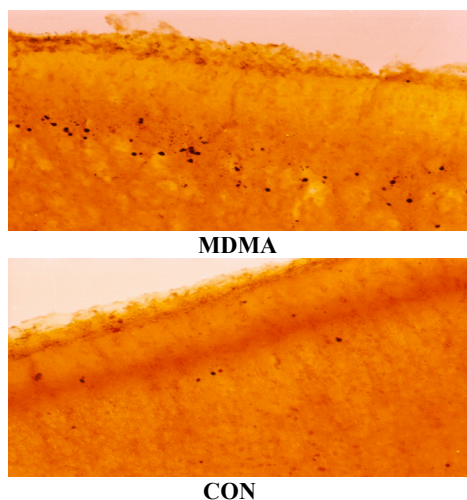
Kurz nach der Injektion der MDMA-Einzeldosen konnte man bei den 6-Tage alten Tieren eine bis zu 6 Stunden anhaltende Aktivitätssteigerung erkennen. Sie zeigten stereotypisches Verhalten wie beispielsweise Kopfwagen, niedrige Körperhaltung oder verstärkte Bewegung der Extremitäten. Ältere Tiere zeigten zusätzlich eine erhöhte horizontale Motoraktivität. Bei den mit 40 oder 60 mg/kg Körpergewicht MDMA behandelten Tieren konnte außerdem eine signifikant reduzierte Gewichtszunahme gegenüber den Kontrolltieren verzeichnet werden. Die Körpertemperatur blieb bei allen Tieren stabil.

Abbildung 6: MDMA induziert dosis- und altersabhängige neurodegenerative Veränderungen in diversen Hirnregionen neonataler Ratten.

Die neuronale Degeneration nach Applikation der verschiedenen MDMA-Konzentrationen erfolgte mittels mikroskopischer Untersuchung von gefärbten (Fluoro-Jade B-, TUNEL-, DeOlmos Kupfersilberfärbung) Hirnschnitten. Die Behandlung mit einmalig 60 bzw. dreimalig 20 mg/kg Körpergewicht MDMA führte gegenüber den Kontrolltieren zu einer signifikanten, breiten Neurodegeneration im Gehirn der untersuchten Ratten. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung einer Abhängigkeit der neuronalen Apoptose vom Alter der Tiere. Diese ergab, dass der neurodegenerative Effekt nur bei den unreiferen, 7-Tage alten Ratten nachweisbar war.

Eine repräsentative DeOlmos Kupfersilberfärbung des parietalen Kortex (**A**) und die Berechnung der Altersabhängigkeit der MDMA-bedingten Neurodegeneration (**B**) sind abgebildet. Ausführliche Beschreibungen der Ergebnisse, Abbildungen der weiteren durchgeführten Färbungen sowie die Auswertung der Apoptoseabhängigkeit von unterschiedlichen MDMA-Dosen sind der angehängten Publikation zu entnehmen.

A DeOlmos Kupfersilberfärbung



Hirnschnitt einer 7-Tage alten Ratte nach Applikation von 60 mg/kg Körpergewicht MDMA. Schnittdicke 70µm, Vergrößerung x200.

B Apoptose nach Alter

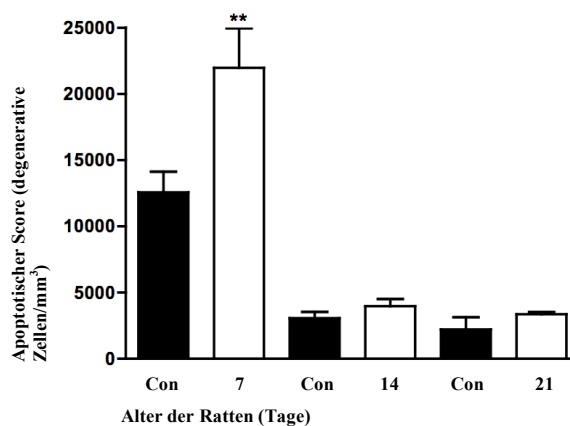
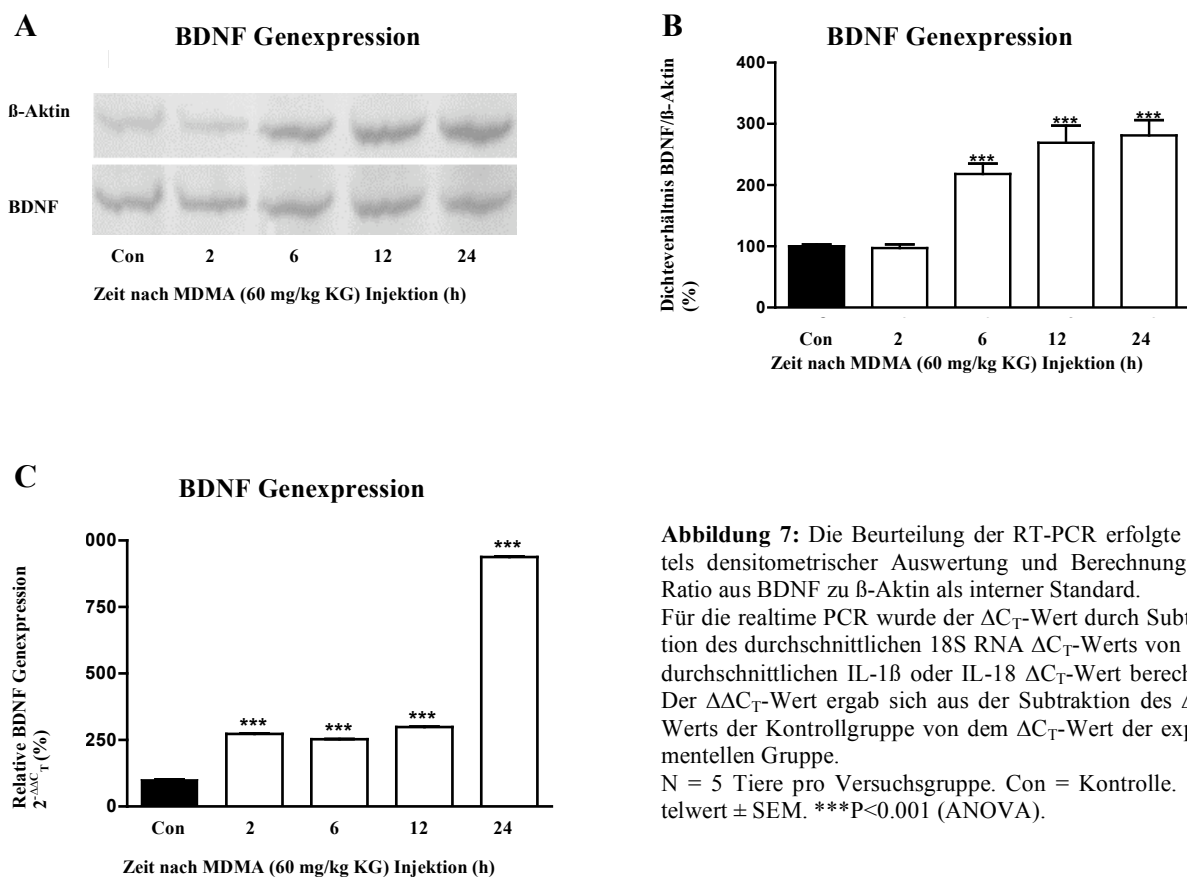


Abbildung 6: Mittels DeOlmos Kupfersilberfärbung wurde nach Applikation von 60 mg/kg Körpergewicht MDMA bei unterschiedlichen Altersstufen der Tiere der Zelluntergang in diversen Hirnregionen quantitativ erfasst. Die Werte wurden zur Berechnung eines Gesamtergebnisses addiert und der Mittelwert für jede der Behandlungen kalkuliert. N = 7-14 Tiere pro Versuchsgruppe. Con = Kontrolltiere ohne MDMA. Mittelwert ± SEM. **P<0.01 (ANOVA).

