

Aus der Klinik für Kinderheilkunde mit Schwerpunkt Neonatologie  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die neurotoxische Wirkung von MDMA  
auf das unreife Gehirn  
am Modell der neonatalen Ratte**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Frau Juliane Klaus  
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. U. Felderhoff-Müser  
2. Prof. Dr. med. Ch. Bühner  
3. Prof. Dr. med. H. Ikonomidou

Datum der Promotion: 18.09.2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 MDMA - Stand der Forschung . . . . .	1
1.1.1 MDMA - Historischer Rückblick . . . . .	1
1.1.2 Konsum und Konsumenten von MDMA . . . . .	2
1.1.3 Wirkung von MDMA auf das ungeborene Kind . . . . .	3
1.1.4 Pharmakologie von MDMA . . . . .	4
1.1.5 Wirkungen und Gefahren von MDMA . . . . .	5
1.1.6 Neurotoxizität von MDMA und resultierende kognitive Beeinträchtigungen	7
1.2 Die Phase des rapiden Hirnwachstums . . . . .	9
1.3 Programmierter Zelltod - Apoptose . . . . .	10
1.3.1 Die Bedeutung der Apoptose in der Hirnentwicklung . . . . .	10
1.3.2 Die Bedeutung der Apoptose in Bezug auf Erkrankungen . . . . .	11
1.4 Neurotrophine . . . . .	11
1.4.1 Die Bedeutung der Neurotrophine im sich entwickelnden Gehirn . . . . .	11
1.4.2 Rezeptorbindung und Aktivierungswege der Neurotrophine . . . . .	12
1.4.3 Interaktionen zwischen Neurotrophinen und MDMA . . . . .	13
1.5 Herleitung einer Aufgabenstellung . . . . .	14
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1 Histologie . . . . .	17
2.1.1 Tierversuche, Tierschutzrichtlinien und Versuchsplan . . . . .	17
2.1.2 Perfusion, Präparation . . . . .	18
2.1.3 Einbettung, Schnitt . . . . .	19
2.1.4 DeOlmos Kupfer-Silberfärbung . . . . .	19
2.1.5 TUNEL-Färbung . . . . .	21
2.1.6 Fluoro-Jade B Färbung . . . . .	21
2.1.7 Cresylviolett-Färbung zur Zelldichtebestimmung . . . . .	21
2.1.8 Morphometrie und Lichtmikroskopie . . . . .	22
2.1.9 Statistische Methoden . . . . .	23
2.2 Transkriptionsanalyse mittels semiquantitativer PCR . . . . .	25
2.2.1 Tierversuche und Versuchsplan . . . . .	25
2.2.2 Präparation der Gehirne . . . . .	25
2.2.3 RNA-Extraktion . . . . .	25
2.2.4 RNA-Konzentrationsbestimmung . . . . .	26
2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	26
2.2.6 Reverse Transkription der RNA . . . . .	27
2.2.7 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	27

2.2.8	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) . . . . .	28
2.2.9	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen . . . . .	29
2.2.10	Densitometrische Auswertung der Polyacrylamidgele und deren statistische Analyse . . . . .	29
2.3	Transkriptionsanalyse mittels real-time PCR . . . . .	30
2.4	Proteinanalyse mittels Western Blot . . . . .	31
2.4.1	Proteinextraktion . . . . .	31
2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	32
2.4.3	Western Blot-Verfahren . . . . .	32
2.5	BDNF Knockout Mäuse . . . . .	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
3.1	Neurodegeneration im unreifen Gehirn der Ratte . . . . .	37
3.1.1	Altersabhängigkeit der Neurodegeneration unter MDMA . . . . .	42
3.1.2	Dosisabhängigkeit der Neurodegeneration unter MDMA . . . . .	44
3.1.3	Zeitabhängigkeit der Neurodegeneration unter MDMA . . . . .	46
3.2	Einfluss von MDMA auf das Verhalten und das Körpergewicht der Versuchstiere . . . . .	47
3.3	Einfluss von MDMA auf die Genexpression der Wachstumsfaktoren . . . . .	49
3.3.1	Genexpression von BDNF bei einer Dosis von 60 mg/kg KG MDMA . . . . .	49
3.3.2	Genexpression von BDNF bei einer Dosis von 20 mg/kg KG MDMA . . . . .	52
3.3.3	Genexpression von NT-3 und NGF . . . . .	54
3.3.4	Einfluss von MDMA auf die Regulation von BDNF auf Proteinebene . . . . .	56
3.4	Einfluss von BDNF auf die apoptotische Neurodegeneration . . . . .	57
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
4.1	Neurodegeneration durch MDMA im unreifen Rattengehirn . . . . .	59
4.1.1	Betroffene Hirnregionen der neurotoxischen Wirkung von MDMA . . . . .	61
4.1.2	Gesteigerte Vulnerabilität des unreifen Gehirns für externe Noxen . . . . .	62
4.1.3	Mechanismen der Neurodegeneration induziert durch MDMA . . . . .	62
4.1.4	Einfluss der Körpertemperatur auf die Neurodegeneration . . . . .	64
4.2	MDMA beeinflusst die Genexpression von Nervenwachstumsfaktoren . . . . .	64
4.2.1	Neuroprotektion durch BDNF . . . . .	66
4.3	Auswirkungen von MDMA auf das Körpergewicht . . . . .	66
4.4	Übertragbarkeit des Tiermodells auf den Menschen . . . . .	67
4.5	Bezug zur Klinik und Schlussfolgerungen . . . . .	68
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>69</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>71</b>
<b>A</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>B</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>83</b>
<b>C</b>	<b>Danksagung</b>	<b>85</b>
<b>D</b>	<b>Erklärung an Eides Statt</b>	<b>87</b>

# Tabellenverzeichnis

2.1	<b>Versuchsplan Histologie</b>	18
2.2	<b>Versuchsplan Molekularbiologie</b>	25
2.3	<b>Nukleotidsequenzen der Primer</b>	28
2.4	<b>Verwendete Antikörper für Immunoblot</b>	35
3.1	<b>Die Neurotoxische Wirkung von MDMA auf verschiedene Hirnregionen.</b>	40



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Altersstruktur und Geschlechtsverteilung der Konsumenten von Ecstasy (MDMA). . . . .	2
1.2	Strukturformel von MDMA. . . . .	5
1.3	Die Periode des rapiden Hirnwachstums „Brain growth spurt period“. . . . .	9
2.1	Rattengehirn nach vorsichtiger Präparation aus dem Schädel. . . . .	19
2.2	Nach DeOlmos gefärbte Hirnschnitte auf gedeckelten Objektträgern. . . . .	20
2.3	Hirnschnittpräparate 14 Tage alter Ratten mit Cresylviolett gefärbt. . . . .	22
3.1	Hirnschnittpräparate sieben Tage alter Ratten gefärbt nach DeOlmos. . . . .	38
3.2	Vermehrter Zelluntergang in der Tenia tecta in Hirnschnittpräparaten 7 Tage alter Ratten. . . . .	39
3.3	Übersicht der untersuchten Hirnregionen. . . . .	39
3.4	Hirnschnittpräparate nach einer TUNEL-Färbung. . . . .	41
3.5	Hirnschnittpräparate nach Fluoro-Jade B gefärbt. . . . .	42
3.6	Altersabhängigkeit der proapoptotischen Wirkung von MDMA. . . . .	43
3.7	Dosisabhängigkeit der proapoptotischen Wirkung von MDMA. . . . .	45
3.8	Zeitabhängigkeit der proapoptotischen Wirkung von MDMA. . . . .	47
3.9	Gewichtsveränderungen 24 Stunden nach MDMA- Injektion. . . . .	48
3.10	Semiquantitative PCR zur Bestimmung von BDNF. . . . .	50
3.11	Real-time PCR zur Bestimmung von BDNF. . . . .	51
3.12	Semiquantitative PCR zur Bestimmung von BDNF bei 20 mg/kg KG MDMA. . . . .	53
3.13	Semiquantitative PCR zur Bestimmung von NT-3. . . . .	54
3.14	Semiquantitative PCR zur Bestimmung von NGF. . . . .	55
3.15	Proteinanalyse mittels Western Blot zur Bestimmung von BDNF. . . . .	56
3.16	Der Einfluss von BDNF auf die apoptotische Neurodegeneration. . . . .	58