Abbildung 7: MDMA erhöht die Protein- und Genexpression von BDNF und NT-3 im retrosplenialen Kortex der neonatalen Ratte.

Um die Pathogenese der MDMA induzierten Apoptose weiter zu explorieren, wurden die Auswirkungen der MDMA-Applikation auf Wachstumsfaktoren wie BDNF, NT-3 und NGF im retrosplenialen Kortex 7-Tage alter Tiere mittels realtime PCR und Western Blot untersucht. Das mRNA-Niveau von BDNF stieg nach Gabe von 20 mg/kg und 60 mg/kg Körpergewicht MDMA an und war jeweils nach 6 bis 24 Stunden signifikant erhöht. Auch auf Proteinebene war im Western Blot nach 12 bis 24 Stunden eine signifikant erhöhte Konzentration von BDNF messbar. Die Messungen der mRNA-Konzentrationen von NT-3 ergaben ebenfalls signifikant erhöhte Werte nach 6 bis 24 Stunden. Auf NGF hatte die Applikation von MDMA hingegen keinen nachweisbaren Effekt.

Eine repräsentative PCR Serie nach 60 mg/kg Körpergewicht MDMA (A), die zugehörige densitometrische Quantifizierung der RT-PCR (B) und eine zusätzlich durchgeführte realtime PCR (C) werden gezeigt. Für weitere Abbildungen wird auf die zugrunde liegende Publikation verwiesen.



Erhöhte Neurodegeneration nach MDMA-Gabe bei CD1/BDNF Knockout Mäusen.

Abbildung 8: 7-Tage alte CD1/BDNF knockout Mäuse reagieren wesentlich sensibler auf die Applikation von MDMA als Wildtyp Kontrolltiere.

Um die Rolle von BDNF im MDMA-induzierten Schädigungsmodell weiter zu evaluieren, erfolgte die Applikation von 60 mg/kg Körpergewicht MDMA bei 6-Tage alten Wildtyp (+/+) und heterozygoten (+/-) Knockout Mäusen. Die Gehirne wurden 24 Stunden später mittels Fluoro-Jade B-Färbung untersucht. MDMA führte auch hier zu neuronalem Zelltod. Die BDNF Knockout-Tiere reagierten dabei deutlich sensibler gegenüber der MDMA-Applikation als die Wildtyp-Kontrolltiere. Im Gehirn der Knockout-Tiere konnte durch die Fluoro-Jade B-Färbung eine signifikant erhöhte Anzahl an degenerierten Zellen nachgewiesen werden.

Die Quantifizierung des durch Fluoro-Jade B-Färbung ermittelten apoptotischen Gesamtscores in den untersuchten Hirnregionen ist abgebildet (A).

A Apoptose bei CD1/BDNF knockout Mäusen

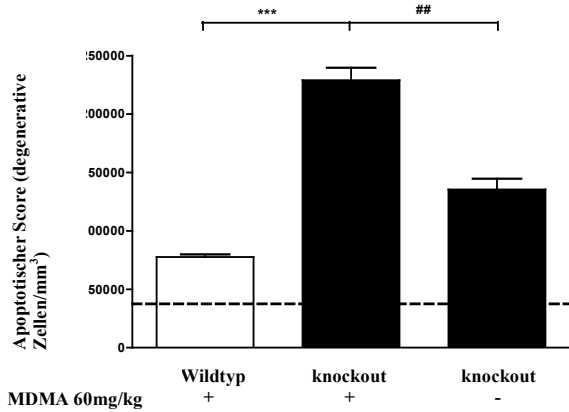


Abbildung 8: N = 5-9 Tiere pro Versuchsgruppe. Mittelwert \pm SEM. Die gestrichelte Linie zeigt den Wildtyp ohne MDMA-Applikation. ***P<0.001 Wildtyp gegenüber CD1/BDNF knockout + MDMA; ##P<0.01 CD1/BDNF knockout gegenüber CD1/BDNF knockout + MDMA (Student's t-Test).

4 Diskussion

4.1 Hyperoxie und Erythropoietin

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die systemische Therapie mit rekombinantem Erythropoietin (rEPO) bei neonatalen Ratten eine neuroprotektive Wirkung gegenüber der Hyperoxie-induzierten Neuroinflammation und dem durch die Sauerstoffexposition erhöhten oxidativen Stress ausübt.

Die Exposition neonataler Ratten gegenüber Hyperoxie führt zu neuronalem und oligodendrozytärem Zelltod, welcher mit oxidativem und nitrativem Stress, einer Beeinträchtigung der Signalkaskaden von Neurotrophinen und einem Anstieg proinflammatorischer Zytokine vergesellschaftet ist (11, 38). Die intraperitoneale Applikation von 10.000 oder 20.000 IE/kg Körpergewicht rEPO kann die beschriebenen pathologischen Veränderungen signifikant beeinflussen und wirkt somit neuroprotektiv (23). Der schützende Effekt von Erythropoietin im neuronalen System wurde in der Vergangenheit in diversen experimentellen Rattenmodellen der Hypoxie, hypoxischen Ischämie, Exzitotoxizität und des neonatalen zerebralen Insults nachgewiesen (20). Auch das neurologische Langzeitergebnis nach experimenteller hypoxischer Ischämie bzw. neonatalem zerebralem Insult wird durch rEPO signifikant verbessert (39). Potentielle Effekte von rEPO beinhalten eine Induktion antiapoptotischer Signalwege

und eine Reduktion von Exzitotoxizität (40-42). Bei diversen *in vivo* Modellen des reifen Gehirns zur Untersuchung von ZNS-Erkrankungen, bei denen Erythropoietin eine protektive Wirkung hat, sind zudem inflammatorische Komponenten mit Zytokin-Induktion und einer Leukozyten- und glialen Zellproliferation wichtige Komponenten der Pathogenese (43).

4.1.1 Sifringer *et al.* 2009

Auswirkung von Erythropoietin auf Hyperoxie-bedingte inflammatorische Veränderungen.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass der durch Hyperoxie hervorgerufene, apoptotische Zelluntergang im juvenilen Gehirn der Ratte mit einer erhöhten Synthese der inflammatorischen Matrix Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 und der Zytokine Interleukin (IL)-1 β und IL-18 vergesellschaftet ist. In Verbindung mit einer neuroprotektiven Dosis von 20.000 IE/kg Körpergewicht rEPO normalisieren sich die Konzentrationen auf das basale Niveau. Eine eingehende Beschreibung der genannten Zytokine findet sich in der zugrunde liegenden Publikation.

Diese Ergebnisse legen Mechanismen nahe, über die rEPO seine neuroprotektive Wirkung entfaltet. rEPO wirkt im Modell der hypoxischen Ischämie im unreifen Gehirn neuroprotektiv in Verbindung mit der Prävention des sekundären Anstiegs des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β und der verminderten Leukozyteninvasion im Infarktareal (44). Ob Erythropoietin einen direkten Effekt auf IL-1 β hat bleibt dabei unklar. Es wird diskutiert, ob rEPO möglicherweise die ischämisch-induzierte Inflammation eher durch eine andersweitige Reduktion des neuronalen Zelltods vermindert, als durch einen direkten Effekt auf proinflammatorische Zytokine (45). In einem neueren Modell der oxidativen Hirnschädigung verringert rEPO das Ausmaß der Degeneration bis zu einer Woche nach dem Insult. Dieser protektive Effekt ist mit einer akuten verstärkten Expression von Caspase-1, Caspase-4, Caspase-6 und p53 assoziiert. Des Weiteren schwächt rEPO den Insult-induzierten Anstieg von IL-1 α und IL-6 ab und erhöht das antiinflammatorisch wirkende IL-10 (22). In einem Modell einer neonatalen Lipopolysaccharid-induzierten Schädigung der weißen Substanz bei Ratten verringerte rEPO die Veränderung der Myelinisierung im neonatalen Rattengehirn. Dieser positive Effekt war mit einer Reduktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α assoziiert. Die pränatale Applikation zeigte sich dabei effektiver als die postnatale Gabe (46).

In einem *in vitro* Modell förderten durch rEPO aktivierte endotheliale Zellen die Migration neuronaler Progenitor-Zellen durch die Sekretion von MMP-2 und MMP-9 über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (Akt) und den Janus Kinase (Jak)2/Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK)1/2 Signalweg (47). Des Weiteren zeigte rEPO ebenfalls protektive Effekte bei der ischämischen Herzerkrankung durch die Abschwächung der extrazellulären Matrix-Degradation, welche durch MMP-2 und MMP-9 über die Anreicherung der ERK-Phosphorylierung realisiert wird (48). Als Wachstumsfaktor führt die Rezeptorbindung von rEPO zur Phosphorylierung von Jak2, wodurch multiple Signalkaskaden initiiert werden, inklusive MAP-Kinasen (41). In früheren Studien konnte die Hyperoxie-induzierte Reduktion von phosphoryliertem ERK in der grauen und weißen Substanz im Gehirn bei neuronalem Zelltod nachgewiesen werden (10, 38). Zudem reduzierte rEPO in einem Modell von NMDA-Antagonist-(MK801)-induzierter Neurotoxizität im juvenilen Rattengehirn den Zelltod in einer ERK-abhängigen Weise (49). Ob im aktuell untersuchten experimentellen Tiermodell der Hyperoxie die Wiederherstellung der ERK-abhängigen Signalwege von MMP-Aktivitäten abhängig ist, bedarf weiterer Untersuchungen.

4.1.2 Sifringer, Brait et al. 2010

Die Auswirkung von Erythropoietin auf Hyperoxie-bedingten oxidativen Stress und körpereigene antioxidative Systeme.

Ein weiteres Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis der Assoziation des Sauerstoff-bedingten Zelltods im sich entwickelnden Gehirn der Ratte mit einem Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies und deren Reduktion durch rEPO. Sauerstoff induziert parallel zu einer Reduktion des monomeren Glutathions (GSH) die signifikante Erhöhung des dimeren oxidierten Glutathions (GSSG) sowie eine erhöhte Lipidperoxidation. Dies lässt sich im Sinne der bekannten Oxidation durch freie Radikale erklären. Die gleichzeitige Behandlung mit rEPO führt in beiden Fällen zu einem Ausbleiben der verstärkten oxidativen Reaktion. Die Ergebnisse bezüglich der rEPO-bedingten Reduktion des Hyperoxie-induzierten oxidativen Stresses werden durch weitere Daten aus der Literatur unterstützt. rEPO reduziert die Stickstoffmonoxid (NO)-vermittelte Bildung freier Radikale oder antagonisiert deren Toxizität durch den Aktivitätsanstieg antioxidativer Enzyme in Neuronen (50). Außerdem vermindert rEPO die erhöhte Lipidperoxidation in Modellen der fetalen Ischämie/ Reperfusion und der neonatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung bei Ratten (51-52). rEPO erhöht des Weiteren die Aktivität des Glutathionperoxidase-Systems und verringert die exzessive NO-

Produktion in einem Modell der neonatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung (51). Auch die Glutathionperoxidase-Produktion in Astrozyten-Kulturen wird durch rEPO stimuliert, die Mikroglia vor oxidativ bedingtem Zelltod schützt und die mitochondriale Funktion im Gehirn nach traumatischer Hirnschädigung regeneriert (53-55). Diese Umstände könnten in der Prävention der Hyperoxie-induzierten Schädigung im sich entwickelnden Gehirn von Bedeutung sein, da antioxidative Systeme im unreifen Gehirn noch nicht vollständig ausgebildet sind aber möglicherweise durch rEPO unterstützt werden.

Ein weiterer Mechanismus, über welchen rEPO sein neuroprotektives Potential initiiert, lässt sich anhand des Anstiegs des Hämoxigenase-1 (HO-1)-Gehalts auf mRNA-, Protein- und Aktivitätsebene ableiten. Neuroprotektive Effekte von HO-1 wurden kürzlich beschrieben (56-58), wobei die Hochregulierung von HO-1 sich beispielsweise über den p38 Signalweg am Erythropoietin-vermittelten kardioprotektiven Effekt während der myokardialen Ischämie und Reperfusion beteiligt (59). Des Weiteren ist der Schutz der renalen endothelialen Zellen bei Hämodialyse-Patienten durch Erythropoietin ebenfalls mit einem Anstieg von HO-1 und einer dadurch bedingten Reduktion von oxidativem Stress assoziiert (60-61). Die Unterstützung der Erythropoietin-bedingten Protektion im Hyperoxie-Modell der neonatalen Ratte durch HO-1 ist demnach wahrscheinlich.