# 1 Einleitung

## 1.1 MDMA - Stand der Forschung

### 1.1.1 MDMA - Historischer Rückblick

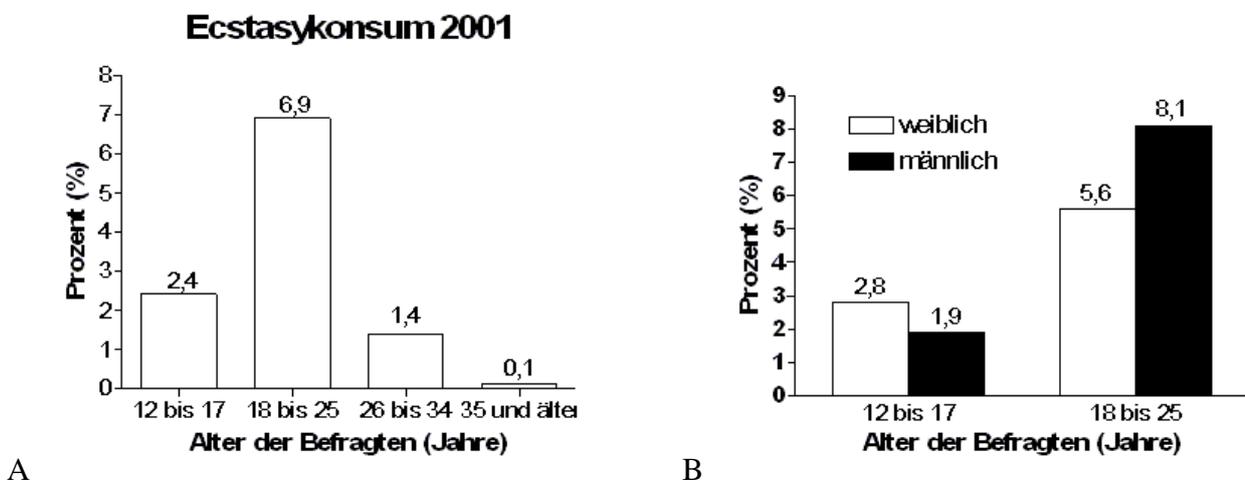
MDMA (3,4-Methylendioxy-N-Methamphetamin), ein Amphetaminderivat, ist im Volksmund bekannt als Ecstasy. Die Droge kommt als Einzelsubstanz nicht in der Natur vor, ist jedoch chemisch verwandt mit der Muskatnuss, deren berauschende Wirkung bereits vor mehreren Jahrhunderten entdeckt wurde. Die erstmalige Synthese von MDMA gelang dem deutschen Chemiker *Haber* (1898) im Rahmen seiner Dissertation [111]. Die Substanz wurde dann 1914 von der deutschen Pharma-Firma MERCK, wegen seiner bekannten, hungerunterdrückenden Wirkung als Appetitzügler entwickelt und patentiert, doch brachte man diesen Wirkstoff wegen „seltsamer“ Nebenwirkungen nie auf den Markt [105, 44]. 1970 wurde er „wiederentdeckt“ und in den USA bei psychiatrischen Patienten als Medikament eingesetzt. Aufgrund seiner leicht sinnestäuschenden und bewußtseinsweiternden Wirkung einerseits und seiner aufputschenden und leistungssteigernden Effekte andererseits wurde es mehr und mehr im privaten Leben oder im Rahmen von religiösen Meditationsveranstaltungen eingenommen. Der populäre Deckname „Ecstasy“ stammt aus der amerikanischen Drogenszene. Er wurde 1972 erstmals von Betreibern eines illegalen Drogenlabors in Kalifornien für den Vertrieb des illegal produzierten Stoffes MDMA verwendet. In der Herstellung ist Ecstasy sehr preisgünstig, daher lassen sich von sogenannten Dealern durch den Verkauf große Gewinne erzielen [111].

In Europa kam Ecstasy zunächst in Großbritannien, später in der zweiten Hälfte der 80er Jahre auch auf dem Kontinent im Rahmen der Techno- und Housemusik-Welle auf sogenannten Rave- oder Mayday-Parties in Mode. Heute gilt es als „die Spaß- und Gute-Laune-Droge“, die zumeist in Form einer Pille erworben wird. Die Dosis, die üblicherweise eingenommen wird liegt um die 2 mg/kg Körpergewicht (KG) [101, 36]. Allerdings wissen die Konsumenten zumeist nicht, wieviel mg die Pille enthält und wie rein die Substanz tatsächlich ist. Die Bezeichnung Ecstasy wurde ursprünglich nur für das Amphetamin MDMA verwendet, beinhaltet aber inzwischen auf dem illegalen Markt verschiedene Amphetamine, wie z.B. MDA (Methylendioxyamphetamin), welches eine stärkere halluzinogene Wirkung hat. Als Zusatz- und Austauschstoffe werden aber auch andere synthetisch hergestellte Drogen, Paracetamol, Ephedrin, Koffein und z.T. Placebos verkauft. Jeder menschliche Organismus reagiert individuell in seinem Stoffwechsel auf die Droge. Was für den einen eine gute Dosis ist, kann für den anderen schlimmstenfalls tödlich ausgehen [111].

Seit dem 01.08.1986 ist der Erwerb, Besitz und Handel mit Ecstasy bzw. dessen Wirkstoffen nach Maßgabe des § 29 des Betäubungsmittelgesetzes (BtMG) strafbar. Der alleinige Konsum von Betäubungsmitteln ist laut Gesetz jedoch nicht strafbar, da es sich dabei um reine Eigengefährdung handelt [111]. Seine aktuelle Popularität verdankt die Droge dem Gebrauch auf sogenannten „Rave-Partys“, wo die ganze Nacht durchgetanzt wird. Sie wird eingenommen, um die Müdigkeit zu verdrängen und dem Konsumenten zu ermöglichen für Stunden energetisch tanzen zu können [55].

### 1.1.2 Konsum und Konsumenten von MDMA

Der internationale Stand der Forschung zum Thema „synthetische Drogen“ ist unbefriedigend - besonders in Bezug auf MDMA (3,4-Methylendioxy-N-Methamphetamin), umgangssprachlich als Ecstasy bekannt. Dabei hat Ecstasy den zweiten Platz unter den preferierten illegalen Drogen nach Cannabis unter Jugendlichen und jungen Erwachsenen in Deutschland erreicht [107]. Sie ist die derzeit am weitesten verbreitete synthetische Droge in Deutschland [111, 107]. Laut NIDA (*national institute for drug abuse*) stieg der Konsum von Ecstasy während der letzten Jahre immens an und verweilt aktuell auf einem gleichbleibend hohen Level [79].



**Abbildung 1.1: Altersstruktur und Geschlechtsverteilung der Konsumenten von Ecstasy (MDMA).**

In Abbildung A ist der Ecstasy Konsum in verschiedenen Altersgruppen nach einer Umfrage des NHSDA in den USA für das Jahr 2001 veranschaulicht [79]. In B ist die Verteilung der Konsumenten nach dem Geschlecht in der Altersgruppe von 12 bis 25 Jahren der gleichen Umfrage abgebildet.

Laut dem Bericht der NHSDA (*National Household Survey on Drug Abuse*) vom März 2003 lag die Mehrheit der Ecstasykonsumenten im Jahr 2001 in der Altersgruppe von 18 bis 25 Jahren (vgl. Abbildung 1.1). Mit zwei Dritteln an der Gesamtzahl der Studienteilnehmer, die zugaben 2001 Ecstasy eingenommen zu haben, war diese Altersgruppe besonders hoch vertreten. Wobei in jener Altersgruppe die männlichen Vertreter eine weitaus höhere Beteiligung aufzeigten; 8,1% gegenüber den Frauen mit 5,6 %. Dementgegen hatten im Alter von 12-17 Jahren im Jahr 2001 2,8 % der Mädchen im Vergleich zu Jungen mit 1,9 % häufiger Erfahrungen mit Ecstasy [79].

Im Zusammenhang mit einer steigenden Popularität der Droge ist zu erwähnen, dass die MDMA bedingten medizinischen Komplikationen um das 20-fache in den letzten Jahren gestiegen sind [7].

Ungeachtet der Tatsache, dass Frauen, die Ecstasy einnehmen gewöhnlich im gebärfähigen Alter sind, ist wenig über die Verbreitung des Ecstasykonsums in dieser Zielgruppe bekannt, noch über die Auswirkungen auf das ungeborene Kind und dessen Entwicklung [77]. Jedoch wird so wie die Einnahme von Ecstasy steigt, zwangsläufig auch die Zahl der Konsumentinnen steigen, welche schwanger sind [12]. Der Gruppe an Konsumenten, die vorwiegend Ecstasy (MDMA) und andere synthetische Drogen einnimmt mangelt es in der Regel nicht an sozialer Integration. Die Problem-bereiche dieser Konsumentengruppe betreffen stattdessen die Persönlichkeit, Beziehungsfähigkeit und das Selbsterleben, demnach mehr psychologische als soziale Dimensionen [111].