Die Bestimmung des Gehaltes an Acetylcholinesterase (AChE) auf mRNA-Ebene ergibt im vorgestellten Versuch einen Anstieg nach Hyperoxie-Exposition, welcher durch die zusätzliche Applikation von rEPO reduziert wird. Es ist bekannt, dass akuter Stress eine lang anhaltende Acetylcholinesterase-Überexpression im Gehirn induziert und dass das Verhältnis der verschiedenen AChE-Formen im ZNS des Erwachsenen und in Immunzellen, wo Acetylcholin die inflammatorische Reaktion beschränkt, zugunsten von AChE-R verschoben wird (62-65). In der vorgestellten Arbeit wurde daher die mRNA-Expression der synaptischen AChE-S- und der stressinduzierten AChE-R-Form evaluiert. Es zeigt sich, dass die reichlich vorhandene synaptische Spleißvariante konsistent hochreguliert wird, während die weniger häufige, alternativ gespleißte R-Form keine Veränderungen zeigt. Dies lässt auf unterschiedliche Mechanismen in der Regulation der stressinduzierten Expression schließen. Die Behandlung mit rEPO verhindert den Anstieg von AChE-S. Dies unterstützt die Rolle der Acetylcholinesterase in der Reduktion der stressinduzierten Veränderungen in der cholinergen Neurotransmission.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der vorgestellten Arbeit daraufhin, dass die protektiven Effekte von rekombinantem Erythropoietin auf die Hyperoxie-induzierte neuronale Zellschädigung im unreifen Gehirn der Ratte sowohl in der Reduktion inflammatorischer Prozesse, als auch in der Reduktion von oxidativem Stress und der Initiierung antioxidativer Mechanismen vermittelt werden. Dieser Aspekt ist vom klinischen Gesichtspunkt her ausgesprochen relevant. Die Sauerstoffapplikation bei neonatologischen Patienten ist in vielen Fällen unvermeidbar und die mögliche Bedeutsamkeit von Erythropoietin als Kandidat zur neuroprotektiven und antiinflammatorischen Therapie im unreifen Gehirn, besonders vor dem Hintergrund seiner bereits erprobten klinischen Verträglichkeit in der Kinderheilkunde, wird durch die vorgestellten Ergebnisse erneut verdeutlicht.

4.2 MDMA und Neurotrophine

4.2.1 Dzierko, Sifringer *et al.* 2010

Die Rolle von Neurotrophinen bei der MDMA-bedingten neuronalen Schädigung.

Die vorgelegte Arbeit zeigt, dass körpereigene Neurotrophine in der durch systemisch appliziertes 3,4-Methylenedioxy-N-Methylamphetamin (MDMA) ausgelösten neuro-degenerativen Reaktion im neonatalen Hirn der Ratte vermutlich eine protektive Rolle ausüben. Die Exposition des unreifen Rattenhirns gegenüber MDMA führt zu einem signifikanten Anstieg der Neurotrophine Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) und Neurotrophin-3 (NT-3) im retrosplenialen Kortex. Die Relevanz von BDNF bezüglich der MDMA-vermittelten Hirnschädigung wird durch die Tatsache unterstützt, dass das neonatale Gehirn von CD1/BDNF Knockout Mäusen verglichen mit Wildtyp-Kontrolltieren merklich sensitiver auf die MDMA-Toxizität reagiert.

Sowohl eine toxische, als auch eine nicht toxische Einzeldosis MDMA bedingen im vorgestellten Versuchsmodell beträchtliche Veränderungen der mRNA- und Protein-Expression von BDNF im retrosplenialen Kortex der neonatalen Ratte. BDNF-defiziente Mäuse zeigen nach MDMA-Gabe eine erhöhte apoptotische Rate neuronaler Zellen verglichen mit Wildtyp-Mäusen. In diversen früheren Studien konnten nach MDMA-Applikation moderat erhöhte BDNF Proteinexpressionen am 11. und 21. postnatalen Tag nachgewiesen werden (66-67). Bei erwachsenen Ratten wurde in der Vergangenheit eine ähnliche BDNF mRNA-Regulation 24 bis 48 Stunden nach MDMA-Applikation nachgewiesen (68). Es ist bekannt, dass eine an die cAMP-Produktion und CREB-Aktivierung gekoppelte Aktivierung von 5-HT Re-

zeptoren die Transkription des BDNF-Gens induzieren kann (69). Zielgene der BDNF-Signalwege beinhalten das antiapoptotische Protein Bcl-2 und die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (70-71). In kortikalen Neuronen blockiert BDNF effektiv den Methamphetamin-induzierten neuronalen Zelltod durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt Signalweg und bedingt einen neuroprotektiven Effekt bezüglich der Methamphetamin-induzierten Neurodegeneration im nigrostriatalen dopaminergen System von Mäusen (72-73). Daher lassen die vorgestellten Ergebnisse in Unterstützung und Verbindung mit der erwähnten Literatur zusammengefasst eine kompensatorische Rolle von BDNF als Reparaturmechanismus bei MDMA-induzierter Neurotoxizität im sich entwickelnden Vorderhirn der Ratte vermuten.

MDMA behandelte Tiere zeigen im vorgestellten Modell geringere Gewichtszunahmen als die Kontrolltiere. Es ist bekannt, dass diätetische Maßnahmen die BDNF-Expression im zerebralen Kortex, Hippocampus und Striatum erwachsener Ratten induzieren können. Daher ist es von Bedeutung zu diskutieren, ob die erhobenen Veränderungen der Neurotrophin-Expression mit den Unterschieden in der Gewichtszunahme der Tiere zusammenhängen. Es wurde gezeigt, dass die chronische MDMA-Exposition unabhängig von Gewichtsunterschieden in signifikanten Lern- und Gedächtnisdefiziten resultiert (74). Dies macht eine unabhängige Beeinflussung von MDMA auf Neurotrophine wahrscheinlich. Trotzdem kann der diätetische Einfluss bei den vorgestellten Ergebnissen aufgrund des auch hier aufgetretenen anorektischen Effektes nicht komplett ausgeschlossen werden.

Neben den erhöhten BDNF-Werten zeigt sich im beschriebenen Modell ein Anstieg des NT-3 mRNA-Niveaus im retrosplenialen Kortex. In einem Modell erwachsener Ratten mit bipolarer affektiver Störung wurde bereits eine erhöhte NT-3 mRNA-Expression nach Amphetamin-Injektion nachgewiesen (75). Die Präsenz von NT-3 mRNA im neonatalen Kortex nach einer Einzeldosis MDMA wird in dieser Arbeit jedoch erstmals nachgewiesen. NT-3 wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Es wurde als antiapoptotischer Faktor im neonatalen hypoxisch-ischämischen Modell, aber auch als Förderer von Zelltod in einem experimentellen Schlaganfall-Modell bei Erwachsenen nachgewiesen (76-77). Bezüglich des in dieser Arbeit evaluierten Anstiegs der NT-3 mRNA-Expression scheint es möglich, dass nicht nur BDNF, sondern auch eine lokale NT-3-Freisetzung zum neuronalen Schutz vor einer MDMA-Toxizität beiträgt. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse anderer Autoren unterstützt, die eine erhöhte Myelinisierungs-Kapazität von Oligodendrozyten nach NT-3-Stimulation zeigen konnten (78). Der Anstieg der NT-3-Expression könnte dementsprechend neben BDNF ein

wichtiger kompensatorischer Mechanismus sein, welcher zum Überleben neuronaler Zellen im sich entwickelnden Gehirn der Ratte beiträgt.

Für die Diskussion der Ergebnisse bezüglich der eingehenderen Evaluation der dosis-, orts- und altersabhängigen Neurodegeneration und Verhaltensveränderung, sowie der Ergebnisse bezüglich der NGF-Regulation wird auf die ausführliche Darstellung in der Publikation verwiesen.

Zusammengefasst zeigt die vorgelegte Arbeit, dass die neonatale MDMA-Applikation eine apoptotische Neurodegeneration im unreifen Gehirn von Ratten und Mäusen hervorruft. Die Mechanismen, über die MDMA seine neurotoxischen Effekte ausübt sind noch ungeklärt, der Anstieg in der Expression von BDNF und NT-3 spricht allerdings für eine neuroprotektive Rolle dieser Neurotrophine. Diese Hypothese wird durch eine höhere Empfindlichkeit von CD1/BDNF Knockout Mäusen gegenüber MDMA-Exposition unterstützt. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die MDMA-induzierte Toxizität in kritischen Perioden des Hirnwachstums pathologische neurodegenerative Veränderungen induzieren kann, welche vermutlich durch körpereigene, neuroprotektive Mechanismen in ihrem Ausmaß begrenzt werden.

5 Referenzen

- 1 Bregman J. Developmental outcome in very low birthweight infants. Current status and future trends. *Pediatr Clin North Am.* 1998;45(3):673-90.
- 2 Tin W, Wariyar U, Hey E. Changing prognosis for babies less than 28 weeks' gestation in the north of England between 1983 and 1994. Northern Neonatal Network. *BMJ.* 1997;314(7074):107-11.
- 3 Halsey CL, Collin MF, Anderson CL. Extremely low-birth-weight children and their peers. A comparison of school-age outcomes. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1996;150(8):790-4.
- 4 Wood NS, Marlow N, Costeloe K, Gibson AT, Wilkinson AR. Neurologic and developmental disability after extremely preterm birth. EPICure Study Group. *N Engl J Med.* 2000;343(6):378-84.

- 5 Hack M, Flannery DJ, Schluchter M, Cartar L, Borawski E, Klein N. Outcomes in young adulthood for very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med*. 2002;346(3):149-57.
- 6 Spinillo A, Montanari L, Gardella B, Roccio M, Stronati M, Fazzi E. Infant sex, obstetric risk factors, and 2-year neurodevelopmental outcome among preterm infants. *Dev Med Child Neurol*. 2009;51(7):518-25.
- 7 Back SA, Han BH, Luo NL, Chricton CA, Xanthoudakis S, Tam J, Arvin KL, Holtzman DM. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia. *J Neurosci*. 2002;22(2):455-63.
- 8 Hagberg H, Mallard C. Effect of inflammation on central nervous system development and vulnerability. *Curr Opin Neurol*. 2005;18(2):117-23.
- 9 Collins MP, Lorenz JM, Jetton JR, Paneth N. Hypocapnia and other ventilation-related risk factors for cerebral palsy in low birth weight infants. *Pediatr Res*. 2001;50(6):712-9.
- 10 Felderhoff-Mueser U, Bittigau P, Sifringer M, Jarosz B, Korobowicz E, Mahler L, Piening T, Moysich A, Grune T, Thor F, Heumann R, Bühner C, Ikonomidou C. Oxygen causes cell death in the developing brain. *Neurobiol Dis*. 2004;17(2):273-82.
- 11 Felderhoff-Mueser U, Sifringer M, Polley O, Dzierko M, Leineweber B, Mahler L, Baier M, Bittigau P, Obladen M, Ikonomidou C, Bühner C. Caspase-1-processed interleukins in hyperoxia-induced cell death in the developing brain. *Ann Neurol*. 2005;57(1):50-9.
- 12 Kaindl AM, Sifringer M, Zabel C, Nebrich G, Wacker MA, Felderhoff-Mueser U, Endesfelder S, von der Hagen M, Stefovská V, Klose J, Ikonomidou C. Acute and long-term proteome changes induced by oxidative stress in the developing brain. *Cell Death Differ*. 2006;13(7):1097-109.
- 13 Gerstner B, DeSilva TM, Genz K, Armstrong A, Brehmer F, Neve RL, Felderhoff-Mueser U, Volpe JJ, Rosenberg PA. Hyperoxia causes maturation-dependent cell death in the developing white matter. *J Neurosci*. 2008;28(5):1236-45.
- 14 Saugstad OD. Is oxygen more toxic than currently believed? *Pediatrics*. 2001;108(5):1203-5.
- 15 Saugstad OD. Optimal oxygenation at birth and in the neonatal period. *Neonatology*. 2007;91(4):319-22.

- 16 Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19(6):643-51.
- 17 Weber A, Maier RF, Hoffmann U, Grips M, Hoppenz M, Aktas AG, Heinemann U, Obladen M, Schuchmann S. Erythropoietin improves synaptic transmission during and following ischemia in rat hippocampal slice cultures. *Brain Res.* 2002;958(2):305-11.
- 18 Grasso G, Sfacteria A, Meli F, Fodale V, Buemi M, Iacopino DG. Neuroprotection by erythropoietin administration after experimental traumatic brain injury. *Brain Res.* 2007;1182:99-105.
- 19 Elfar JC, Jacobson JA, Puzas JE, Rosier RN, Zuscik MJ. Erythropoietin accelerates functional recovery after peripheral nerve injury. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90(8):1644-53.
- 20 Juul S, Felderhoff-Mueser U. Epo and other hematopoietic factors. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2007;12(4):250-8.
- 21 Fauchère JC, Dame C, Vonthein R, Koller B, Arri S, Wolf M, Bucher HU. An approach to using recombinant erythropoietin for neuroprotection in very preterm infants. *Pediatrics.* 2008;122(2):375-82.
- 22 Juul SE, McPherson RJ, Bammler TK, Wilkerson J, Beyer RP, Farin FM. Recombinant erythropoietin is neuroprotective in a novel mouse oxidative injury model. *Dev Neurosci.* 2008;30(4):231-42.
- 23 Kaindl AM, Sifringer M, Koppelstaetter A, Genz K, Loeber R, Boerner C, Stuwe J, Klose J, Felderhoff-Mueser U. Erythropoietin protects the developing brain from hyperoxia-induced cell death and proteome changes. *Ann Neurol.* 2008;64(5):523-34.
- 24 Johnston LD, O'Malley PM, Bachmann JG, Schulenberg JE. Monitoring the Future national survey results on drug use, 1975-2008. Volume II: College students and adults ages 19-50 (NIH Publication No. 09-7403; 2009). Bethesda, MD: National Institute on Drug Abuse, 306 pp.
- 25 Campbell NG, Koprach JB, Kanaan NM, Lipton JW. MDMA administration to pregnant Sprague-Dawley rats results in its passage to the fetal compartment. *Neurotoxicol Teratol.* 2006;28(4):459-65.
- 26 McElhatton PR, Bateman DN, Evans C, Pughe KR, Thomas SH. Congenital anomalies after prenatal ecstasy exposure. *Lancet.* 1999;354(9188):1441-2.