Die Nebenwirkungen, mit denen der Konsum von MDMA einhergeht, sind außerordentlich vielfältig und hängen von der Dosis, der Dauer der Anwendung der Droge und dem individuellen Metabolismus ab. Sie reichen von leichten körperlichen Beeinträchtigungen wie Kopfschmerzen, Schwindel, Anstieg von Puls und Blutdruck über Herzrhythmusstörungen bis hin zu komatösen Zuständen oder führen sogar zum Tod [24]. In der Literatur wird ebenso die Möglichkeit bei häufigem Konsum von MDMA ernsthafte psychische Erkrankungen zu erleiden, beschrieben, dazu zählen unter anderem Angstzustände, Schlafstörungen, Depressionen und Psychosen [34, 100]. Desweiteren existieren Studien mit der Unterstützung bildgebender Verfahren, wie dem MRT, die einen Verlust an grauer Substanz im Gehirn von MDMA Konsumenten nachgewiesen haben [23]. Im Abschnitt 1.1.5 werden Nebenwirkungen, Intoxikation und mögliche Langzeitfolgen, die Konsumenten dieser Droge riskieren einzugehen, eingehender beschrieben.

### 1.1.3 Wirkung von MDMA auf das ungeborene Kind

MDMA und seine Metaboliten sind plazentagängige Substrate [16]. MDMA greift daher wie beim Erwachsenen in vielerlei Hinsicht in die Stoffwechselforgänge des Fetus ein. Es existiert nur eine begrenzte Anzahl an Studien, die den Einfluss von MDMA während einer Schwangerschaft auf die Fehlbildungsrate des Kindes untersucht haben.

Die in einer Studie von *McElhatton et al.* beschriebenen Fallzahlen von Schwangeren, die während des ersten Trimenons der Schwangerschaft entweder Ecstasy allein oder in Kombination mit anderen Drogen konsumiert haben, sind zu gering, um einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Konsum der Droge und den Fehlbildungen bei den aus den Schwangerschaften hervorgegangenen Kindern zu beweisen. Jedoch gibt die Publikation Hinweise darauf, daß möglicherweise das Risiko von schwangeren Ecstasy-Konsumentinnen, ein Kind mit Fehlbildungen (hauptsächlich Herzfehler und Muskel-Skelett Anomalien) zu gebären, erhöht ist [33]. Es gilt zu berücksichtigen, dass Frauen, die Ecstasy konsumieren, sich in ihrem Lebensstil von der Durchschnittsbevölkerung unterscheiden, so daß man von zusätzlichen Gefahren für eine Schwangerschaft ausgehen kann: soziales Umfeld, Essverhalten, Freizeitverhalten, mögliche Dehydrierung während des Drogenkonsums, Konsum von Begleitdrogen (Alkohol, Nikotin und andere psychotrope Substanzen)

[46]. Das Risiko für ungewollte Schwangerschaften ist unter diesen Frauen besonders hoch, zumal ungeplante Schwangerschaften bezogen auf die Gesamtbevölkerung bei über 50 % liegen [46].

Die Anlage der Hirnstrukturen findet zum großen Teil am Anfang der Schwangerschaft statt. Die größte Wachstumsphase aber vollzieht das menschliche Gehirn während des letzten Trimenons der Schwangerschaft und in den ersten zwei Lebensjahren [95]. Während dieser Phase reagiert das Gehirn am empfindlichsten auf externe Noxen [29]. Der derzeitige Mangel an klinisch belegten Informationen bezüglich der transplazentaren neurotoxischen Wirkung von MDMA auf das unreife Gehirn zeigt die Notwendigkeit von Tierversuchen auf, diesen Sachverhalt ausreichend zu klären [77].

#### 1.1.4 Pharmakologie von MDMA

Um die stark variierenden Effekte dieser Droge, sowohl die vom Konsumenten gewollten, als auch ungewollte Nebenwirkungen zu verstehen, ist es hilfreich, kurz die Grundlagen der Pharmakologie, einschließlich der Pharmakokinetik und der Wirkung aufs Gehirn und anderer Organe zu erläutern. Ecstasy ist chemisch gesehen ein ring-substituiertes Amphetaminderivat (3,4-Methylenedioxy-N-methamphetamin, Strukturformel in Abbildung 1.2) [55]. Es hat jedoch zusätzlich zu den typischen Wirkungen von Amphetaminen halluzinogene Wirkungen. Strukturell ist es auch mit beidem verwandt, zum einen mit dem psychomotorischen Stimulanz Amphetamin, zum anderen mit dem Halluzinogen Meskalin [108]. MDMA ist eine lipophile Substanz und wird nach oraler Gabe gut resorbiert. Die höchsten Konzentrationen im Plasma werden nach zwei Stunden erreicht. MDMA wird hauptsächlich hepatisch metabolisiert [55]. Aufgrund der Lipophilie ist die Droge ZNS-gängig und führt zu anhaltenden Störungen der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke [90]. Sie greift ebenso wie LSD (Lysergsäurediethylamid) und Meskalin in den Serotoninstoffwechsel ein, indem es die Wiederaufnahme dessen in die präsynaptische Membran blockiert. Es führt zu einer Flussumkehr am Serotonintransporter (SERT) und führt zur Ausschüttung von Serotonin ins Zytosol [60]. Diese Entleerung der Serotoninspeicher führt zu einer Schädigung in den terminalen Enden der serotonergen Axone in multiplen Hirnregionen [81]. MDMA verursacht eine anhaltende Verminderung der vesikulären und membranösen Serotonintransporter (SERT) [116]. Desweiteren hemmt MDMA die Tryptophanhydroxylase, das limitierende Enzym der Serotoninsynthese [24]. MDMA tritt nicht direkt mit den Rezeptoren der Neurotransmitter in Wechselwirkung, sondern fördert deren Freisetzung und erhöht die Konzentration. Pharmakologisch gesehen hat MDMA eine ähnliche Wirkung auf Dopamin und Noradrenalin, allerdings mit einer weitaus geringeren Affinität [21, 24]. Eine signifikante Schädigung an dopaminergen Nervenendigungen konnte unter einer speziellen MDMA Dosierung ebenfalls beobachtet werden [93]. Im Tierversuch konnte auch ein Hinweis auf eine erhöhte Ausschüttung von Acetylcholin durch MDMA nachgewiesen werden [37]. Wiederholte Anwendungen innerhalb kurzer Zeit (Stunden-Tage) führen insofern zu einer Potenzierung der Wirkungen und Nebenwirkungen, als das MDMA seinen eigenen Metabolismus hemmt [24] und einige der Enzyme, die MDMA metabolisieren eine Sättigungskinetik

aufweisen [55]. Die Elimination der Droge aus dem Körper wird relativ langsam vollzogen. Die Halbwertszeit für MDMA im Blut liegt ungefähr bei acht Stunden. Dadurch, dass es aber ungefähr 40 Stunden dauert bis mehr als 95 % aus dem Blut entfernt wurden, lassen sich die möglichen unangenehmen Nachwirkungen erklären, die noch ein bis zwei Tage nach dem Konsum bestehen können [55].

Zusammenfassend erhöht MDMA kurzfristig die Level verschiedener Transmitter, vorwiegend von Serotonin, aber auch von Dopamin und Noradrenalin im Gehirn, indem sie die vesikulären Speicher leert, die Wiederaufnahme hemmt, eine Flussumkehr am Transporter und eine Hemmung des eigenen Metabolismus verursacht. Langfristig gesehen kommt es zu einer Umkehr dieser kurzweiligen Überflutung, nämlich zu einer Erniedrigung der Transmitterspiegel durch eine Herabregulierung der Transporter, durch eine verminderte Synthese der Transmitter und zu einer Erhöhung der Rezeptordichte, welches als Anpassung für den anhaltenden Transmittermangel interpretiert werden kann [55]. Die Wirkungen auf pharmakologischer Ebene erklären die zum Teil drastischen Nebenwirkungen der Droge, die im nachfolgenden Abschnitt ausführlicher beleuchtet werden sollen.

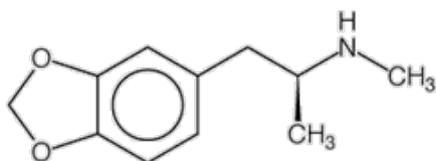


Abbildung 1.2: Strukturformel von MDMA.