- 27 Chang L, Smith LM, LoPresti C, Yonekura ML, Kuo J, Walot I, Ernst T. Smaller subcortical volumes and cognitive deficits in children with prenatal methamphetamine exposure. *Psychiatry Res.* 2004;132(2):95-106.
- 28 Cloak CC, Ernst T, Fujii L, Hedemark B, Chang L. Lower diffusion in white matter of children with prenatal methamphetamine exposure. *Neurology.* 2009;72(24):2068-75.
- 29 Ho E, Karimi-Tabesh L, Koren G. Characteristics of pregnant women who use ecstasy (3, 4-methylenedioxymethamphetamine). *Neurotoxicol Teratol.* 2001;23(6):561-7.
- 30 Maxwell JC. Update: comparison of drug use in Australia and the United States as seen in the 2001 National Household Surveys. *Drug Alcohol Rev.* 2003;22(3):347-57.
- 31 Hansen HH, Briem T, Dzierko M, Siffringer M, Voss A, Rzeski W, Zdzisinska B, Thor F, Heumann R, Stepulak A, Bittigau P, Ikonomidou C. Mechanisms leading to disseminated apoptosis following NMDA receptor blockade in the developing rat brain. *Neurobiol Dis.* 2004;16(2):440-53.
- 32 Han BH, Holtzman DM. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci.* 2000;20(15):5775-81.
- 33 Felderhoff-Mueser U, Siffringer M, Pesditschek S, Kuckuck H, Moysich A, Bittigau P, Ikonomidou C. Pathways leading to apoptotic neurodegeneration following trauma to the developing rat brain. *Neurobiol Dis.* 2002;11(2):231-45.
- 34 Ben-Zvi A, Yagil Z, Hagalili Y, Klein H, Lerman O, Behar O. Semaphorin 3A and neurotrophins: a balance between apoptosis and survival signaling in embryonic DRG neurons. *J Neurochem.* 2006;96(2):585-97.
- 35 Djalali S, Hölzje M, Grosse G, Rothe T, Stroh T, Grosse J, Deng DR, Hellweg R, Grantyn R, Hörtnagl H, Ahnert-Hilger G. Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on glial cells and serotonergic neurones during development. *J Neurochem.* 2005;92(3):616-27.
- 36 Luellen BA, Bianco LE, Schneider LM, Andrews AM. Reduced brain-derived neurotrophic factor is associated with a loss of serotonergic innervation in the hippocampus of aging mice. *Genes Brain Behav.* 2007;6(5):482-90.
- 37 Martinowich K, Lu B. Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. *Neuropsychopharmacology.* 2008;33(1):73-83.
- 38 Gerstner B, Siffringer M, Dzierko M, Schüller A, Lee J, Simons S, Obladen M, Volpe JJ, Rosenberg PA, Felderhoff-Mueser U. Estradiol attenuates hyperoxia-induced cell death in the developing white matter. *Ann Neurol.* 2007;61(6):562-73.

- 39 Demers EJ, McPherson RJ, Juul SE. Erythropoietin protects dopaminergic neurons and improves neurobehavioral outcomes in juvenile rats after neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res.* 2005;58(2):297-301.
- 40 Sola A, Wen TC, Hamrick SE, Ferriero DM. Potential for protection and repair following injury to the developing brain: a role for erythropoietin? *Pediatr Res.* 2005;57(5 Pt 2):110R-117R.
- 41 Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature.* 2001;412(6847):641-7.
- 42 Keller M, Yang J, Griesmaier E, Gorna A, Sarkozy G, Urbanek M, Gressens P, Simbruner G. Erythropoietin is neuroprotective against NMDA-receptor-mediated excitotoxic brain injury in newborn mice. *Neurobiol Dis.* 2006;24(2):357-66.
- 43 Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death Differ.* 2004;11 Suppl 1:S37-44.
- 44 Sun Y, Calvert JW, Zhang JH. Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. *Stroke.* 2005;36(8):1672-8.
- 45 Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, Viviani B, Marinovich M, Cerami A, Coleman TR, Brines M, Ghezzi P. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med.* 2003;198(6):971-5.
- 46 Kumral A, Baskin H, Yesilirmak DC, Ergur BU, Aykan S, Genc S, Genc K, Yilmaz O, Tugyan K, Giray O, Duman N, Ozkan H. Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. *Neonatology.* 2007;92(4):269-78.
- 47 Wang L, Zhang ZG, Zhang RL, Gregg SR, Hozeska-Solgot A, LeTourneau Y, Wang Y, Chopp M. Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration. *J Neurosci.* 2006;26(22):5996-6003.
- 48 Chan CY, Chen YS, Lee HH, Huang HS, Lai YL, Chen CF, Ma MC. Erythropoietin protects post-ischemic hearts by preventing extracellular matrix degradation: role of Jak2-ERK pathway. *Life Sci.* 2007;81(9):717-23.
- 49 Dzierko M, Felderhoff-Mueser U, Siffringer M, Krutz B, Bittigau P, Thor F, Heumann R, Bührer C, Ikonomidou C, Hansen HH. Erythropoietin protects the developing brain

- against N-methyl-D-aspartate receptor antagonist neurotoxicity. *Neurobiol Dis.* 2004;15(2):177-87.
- 50 Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(8):4635-40.
- 51 Kumral A, Gonenc S, Acikgoz O, Sonmez A, Genc K, Yilmaz O, Gokmen N, Duman N, Ozkan H. Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate.* 2005;87(1):15-8.
- 52 Solaroglu I, Solaroglu A, Kaptanoglu E, Dede S, Haberal A, Beskonakli E, Kilinc K. Erythropoietin prevents ischemia-reperfusion from inducing oxidative damage in fetal rat brain. *Childs Nerv Syst.* 2003;19(1):19-22.
- 53 Genc S, Akhisaroglu M, Kurulay F, Genc K. Erythropoietin restores glutathione peroxidase activity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in C57BL mice and stimulates murine astroglial glutathione peroxidase production in vitro. *Neurosci Lett.* 2002;321(1-2):73-6.
- 54 Li F, Chong ZZ, Maiese K. Microglial integrity is maintained by erythropoietin through integration of Akt and its substrates of glycogen synthase kinase-3beta, beta-catenin and nuclear factor-kappaB. *Curr Neurovasc Res.* 2006;3(3):187-201.
- 55 Xiong Y, Chopp M, Lee CP. Erythropoietin improves brain mitochondrial function in rats after traumatic brain injury. *Neurol Res.* 2009;31(5):496-502.
- 56 Guan L, Wen T, Zhang Y, Wang X, Zhao J. Induction of heme oxygenase-1 with hemin attenuates hippocampal injury in rats after acute carbon monoxide poisoning. *Toxicology.* 2009;262(2):146-52.
- 57 Li F, Saleem S, Zhen G, Cao W, Zhuang H, Lee J, Smith A, Altruda F, Toloscano E, Dore S. Heme-hemopexin complex attenuates neuronal cell death and stroke damage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(5):953-64.
- 58 Saleem S, Zhuang H, Biswal S, Christen Y, Dore S. Ginko biloba extract neuroprotective action is dependent on heme oxygenase 1 in ischemic reperfusion brain injury. *Stroke.* 2008; 39(12):3389-96.
- 59 Burger D, Xiang F, Hammoud L, Lu X, Feng Q. Role of heme oxygenase-1 in the cardioprotective effects of erythropoietin during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296(1):H84-93.