### 1.1.5 Wirkungen und Gefahren von MDMA

Die im Folgenden erwähnten Wirkungen und Nebenwirkungen variieren je nach Dosis, Häufigkeit und Dauer der Anwendung der Droge. Die aufgezählten möglichen Langzeitfolgen sind daher hauptsächlich bei chronischem Gebrauch der Droge zu erwarten. Serotonin ist mehrheitlich Verursacher der psychischen Wirkungen und Nebenwirkungen von MDMA, während vorwiegend Noradrenalin für die körperlichen Effekte verantwortlich gemacht wird [55]. Die Folgen einer Intoxikation, die bei unüblich hohen Dosen oder abnorm sensiblen Individuen auftreten können, werden separat beschrieben.

#### Erwünschte Wirkungen

MDMA erhöht die Ausschüttung von Serotonin und in geringerem Maße auch von Dopamin und Noradrenalin und hemmt deren Wiederaufnahme in die Vesikel [24, 21, 115]. Diese Neurotransmitter sind verantwortlich für die sogenannten Glücksgefühle, die von den Drogenkonsumenten beschrieben werden. Einige psychische und physische Wirkungen seien an dieser Stelle erwähnt.

MDMA wirkt stimulierend auf das Zentralnervensystem ähnlich wie Amphetamin (**alpha-Methylphenethylamin**), welches gleichfalls ein indirektes Sympathomimetikum ist [25]. Die häufigsten Effekte umfassen gehobene Stimmung bis hin zu Euphorie, Glückseligkeit, Extroversion, Nähegefühl zu Anderen, gesteigerte Empathie und Geselligkeit und eine veränderte Wahrnehmung von Farben und Geräuschen [24]. Es lässt die körperlichen Leistungsgrenzen vergessen und steigert die Ausdauer. Ecstasy- und LSD-Abuser behaupten, die Selbstkontrolle sei weitgehend erhalten und die Introspektionsfähigkeit steige. In beiden Fällen handelt es sich jedoch eher um Illusionen und Fehleinschätzungen aufgrund psychotroper Wirkungen der Droge.

Die psychologischen Effekte von MDMA werden von einigen Autoren als Entactogenie (innerliche Berührung), die Empfindung, dass die Welt in Ordnung ist, und Empathogenie, d.h. das Empfinden von Nähe und das Fehlen von zwischenmenschlichen Barrieren beschrieben. Diese Wirkungen machen Ecstasy zu einer bekannten und beliebten Partydroge [111].

### **Unerwünschte Wirkungen / Nebenwirkungen**

**Körperliche Nebenwirkungen,** die akut auftreten können, sind Zittern, Schwitzen, Schwindel, Anstieg von Puls und Blutdruck, Mydriasis, Kopfschmerz, trockener Mund, Rastlosigkeit, Palpitationen, Kälteempfindlichkeit, Nystagmus, Tremor, Muskelkrämpfe und Dehydrierung bis zum Nierenversagen [24]. MDMA verringert nachweislich den Appetit [90].

Die Droge kann zu einer Steigerung der Körpertemperatur führen, die durch exzessive Bewegung und fehlende Flüssigkeitsaufnahme noch verstärkt werden kann. Durch MDMA (Ecstasy) sind bei exsikkierten bzw. hypoglykämischen Personen wiederholt Todesfälle aufgetreten. Bekannt sind ausserdem Todesfälle durch Maligne Hyperthermie induziert durch den Konsum dieses Rauschmittels [111]. MDMA ist zudem hepato-, nephro- und kardiotoxisch. Eine verstärkte Apoptose von Leberzellen konnte 72 Stunden nach Ecstasykonsum festgestellt werden [114]. MDMA greift in den Hormonhaushalt des Menschen ein, indem es akut zu einer Erhöhung der Sekretion von Cortisol, Prolaktin, ACTH, DHEA und Vasopressin (ADH) führt [24]. Serotonin ist das Amin mit der stärksten vasokonstriktorisches Potenz im Gehirn. Bei exzessiver Ausschüttung durch MDMA erhöht es die Gefahr für zerebrovaskuläre Infarkte und Hämorrhagien [96].

**Psychische Nebenwirkungen:** Zu den unerwünschten psychischen Nebenwirkungen die akut auftreten können, zählen Angst, Hyperaktivität, Schlaflosigkeit, Depersonalisation, Verwirrung und die Unfähigkeit einen Gedanken zu fixieren. Gelegentlich führen diese Symptome zu Panikattacken, Delir oder sogar psychotischen Episoden, welche gewöhnlich mit dem Fortschreiten der Elimination der Droge aus dem Körper nachlassen. Einige Menschen empfinden ein sehr starkes Vergiftungsgefühl, welches erst nach ein bis zwei Tagen nachlässt. Zu den später auftretenden Symptomen zählt Depression, Angst, Konzentrationsschwierigkeiten und Abgeschlagenheit, die denen nach Alkoholexzessen nahekommt. Trotz der erwähnten Nebenwirkungen empfindet die Mehrzahl der Konsumenten ein Überwiegen der positiven Effekte der Droge, was den anhaltend hohen Konsum der Droge erklärt [111, 55].

### Mögliche Langzeitfolgen

- Eine geringere Konzentration an grauer Substanz im Neokortex, Hirnstamm, Cerebellum und vorderem Cingulum wurde bei Langzeit-MDMA Konsumenten beschrieben, zurückzuführen auf Neurotoxizität, vaskuläre Ischämie und neurotrophe Effekte [23].
- In der Literatur wird über verschlechterte Gedächtnisleistungen und Konzentrationsschwierigkeiten bei MDMA Konsumenten berichtet. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Gedächtnisleistungen und der Menge an MDMA die konsumiert wurde existiert [89, 74].
- Eine Herabsetzung der Entscheidungsfähigkeit, Informationsverarbeitung, logischem Denken und einfachem Problemlösungsvermögen wird in mehreren Studien zum Ausdruck gebracht [113, 40, 84, 89].
- Die Gefahr der Auslösung von Psychosen und Panikattacken ist bei Ecstasy (MDMA) Konsumenten gegenüber der Normalbevölkerung erhöht [55, 15].
- Bei wiederholter Anwendung wird das Immunsystem anhaltend geschwächt [22, 24].
- Durch die Veränderungen im Serotonin-Stoffwechsel kann der Schlaf-Wach-Rhythmus erheblich gestört werden und die Konsumenten langfristig mit Schlafstörungen plagen [100].
- Durch den langfristig entstehenden Mangel an Serotonin und die Herabregulierung der Serotonintransporter können Depressionen und Stimmungsschwankungen folgen [24].
- Nach längerem Ecstasy-Missbrauch kann sich ein organisches Psychosyndrom entwickeln, das gekennzeichnet ist durch: Konzentrationsstörung, Merkstörung, Wortfindungsstörung, Depression, Antriebsstörung und motorische Unruhe [111].

**Intoxikation:** Eine Intoxikation mit MDMA kann folgendes Beschwerdebild hervorrufen: Übelkeit, Erbrechen, Schweißausbrüche, Tachykardien, kardiale Arrhythmien, Hypertension, Serotoninsyndrom, Hyperthermie, Panikattacken, Psychosen, Leberschäden, Krampfanfälle, Hyponatriämie, Koma, Nierenversagen im Zusammenhang mit einer Rhabdomyolyse und in seltenen Fällen sogar zum Tod führen [7, 24, 111].

### 1.1.6 Neurotoxizität von MDMA und resultierende kognitive Beeinträchtigungen

Über die Neurotoxizität von MDMA wurde in den letzten Jahren viel berichtet und die Forschung hat enorme Fortschritte auf diesem Gebiet geleistet. Dass hohe Dosen von MDMA eine dauerhaft neurotoxische Wirkung auf serotonerge Nervenendigungen bei Nagern und Primaten hat, ist hinreichend schon in den 80er Jahren untersucht worden [6, 80, 36]. Es existieren zudem Studien die diese durch MDMA verursachte Schädigung an serotonergen Nervenendigungen beim Menschen

in ähnlichem Ausmaß beschreiben [75]. Der Fokus der Studien, die sich mit der durch MDMA induzierten Neurotoxizität befasst haben, lag bisher auf der verursachten langfristigen Verminderung der Serotoninlevel und einer Schädigung an serotonergen Nervenendigungen. Unumstritten ist die neurotoxische Wirkung von MDMA auf serotonerge und dopaminerge Neurone mittlerweile in etlichen Studien sowohl bei Nagern, als auch bei Primaten nachgewiesen [21, 93, 59]. Ein wichtiger Mechanismus, auf den die Schädigung serotonerger terminaler Axone und eventuell auch anderer Strukturen des Gehirns, zurückzuführen ist, scheint die durch MDMA verursachte vermehrte Bildung freier Radikale [20].