- 60 Calo LA, Stanic L, Davis PA, Pagnin E, Munaretto G, Fusaro M, Landini S, Semplicini A, Piccoli A. Effect of epoetin on HO-1 mRNA level and plasma antioxidants in hemodialysis patients. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2003;41(5):187-92.
- 61 Katavetin P, Inagi R, Miyata T, Shao J, Sassa R, Adler S, Eto N, Kato H, Fujita T, Nangaku M. Erythropoietin induces heme oxygenase-1 expression and attenuates oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;359(4):928-34.
- 62 Metz CN, Tracey KJ. It takes nerve to dampen inflammation. *Nat Immunol.* 2005;6(8):756-7.
- 63 Pick M, Perry C, Lapidot T, Guimaraes-Sternberg C, Naparstek E, Deutsch V, Soreq H. Stress-induced cholinergic signaling promotes inflammation-associated thrombopoiesis. *Blood.* 2006;107(8):3397-406.
- 64 Kaufer D, Friedman A, Seidman S, Soreq H. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature.* 1998;393(6683):373-7.
- 65 Meshorer E, Erb C, Gazit R, Pavlovsky L, Kaufer D, Friedman A, Glick D, Ben-Arie N, Soreq H. Alternative splicing and neuritic mRNA translocation under long-term neuronal hypersensitivity. *Science.* 2002;295(5554):508-12.
- 66 Koprach JB, Campbell NG, Lipton JW. Neonatal 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) alters dopamine and serotonin neurochemistry and increases brain-derived neurotrophic factor in the forebrain and brainstem of the rat. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003;147(1-2):177-82.
- 67 Piper BJ, Meyer JS. Memory deficit and reduced anxiety in young adult rats given repeated intermittent MDMA treatment during the periadolescent period. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004;79(4):723-31.
- 68 Martinez-Turillas R, Moyano S, del Rio J, Frechilla D. Differential effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") on BDNF mRNA expression in rat frontal cortex and hippocampus. *Neurosci Lett.* 2006;402(1-2):126-30.
- 69 Mattson MP, Maudsley S, Martin B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 2004;27(10):589-94.
- 70 Allsopp TE, Liselev S, Wyatt S, Davies AM. Role of Bcl-2 in the brain-derived neurotrophic factor survival response. *Eur J Neurosci.* 1995;7(6):1266-72.
- 71 Cheng A, Wang S, Cai J, Rao MS, Mattson MP. Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Dev Biol.* 2003;

- 258(2):319-33.
- 72 Matsuzaki H, Namikawa K, Kiyama H, Mori N, Sato K. Brain-derived neurotrophic factor rescues neuronal death induced by methamphetamine. *Biol Psychiatry*. 2004;55(1):52-60.
- 73 Dluzen DE. The effect of gender and the neurotrophin, BDNF, upon methamphetamine-induced neurotoxicity of the nigrostriatal dopaminergic system in mice. *Neurosci Lett*. 2004;359(3):135-8.
- 74 Williams MT, Morford LL, Wood SL, Rock SL, McCrea AE, Fukumara M, Wallace TL, Broening HW, Moran MS, Vorhees CV. Developmental 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) impairs sequential and spatial but not cued learning independent of growth, litter effects or injection stress. *Brain Res*. 2003;968(1):89-101.
- 75 Walz JC, Frey BN, Andreazza Ac, Cereser KM, Cacilhas AA, Valvassori SS, Quevedo J, Kapczinski F. Effects of lithium and valproate on serum and hippocampal neurotrophin-3 levels in an animal model of mania. *J Psychiatr Res*. 2008;42(5):416-21.
- 76 Galvin KA, Oorschot DE. Continuous low-dose treatment with brain-derived neurotrophic factor or neurotrophin-3 protects striatal medium spiny neurons from mild neonatal hypoxia/ischemia: a stereological study. *Neuroscience*. 2003;118(4):1023-32.
- 77 Bates B, Hirt L, Thomas SS, Akbarian S, Le D, Amin-Hanjani S, Whalen M, Jaenisch R, Moskowitz MA. Neurotrophin-3 promotes cell death induced in cerebral ischemia, oxygen-glucose deprivation, and oxidative stress: possible involvement of oxygen free radicals. *Neurobiol Dis*. 2002;9(1):24-37.
- 78 Coelho RP, Yuelling LM, Fuss B, Sato-Bigbee C. Neurotrophin-3 targets the translational initiation machinery in oligodendrocytes. *Glia*. 2009;57(16):1754-64.

Anhang

Anteilerklärung

Lebenslauf

Publikationsliste

Selbstständigkeitserklärung

Danksagung

Ausgewählte Publikationen

Anteilsklärung

Die Promovendin Daniela Brait hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation I

Journal: Developmental Neuroscience 2009;31(5):394-402
(Impact Faktor 2,667)

Titel: Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced cell death by modulation of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases

Autoren: Marco Sifringer, Kerstin Genz, Daniela Brait, Felix Brehmer, Rebekka Löber, Ulrike Weichelt, Angela M. Kaindl, Bettina Gerstner und Ursula Felderhoff-Mueser

Anteil: 25-30% eigener Anteil (Mitautorenschaft)
Der eigene Anteil im Rahmen der Arbeiten für diese Publikation ist mit 25-30% anzugeben. Neben einer Vielzahl an Western Blot- und realtime PCR-Analysen wurden auch zymographische Untersuchungen zu diesem Artikel von der Promovendin durchgeführt. Zudem war sie beim Erstellen des Manuskriptes beteiligt.

Publikation II

Journal: Brain, Behaviour and Immunity 2010;24(5):792-9
(Impact Faktor 5,061)

Titel: Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced oxidative stress in the developing rat brain

Autoren: Marco Sifringer, Daniela Brait, Ulrike Weichelt, Gabriel Zimmermann, Stefanie Endesfelder, Felix Brehmer, Clarissa von Haefen, Alon Friedman, Hermona Soreq, Ivo Bendix, Bettina Gerstner und Ursula Felderhoff-Mueser

Anteil: 50% eigener Anteil (geteilte Erstautorenschaft)
Der eigene Anteil im Rahmen der Arbeiten für die genannte Publikation ist mit 50% anzugeben. Bei dieser Veröffentlichung hat die

Promovendin mit größtmöglicher Eigenverantwortlichkeit und Selbständigkeit eine große Anzahl an molekularbiologischen Untersuchungen durchgeführt. Zudem wurde der Artikel von ihr zur Publikationsreife gebracht.

Publikation III

Journal: Developmental Neuroscience 2010;32:197-207
(Impact Faktor 2,667)

Titel: Neurotoxic effects of MDMA (Ecstasy) on the developing rodent brain

Autoren: Mark Dzierko, Marco Sifringer, Juliane Klaus, Stefanie Endesfelder, Daniela Brait, Henrik H. Hansen, Ivo Bendix, Ursula Felderhoff-Mueser

Anteil: 25% eigener Anteil (Mitautorenschaft)

Der eigene Anteil im Rahmen der Arbeiten für die genannte Publikation ist mit 25% anzugeben. Neben Western Blot- und realtime PCR-Analysen wurden histologische Untersuchungen von der Promovendin durchgeführt. Zudem war sie beim Erstellen des Manuskriptes beteiligt.

Berlin, den 13.12.2010

Prof. Dr. med Ursula Felderhoff-Müser

Daniela Brait

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Publikationen

Sifringer M, Genz K, **Brait D**, Brehmer F, Löber R, Weichelt U, Kaindl AM, Gerstner B, Felderhoff-Mueser U. Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced cell death by modulation of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases. *Dev Neurosci.* 2009;31(5):394-402.

Sifringer M, **Brait D**, Weichelt U, Zimmerman G, Endesfelder S, Brehmer F, von Haefen C, Friedman A, Soreq H, Bendix I, Gerstner B, Felderhoff-Mueser U. Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced oxidative stress in the developing rat brain. *Brain Behav Immun.* 2010;24(5):792-9.

Dzietko M, Sifringer M, Klaus J, Endesfelder S, **Brait D**, Hansen HH, Bendix I, Felderhoff-Mueser U. Neurotoxic effects of MDMA (Ecstasy) on the developing rodent brain. *Dev Neurosci.* 2010;32:197-207.

Poster

D Brait, M Sifringer, B Gerstner, F Brehmer, M Dzietko, A Kaindl, U Felderhoff-Mueser. Oxygen induces upregulation of proteins involved in neuronal networks and oxidative stress. Jahrestagung der Europäischen Akademie für Pädiatrie, 24.- 28. Oktober 2008, Nizza, Frankreich.

F Brehmer, **D Brait**, C Bühner, U Felderhoff-Mueser, B Gerstner. Die Wirkung von Inflammation auf die Sauerstoff-induzierte Hirnschädigung im neonatalen Rattenmodell. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin, 06.- 09. Mai 2009, Berlin, Deutschland.

Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Daniela Brait, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Die Auswirkungen von Wachstumsfaktoren auf das neonatale Gehirn am Beispiel Hyperoxie- und MDMA-induzierter Neurotoxizität“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 13.12.2010

Daniela Brait

Danksagung

Zu Beginn möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med Ursula Felderhoff-Müser für ihre stets unmittelbare und umfassende Unterstützung danken. Schon damals bei der Auswahl meiner Promotion war ich mir sicher in ihr eine vertrauensvolle Betreuerin gefunden zu haben und diese Annahme hat sich in den letzten Jahren hundertprozentig bestätigt. Ich bin ihr nicht nur für die Realisierung meiner Dissertation, sondern auch für die Hilfe bezüglich meiner ersten Arbeitsstelle dankbar und freue mich wirklich sehr auf die weitere Zusammenarbeit.

Großer Dank gebührt des Weiteren meinem Betreuer Dr. Marco Sifringer. Durch ihn habe ich die Freude am wissenschaftlichen Arbeiten erlernt. Er stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite und kümmerte sich immer mit Engagement um die mich und das gesamte Team betreffenden Angelegenheiten.

Ein ebenso herzliches Dankeschön für das angenehme Arbeitsklima und die schöne Zeit gilt allen anderen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe. Zu nennen sind hierbei insbesondere Rodica Altmann, Constanze Börner, Felix Brehmer, Mark Dzierko, Stefanie Endesfelder, Jessica Faßbender, Jennifer Kny, Evelyn Strauss, Ulrike Weichelt und Robert Zaccharias. Ich bin äußerst dankbar dafür, dass ich das Glück hatte meine Promotion in einem Umfeld durchführen zu können, in welchem neben guter wissenschaftlicher Arbeit besonders das kollegiale Verhältnis und die gegenseitige Unterstützung im Vordergrund standen.

Zum Abschluss möchte ich den Menschen danken, denen meine Arbeit gewidmet ist: meinem Partner Sebastian Hoerber und meiner Familie Fabio, Gisela, und Paolo Brait. Besonders bei ihnen möchte ich mich von ganzem Herzen für ihre Hilfe bedanken.

Sebastian danke ich für seine Liebe und sein Vertrauen. Seine physische und moralische Unterstützung und sein Glauben an mich und meine Fähigkeiten haben mir in den letzten Monaten Kraft gegeben und lassen mich freudig in unsere gemeinsame Zukunft blicken.

Mein Bruder war mir bezüglich seines Werdegangs sowie seiner Persönlichkeit in vielerlei Hinsicht ein Vorbild und ich danke ihm für die Impulse und Ideen, die er mir durch seine Lebensweise gegeben hat. Meine Eltern waren durch ihre grenzenlose Unterstützung bedeutend an der Umsetzung meiner Promotion beteiligt und standen mir auch zu meiner Examenszeit tatkräftig zur Seite. Das Glück ihrer Kinder hat für sie immer höchste Priorität und ohne ihre Hilfe wären mir viele Möglichkeiten in meinem Leben verwehrt geblieben.

Ausgewählte Publikationen

Sifringer M, Genz K, **Brait D**, Brehmer F, Löber R, Weichelt U, Kaindl AM, Gerstner B, Felderhoff-Mueser U. Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced cell death by modulation of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases. *Dev Neurosci.* 2009;31(5):394-402.

Sifringer M, **Brait D**, Weichelt U, Zimmerman G, Endesfelder S, Brehmer F, von Haefen C, Friedman A, Soreq H, Bendix I, Gerstner B, Felderhoff-Mueser U. Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced oxidative stress in the developing rat brain. *Brain Behav Immun.* 2010;24(5):792-9.

Dzietko M, Sifringer M, Klaus J, Endesfelder S, **Brait D**, Hansen HH, Bendix I, Felderhoff-Mueser U. Neurotoxic effects of MDMA (Ecstasy) on the developing rodent brain. *Dev Neurosci.* 2010;32:197-207.