MDMA verursacht Schäden auf mehreren Ebenen, sei es durch Toxizität, vaskuläre Ischämie oder neurotrophe Effekte. Im Zusammenhang mit einer langfristigen Senkung der Serotoninspiegel und den zuvor erwähnten Schäden scheinen die kognitiven Gedächtnisleistungen bei MDMA Konsumenten herabgesetzt zu sein. Von *McCann et al.* wurden 1999 in einer Studie 22 Ecstasy-Konsumenten vergleichend gegen 23 Kontrollprobanden mit einer computergestützten Testbatterie untersucht und es wurde die zerebrospinale Konzentration des Serotoninmetaboliten 5-HIAA gemessen. In Untersuchungen, die das Kurzzeitgedächtnis, die komplexe und die anhaltende Aufmerksamkeit, die visuelle Diskriminierung, sowie das Arbeitsgedächtnis prüfen, wiesen die Ecstasy-Konsumenten Defizite auf. Die Defizite des Arbeitsgedächtnisses waren direkt assoziiert mit dem Ausmaß des Ecstasy-Konsums. Die Werte des Serotoninmetaboliten 5-HIAA waren bei den Ecstasy-Konsumenten signifikant erniedrigt. Die cerebrospinalen 5-HIAA-Werte waren jedoch nicht korreliert mit den Ergebnissen der kognitiven Performance Tests [74].

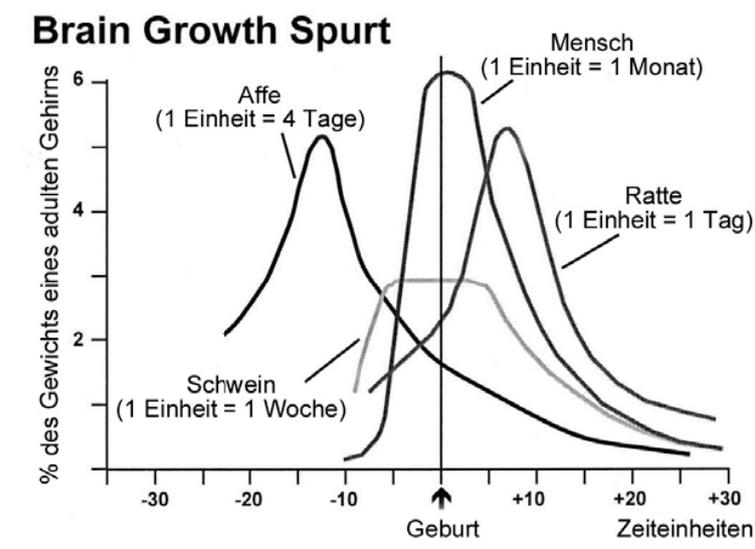
Die durch MDMA verursachte Hyperthermie spielt vermutlich zusätzlich eine entscheidende Rolle bei dessen neurotoxischer Wirkung. Arzneimittel oder kalte Umgebungstemperaturen, die eine Hyperthermie bei Versuchstieren in verschiedenen Studien verhinderten, konnten die toxischen Effekte von MDMA deutlich abschwächen [70, 38]. Unklar ist, ob die Neurotoxizität von MDMA direkt ausgeht oder von einem Metaboliten. Beide, MDMA und sein aktiver Metabolit MDA sind serotonerge Neurotoxine. Allerdings schütten sie bei direkter Applikation ins Gehirn nur Transmitter aus, wirken aber in keinsten Weise neurotoxisch auf die Neuronen. Daher ist anzunehmen, dass eine vorherige metabolische Aktivierung notwendig ist, um eine neurotoxische Wirkung zu erzielen [24]. Wenn in der Literatur die Rede von Neurotoxizität im Zusammenhang mit MDMA ist, ist vorherrschend die Zellschädigung an serotonergen Neuronen gemeint. Allerdings ist der Mangel an Serotonin nicht notwendigerweise gleichzusetzen mit einem neurotoxischen Schaden, da das Muster von Markern, die eine Neurodegeneration in Gehirnstrukturen nachweisen, nicht mit den Regionen übereinstimmen, die einen stark gesenkten Serotoninspiegel aufwiesen [7]. Als Ursachen für die Neurotoxizität von MDMA sind unter anderem oxidativer Stress, Exzitotoxizität, Hyperthermie, Apoptose und mitochondriale Dysfunktion anzusehen [90].

All diese Erkenntnisse wurden durch Untersuchungen an adulten Versuchstieren gewonnen. Es existieren kaum Studien, die die Neurotoxizität von MDMA in neonatalen Gehirnen untersucht haben. Im folgenden Abschnitt soll daher die Vulnerabilität des Gehirns in dieser Phase näher erläutert werden.

## 1.2 Die Phase des rapiden Hirnwachstums

Das Säugergehirn durchläuft im Rahmen seiner Entwicklung eine Phase des rapiden Hirnwachstums, die 1979 von *Dobbing* als „*brain growth spurt period*“ beschrieben wurde [30]. Während dieses Zeitraums spielen sich sehr viele wichtige Vorgänge im Gehirn ab: Migration und Differenzierung von Nerven- und Gliazellen und die Verknüpfung von Synapsen, bezeichnet als Synaptogenese, bei der Trillionen von synaptischen Verbindungen geknüpft werden. Gleichzeitig tritt in diesem Stadium eine vorübergehende Welle physiologischer apoptotischer Zelluntergänge von Neuronen auf [50, 82, 95].

Bezogen auf den Zeitpunkt der Geburt verläuft die Phase des rapiden Hirnwachstums bei den verschiedenen Säugerspezies zu unterschiedlichen Zeiten (vgl. Abbildung 1.3). Die rapide Hirnwachstumsphase des Menschen umfasst die Perinatalzeit, genauer genommen ab Beginn der 23. Schwangerschaftswoche bis zum Beginn des dritten Lebensjahres des Kindes. Demgegenüber verläuft der vergleichbare Zeitrahmen des größten Hirnwachstums bei der Ratte postnatal, beginnt mit der Geburt und umfasst die ersten drei Lebenswochen. Die maximale Wachstumsgeschwindigkeit liegt zwischen dem sechsten und zehnten Lebenstag [30, 95]. Um Phänomene zu modellieren, die sich im menschlichen Gehirn während der Periode des rapiden Hirnwachstums abspielen, wird die Ratte während der vergleichbaren onthogenetischen Phase als Tiermodell benutzt.



**Abbildung 1.3: Die Periode des rapiden Hirnwachstums „Brain growth spurt period“.**

Modifiziert nach *Dobbing* und *Sands* 1979 [30]. Die x-Achse zeigt das jeweilige Alter der verschiedenen Säugetiere an. Die Einheiten sind in Klammern für jede Spezies individuell angegeben. Die y-Achse ist als Gewichtszunahme in Prozent des Gewichts eines adulten Gehirns zu verstehen.

## 1.3 Programmierter Zelltod - Apoptose

Jede Zelle eines multizellulären Organismus ist Mitglied eines streng organisierten Zellverbandes. Die Gesamtzahl der Zellen ist genau reguliert. Die Balance zwischen Zellteilung und Zelltod spielt in einem adulten Organismus eine wichtige Rolle [3]. Wird eine Zelle im Laufe der Entwicklung nicht mehr benötigt, ist sie defekt, mutiert oder infiziert, so aktiviert sie ein intrazelluläres Todesprogramm und zerstört sich selbst. Dieses Phänomen beobachteten *Kerr et al.* (1972) zum erstem Mal und prägten den Begriff der „Apoptose“ als eine Form des programmierten Zelltodes [57]. Dieser ist dem Griechischen entlehnt und bezeichnet das Herabfallen der Blätter von den Bäumen [62]. Der stereotype Ablauf der Apoptose führt zum stillen „Verschwinden“ der Zelle nach Durchlaufen charakteristischer morphologischer Veränderungen ohne Beschädigung des umliegenden Gewebes durch adverse Immun- oder Entzündungsreaktionen. Wie aber wird nun das irreversible Todesprogramm gestartet und wie kommt es erstmals zur Aktivierung der Initiatorcaspasen?

Im Folgenden soll daher kurz auf die beiden klassischen Hauptwege der apoptotischen Kaskade eingegangen werden. Das für die Einleitung der Apoptose verantwortliche Signal führt, entweder von ausserhalb der Zelle über sogenannte „Todesrezeptoren“ auf der Zelloberfläche (extrinsisch) oder durch intrazelluläre Sensoren eingeleitet (intrinsisch) zur Aktivierung von Initiatorcaspasen. Der extrinsische wie auch der intrinsische Aktivierungsweg sind durch Inhibitoren und Aktivatoren feinstufig regulierte Mechanismen, die in einer gemeinsamen Endstrecke Effektorcaspasen schneiden und aktivieren [63]. Diese Kaskade wird auf mehreren Ebenen beeinflusst, so auch durch die Neurotrophine, die in Abschnitt 1.4 näher erläutert werden sollen. Apoptose scheint im Zusammenhang mit der Einnahme von MDMA ein vorherrschender Mechanismus zu sein, der einen vermehrten Nervenzelluntergang verursacht. Dafür konnten einige Studien in der Vergangenheit bereits Nachweise erbringen [77, 18, 54, 109].

### 1.3.1 Die Bedeutung der Apoptose in der Hirnentwicklung

Wie für alle Organe und Organsysteme kommt der Apoptose während der Entwicklung eine enorme Bedeutung zu, so auch dem Zentralnervensystem (ZNS). Der programmierte Zelltod stellt dabei den Mechanismus zur Elimination unbrauchbarer Neurone in der Organogenese dar. Neurone und Gliazellen werden im Überschuss produziert und im Rahmen der Hirnreifung geht ungefähr die Hälfte ihrer Ausgangszahl unter [13]. Die Apoptose hat vielfältige Funktionen für die Hirnentwicklung. Sie dient zum einen dem Erreichen optimaler Zahlenverhältnisse zwischen verschiedenen Neuronenpopulationen, Neuronen und ihren Zielzellen. Zellen mit ineffektiven oder fehlerhaften synaptischen Verbindungen werden eliminiert. Weiterhin werden überflüssige ektopische Zellen und Zellen einer früheren Entwicklungsstufe entfernt. Zum anderen spielt sie für die Morphogenese und die Plastizität eine entscheidende Rolle [13].

Die Synaptogenese ist zusammenfassend als ein Prozess der Interaktion des präsynaptischen Neurons und der entsprechenden Zielzelle zu verstehen. Der aktive Zelltod ermöglicht eine optima-

le Abstimmung zwischen diesen beiden Zellpopulationen. Die präsynaptischen Neurone konkurrieren untereinander um Wachstumsfaktoren von den Zielzellen. Schaffen sie es nicht, die Zielzellen zur Bildung von ausreichend trophischen Faktoren anzuregen, so sterben sie den programmierten Zelltod. Gleichsam ergeht es den Zielzellen, wenn sie keine ausreichende afferente Stimulation erhalten [66]. Am häufigsten sind jedoch reife Neuronen betroffen, die bereits über Verbindungen zu afferenten und efferenten Zellen verfügen [13].

### 1.3.2 Die Bedeutung der Apoptose in Bezug auf Erkrankungen

Wie zuvor schon erwähnt übernimmt die Apoptose während der Entwicklung regulative Aufgaben. So dient sie, neben der Kontrolle der Zellzahl (z.B. von Neuronen) und der Formung von Strukturen (z.B. der Finger in der Embryonalentwicklung), der Entfernung unnötiger Strukturen (z.B. Müller'sche Gänge beim Mann). Sie hat aber auch später Einfluss auf den Erhalt des Körpersystems und sorgt für die Elimination abnormer, infizierter oder schädigender Zellen (z.B. Tumorzellen) [51]. Der Umstand, dass in Folge einer gestörten Regulation der apoptotischen Signalwege zu viele oder zu wenige Zellen sterben, wird als Ursache für viele Krankheiten angesehen [45]. Eine zu hohe Apoptoserate wird beispielsweise bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn und bei den neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Multiple Sklerose beobachtet. Eine zu geringe Apoptoserate dagegen wird mit der Entstehung von kongenitalen Fehlbildungen, wie der Myelomeningozele und malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht, wie Leukämien, Lymphome und auch Karzinome. Eine mangelnde Phagozytose apoptotischer Zellen liegt bei den Autoimmunerkrankungen Lupus erythematoses und der Rheumatoiden Arthritis vor. Ein Teil dieser Erkrankungen kann bereits heute durch die gezielte Manipulation der zuvor genannten Apoptosesignalwege positiv beeinflusst werden [10, 63].

## 1.4 Neurotrophine

### 1.4.1 Die Bedeutung der Neurotrophine im sich entwickelnden Gehirn

Wachstumsfaktoren sind Polypeptide, welche an transmembranäre Rezeptoren binden und eine spezifische, intrazelluläre Antwort auslösen können. Zu dieser Familie gehören auch Nervenwachstumsfaktoren - die Neurotrophine. Sie sind für die Entwicklung, Reifung und Funktion des Zentralen Nervensystems von großer Bedeutung.

Zu den Nervenwachstumsfaktoren gehören die Neurotrophine BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), NGF (*nerve growth factor*), NT-3 (*neurotrophin 3*), NT-4 und NT-5 [5]. Diese Neurotrophine spielen eine entscheidende Rolle für das Wachstum, Überleben und die Erhaltung der Neurone im sich entwickelnden Gehirn durch Regulierung der Apoptose (vgl. Abschnitt 1.3). Sie können diverse intrazelluläre Signale aktivieren, die das Zellüberleben unterstützen. Die sich

entwickelnden Neurone brauchen die trophische Unterstützung der Wachstumsfaktoren. Daher kommt es bei einem Verlust der Neurotrophine zur Aktivierung des programmierten Zelltodes [72]. Der Begriff Neurotrophin wurde mit der Neurotrophinhypothese von *Viktor Hamburger* und *Rita Levi-Montalcini* 1952 eingeführt. Diese geht davon aus, dass unreife Neurone um limitierte, von Zielzellen dargebotene trophische Faktoren konkurrieren. Nur funktionierende Neurone mit korrekten synaptischen Verbindungen erhalten genügend Unterstützung durch diese Wachstumsfaktoren, um überleben zu können. Neurone die nicht genügend trophische Faktoren erhalten, werden durch Apoptose entfernt. So wird durch diesen kontrollierten physiologischen Zelltod erreicht, dass die überflüssigen, funktionslosen Neurone eliminiert werden, um den Ablauf im funktionierenden Gewebe nicht zu stören [66, 88].

### 1.4.2 Rezeptorbindung und Aktivierungswege der Neurotrophine

Die Neurotrophine können an membranständige Rezeptoren binden. Es existieren zwei Typen von Rezeptoren p75 Neurotrophin Rezeptor ( $p75^{NTR}$ ), ein Rezeptor der TNF-Rezeptor Familie und ligandenspezifische Rezeptoren der Tyrosinkinase-Rezeptor-Familie (TrkA, TrkB und TrkC)[5]. Der  $p75^{NTR}$  ist in der Lage alle fünf reifen Neurotrophine zu binden, allerdings ist die Affinität vergleichsweise gering. Die Rezeptoren der Trk-Familie (*trk*, *tyrosine kinase receptor*) dagegen sind affiner und binden spezifisch nur bestimmte Neurotrophine [5]. TrkA bindet nur NGF, TrkB bindet BDNF, NT-3, NT-4 und NT-5, während TrkC wiederum nur einen Wachstumsfaktor spezifisch bindet NT-3. Mit den Neurotrophinorstufen, sog. Precursorproteine oder Proneurotrophinen verhält es sich umgekehrt. Sie binden hochaffin an  $p75^{NTR}$ , aber haben kaum eine Affinität zu Trk-Rezeptoren. Auch diesen Neurotrophinprecursoren werden mittlerweile neuromodulatorische Funktionen zugeschrieben [65]. So ist z.B. ProNGF ein Ligand mit hoher Affinität für  $p75^{NTR}$  und induziert überwiegend  $p75^{NTR}$ -abhängige Apoptose in Neuronenkulturen. Die Aktivität von ProNGF am TrkA Rezeptor ist minimal und unterstützt daher nur gering die Differenzierung und das Überleben der Zellen [65]. Reife Neurotrophine binden selektiv an Trk-Rezeptoren, aber interagieren auch mit niedrigerer Affinität mit den  $p75$  Neurotrophinrezeptoren. Obwohl die Expression von  $p75^{NTR}$  die Affinität und Spezifität von Trk-Neurotrophin-Interaktionen erhöhen kann, induziert  $p75$  auch Apoptose in Oligodendrozyten, Neuronen und vaskulären Muskelzellen bei Abwesenheit oder Verminderung von Trk Rezeptoren. Der  $p75^{NTR}$  Rezeptor enthält eine Todesdomäne (*death domain*), bei deren Bindung das intrazelluläre Todesprogramm gestartet wird [64]. Die Regulierung der Apoptose durch Neurotrophine geschieht durch die Aktivierung von Proteinkinasekaskaden. Die Schlüsselemente sind zum einen Phosphoinositol-3-Kinase und Akt, zum anderen Shc und die mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK). BDNF aktiviert die extrazellulär signalregulierten Kinasen (ERK1/2) und die Phosphoinositol-3-Kinase Signalwege [19]. Die Bindung an Rezeptoren der Trk-Familie kann eine Kaskade von Kinasen auslösen, die sich anti-apoptotisch auswirkt. Zentrales Enzym dieses Mechanismus ist die, vor allem im angloamerikanischen Sprachraum, auch als „Akt“ bekannte Proteinkinase B.

Um auf die klassische Neurotrophinhypothese zurück zu kommen, wurde sie insofern ergänzt, als dass ein Neurotrophin bei der einen Neuronenpopulation Überleben fördern kann, während es bei einer anderen Neuronenpopulation Zelltod verursacht. Aufgrund dieses divergenten Verhaltens sieht man Neurotrophine heute nicht mehr nur als Neurostimulatoren an, sondern als Neuromodulatoren. Es scheinen viele Signalwege auf der Ebene der Neurotrophine zusammen zu wirken, allerdings wird ihr Zusammenspiel noch nicht vollständig verstanden [64].

### 1.4.3 Interaktionen zwischen Neurotrophinen und MDMA

Da sowohl MDMA als auch die Neurotrophine einen Einfluss auf die apoptotische Kaskade haben, wird im Folgenden deren Zusammenspiel näher betrachtet. Es existieren einige wenige Arbeiten, die diesen Aspekt genauer studiert haben.

In einer Arbeit von Mamounas konnten intracortikale Infusionen von BDNF den neurotoxischen Verlust von serotonergen Axonen durch PCA (p-Chloramphetamin) vollständig verhindern. PCA gehört ebenso wie MDMA zu den Amphetaminderivaten. NT-3 dagegen führte nur zu einer moderaten Verringerung des neurotoxischen Schadens durch PCA. In der gleichen Studie führten allein BDNF-Infusionen in den Neokortex, bei ansonsten unbehandelten Ratten zu einem Anstieg der Serotonin-Axondichte in einem Umkreis der Kanüle von 3mm. Demnach unterstützt BDNF das Sprießen von reifen unverletzten serotonergen Axonen und steigert in großem Umfang das Überleben von durch PCA geschädigten Axonen [71].

## 1.5 Herleitung einer Aufgabenstellung

In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass das unreife Gehirn in der Periode des rapiden Hirnwachstums extrem anfällig für schädigende Mechanismen ist. Es reagiert mit einem pathologisch erhöhtem Neuronenuntergang als Antwort auf verschiedene schädigende Einflüsse. In experimentellen Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass diverse Substanzen und Umstände im unreifen Gehirn der Ratte eine apoptotische Neurodegeneration verursachen können. Dazu zählen der Status epilepticus, Hypoxie/Ischämie, Schädeltrauma, Alkoholkonsum der schwangeren Mutter, Infektionen, Toxine und pharmakologische Wirkstoffe wie Narkotika, Anästhetika und Antiepileptika [49, 9, 87, 48, 47]. Diese exogenen Auslöser führen zur Neurodegeneration, die ein pathologisches Ausmaß erreichen und bleibende Schäden verursachen kann.

Aus den Untersuchungen mit diesen verschiedenen Substanzen auf das neonatale Gehirn und den daraus gewonnenen Erkenntnissen, stammt die Idee zu dieser vorliegenden Dissertation. All die zuvor erwähnten Ursachen führten zu einer Neurodegeneration im infantilen Gehirn der Ratte. Da MDMA (3,4-Methylendioxy-N-Methamphetamin, „Ecstasy“) eine nicht nur in Deutschland weit verbreitete Droge ist, entstand die Frage nach deren Wirkung auf das neonatale Gehirn bei einem Konsum während der Spätschwangerschaft, denn Ecstasy und seine Metaboliten sind plazentagängige Substanzen [16].

Um diese Frage zu beantworten wurde, mit den in Abschnitt 2 beschriebenen und etablierten Methoden, die Wirkung von MDMA in der Phase des rapiden Hirnwachstums (vgl. 1.2) am Modell der neonatalen Ratte untersucht. In der Mehrheit der vorherrschenden Studien wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen auf die neurotoxische Wirkung von MDMA auf serotonerge Nervenendigungen gelegt. Ein eher stiefmütterlich erforschter Aspekt der MDMA-Toxizität ist die Fähigkeit tatsächlich ein Absterben von Nervenzellen zu verursachen [101]. Diesem Gesichtspunkt soll in dieser Arbeit vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt werden. Zudem wurden die neurotoxischen Effekte von MDMA bisher nur ausreichend an adulten Ratten nachgewiesen. Bei einer wachsenden Befürchtung über die Risiken, die ein Ecstasy-Konsum auf das fetale unreife Gehirn haben könnte, ist die Erforschung der Auswirkungen nahezu überfällig.

Die zentrale Fragestellung ist daher zum einen, ob und in welchem Ausmaß MDMA im unreifen neonatalen Gehirn Nervenzelluntergänge hervorruft. Ist die Degeneration von Nervenzellen tatsächlich apoptotischer Natur? Interessant ist hierbei insbesondere das Zeitintervall in dem das infantile Gehirn sensibel für Störungen, die über das physiologische Maß an Apoptose hinausgehen, ist. Ab welcher Dosis ist eine signifikant vermehrte Nervenzelldegeneration nachweisbar? Zudem ist zu untersuchen, ob eine repetitive Dosis oder eine einmalige Dosis bei gleicher Gesamtdosis, stärkere neurotoxische Effekte aufzeigt. Ist die neurodegenerative Wirkung von MDMA dabei dosis-, alters- und/oder zeitabhängig? Wie groß ist das Ausmaß der Neurodegeneration auf verschiedene Regionen des neonatalen Gehirns? Welche Regionen reagieren besonders sensibel? Diese Fragen sollen mit Hilfe histologischer Untersuchungen beantwortet werden. Dabei kommen verschiedene Färbemethoden zum Einsatz und deren Ergebnisse sollen verglichen werden.

Zum anderen soll im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit das Zusammenspiel und die Regulationsmechanismen zwischen MDMA und den Neurotrophinen im Gehirn auf molekularbiologischer Ebene beleuchtet werden. Welche Auswirkung hat MDMA auf die Expression von Nervenwachstumsfaktoren? Im Mittelpunkt der Untersuchungen steht BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), als ein Vertreter dieser Nervenwachstumsfaktoren. Ist die Regulation von BDNF zeit- und dosisabhängig? Zum Vergleich sollen auch die Transkriptionsraten in verschiedenen Zeitintervallen zweier anderer Neurotrophine, NT-3 und NGF mit untersucht werden. In welchem Ausmaß und in welchem Zeitintervall verändern sich die Transkriptionsraten für BDNF, NT-3 und NGF? Und wie verändert sich die tatsächliche Menge an BDNF als synthetisiertes Protein nach Applikation von MDMA? Bei diesem zweiten Teil der Aufgabenstellung sollen molekularbiologische Verfahren wie PCR und Western Blot zum Einsatz kommen. Um herauszufinden, ob BDNF eine neuroprotektive Funktion in diesem Zusammenhang besitzt, soll abschließend die Wirkung von MDMA auf BDNF-Knockout-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp untersucht werden. Darüber hinaus werden zusätzlich die Daten des Körpergewichtes und der Sterblichkeit der Versuchstiere vermerkt und ausgewertet, da in der Literatur eine appetitzügelnde Wirkung von MDMA und eine erhöhte Mortalitätsrate häufiger Erwähnung finden. Als Modell wird die neonatale Ratte verwendet. Günstig hierbei ist, dass bei Versuchen mit neonatalen Ratten eine exakte Dosis appliziert werden kann. Dementsprechend können direkte dosisbezogene Rückschlüsse auf die neurodegenerative Wirkung von MDMA gezogen werden. Bei einer Verabreichung bei schwangeren Tieren wäre dies nicht gegeben. Abgesehen davon eignet sich die Ratte gerade in dieser Fragestellung besonders als Tiermodell, da sie die Phase des größten Hirnwachstums postnatal vollzieht, während beim Menschen im letzten Trimenon der Schwangerschaft bis zum 3. Lebensjahr das stärkste Hirnwachstum stattfindet [30], (vgl. Abschnitt 1.2).



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Histologie

#### 2.1.1 Tierversuche, Tierschutzrichtlinien und Versuchsplan

Als Versuchstiere dienten Han Wistar Ratten, die von den tierexperimentellen Einrichtungen der Charité geliefert wurden. Die Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien zu Tierversuchen (§ 8 des Tierschutzgesetzes) durchgeführt und von der zuständigen Behörde, dem Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt (Tierversuchsantrag mit der Nummer: 0144/04). Die Haltung und Pflege erfolgte nach standardisierten Bedingungen durch qualifiziertes Personal und unter Aufsicht des Tierschutzbeauftragten. Ein Tag-Nacht-Rhythmus war durch automatische Lichtschaltuhren gegeben.

Eine Übersicht über die geplanten histologischen Versuche dieser Arbeit liefert Tabelle 2.1. Für diesen Zweck wurden hauptsächlich sieben Tage alte Ratten und zusätzlich für eine Studie zur Altersabhängigkeit auch drei, vierzehn und einundzwanzig Tage alte Ratten verwendet. Der Tag der Geburt wurde als P0 deklariert. Pro Versuch wurden die Jungtiere einer Mutter aus einem Wurf verwendet. Um statistisch aussagekräftige Endwerte zu erheben, lag die Anzahl der Ratten in den Versuchsgruppen möglichst bei acht bis zehn Tieren. Die Einteilung der Jungtiere erfolgte blind zum einen in Versuchs- und zum anderen in Kontrolltiere, welche entsprechend mit Zahlen markiert wurden. Die Versuchs- und Kontrolltiere lebten zu jeder Zeit unter den gleichen Bedingungen und waren gleichfalls Wurfgeschwister. Die Injektion der Kontrollsubstanz und der MDMA-Lösung erfolgte intraperitoneal. Aus der Reinsubstanz MDMA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurde mit isotoner Kochsalzlösung jeweils vor Versuchsbeginn eine frische Lösung hergestellt. Als Standarddosis wurde 60 mg MDMA pro kg Körpergewicht (KG) verwendet und für eine Studie zur Dosisabhängigkeit auch 20, 3 x 20 (aller 8 Stunden) und 40 mg. Die Überlebenszeiten lagen bei 24 Stunden, 7 und 14 Tagen (vgl. Tabelle 2.1). Für die Verwendung von MDMA zu Tierversuchszwecken war eine Genehmigung vom BfArM (Bundesinstitut für Arzneimittelsicherheit und Medizinprodukte, Bonn) einzuholen, da der Erwerb, Besitz und Handel von MDMA nach Strafbestimmung des Betäubungsmittelgesetzes (BtMG) verboten ist. Die Tiere der Kontrollgruppen bekamen isotonische Kochsalzlösung (Natriumchlorid 0,9 %ig *per injectionem*, Braun, Ingelheim, Deutschland). Nach vorherigem Wiegen bekamen die Jungtiere je nach Gewicht, eine Kontroll- bzw. MDMA-Lösung von 0,1 ml pro 10 g Körpergewicht intraperitoneal gespritzt. Das Gewicht wurde zur statistischen Analyse jeweils vor der Injektion und der Perfusion notiert. Nach der Injek-

tion wurden die Jungtiere auf einer Wärmeplatte bei 37,5 °C beobachtet und nach maximal einer Stunde zur Mutter zurückgegeben, um den Stress so gering wie möglich zu halten.

Versuchsgruppe	NaCl 0,9%ig (ml/10g KG)	MDMA (mg/kg KG)	Alter/ Injektionstag	Überlebenszeit
1	0,1	20 40 60 3x20 (aller 8 h)	P7	24 h
2	0,1	60	P3 P7 P14 P21	24 h
3	0,1	60	P7	7 d 14 d

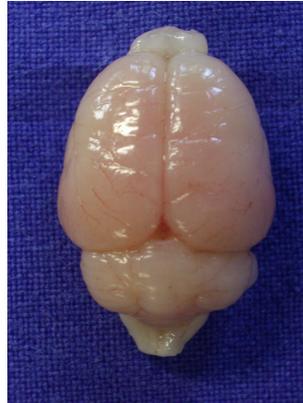
**Tabelle 2.1: Versuchsplan Histologie**

## 2.1.2 Perfusion, Präparation

Die Versuchstiere wurden 24 Stunden nach der ersten MDMA-Injektion mit einer Überdosis Chlortalhydrat 10 % (0,1 ml/10 g KG, Braun) getötet, bei Versuchsgruppe 3 auch nach 7 und 14 Tagen Überlebenszeit. Nach Arretierung der Tiere und Eröffnung des Thorax erfolgte eine Inzision in den rechten Herzvorhof, um einen Abfluß der folgenden Infusion zu gewährleisten. Ein weiterer Schnitt wurde in die linke Herzkammer an der Herzspitze gesetzt und über diesen eine Butterflykanüle in die Aorta vorgeschoben und festgeklemmt. Die Perfusion des Blutes aus den Gefäßen erfolgte mit 20 ml 4 °C kaltem heparinisiertem PBS (Thrombophob 25.000, Heparin-Natrium, Nordmark Arzneimittel GmbH 2082 Ueterson; phosphate buffered saline, 10-fach-Konzentrat: 70 ml monobasisches 1 M Na-Phosphat, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Sigma S-9638; 330ml dibasisches 1 M Na-Phosphat, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Sigma S-0876 St. Louis, USA und 180 g NaCl, Merck, Darmstadt, Deutschland) als Bolus. Um eine ausreichende Fixierung der Gewebe zu gewährleisten, schloss sich eine Tropfinfusion für mindestens 10 Minuten mit gekühltem 4 %igem Paraformaldehyd mit 2 %igem Cacodylatpuffer (2 l 10 %ige Stammlösung: 100 g Paraformaldehyd [Merck] in 800 ml 60 °C erhitztem Aqua bidest mit 2 Pellets NaOH [Merck] gelöst, abgekühlt, auf pH 7,5 titriert, auf 1 l aufgefüllt; für eine 4 %ige Lösung 800 ml der Stammlösung mit 18 g NaCl und 2 g Natrium-Cacodylat [Sigma] versetzt und auf 2 Liter aufgefüllt; pH=7,4) an.

Die Präparation der Gehirne begann mit der Abtrennung des Kopfes vom Rumpf. Es folgte ein Schnitt durch die Kalotte entlang der Sagittalnaht und einem weiteren orthogonal. Die Ablösung der Kalottenstücke erfolgte mit einer Pinzette und das Herauslösen des Gehirns mit einem Spatel (vgl. Abbildung 2.1). Danach wurden die Gehirne für 2-4 Tage in 4 %igem Paraformaldehyd (mit 2

%igem Cacodylatpuffer) fixiert und gelagert. Der anschließende Grobschnitt mit einer Rasierklinge teilte die Gehirne koronal in zwei Hälften unter Ausschluss des Kleinhirns und des Riechhirns. Anschließend lagerten sie nochmals 2-3 Tage in Paraformaldehyd zur Fixation und Festigung des Gewebes.



**Abbildung 2.1: Rattengehirn nach vorsichtiger Präparation aus dem Schädel.**

### **2.1.3 Einbettung, Schnitt**

Die Grobschnitte wurden in PBS mit Azid (100 ml des Zehnfach-Konzentrates mit 0,05 % Na-Azid  $\text{NaN}_3$ , Sigma S-8032; ad 1 l) überführt und gleich darauf in angefrorene Petrischalen in Agar (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, Pennsylvania, USA) eingebettet. Nach Erhärtung konnten rechteckige Agar-Blöcke, die die Hirnhälften enthielten, ausgeschnitten werden. Diese wurden nach Aufkleben auf den Präparierteller am Rotationsvibrator (Leica, VT 1000 S, Nussloch, Deutschland) koronal in  $70\ \mu\text{m}$  dünne Scheiben geschnitten. Bei den 7 Tage alten Ratten wurde jeder fünfte, bei den 14 und 21 Tage alten Ratten jeder siebente Schnitt für die Silberfärbung (vgl. 2.1.4) ausgewählt und in Zellkulturplatten (24-well-Platten; Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA), die mit 4 %iger Paraformaldehydlösung in Cacodylatpuffer gefüllt waren, überführt. Nach dem Schneiden lagerten sie nochmals bis zur Färbung, mindestens aber zwei Tage, in Paraformaldehyd und konnten dann nach dem DeOlmos-Protokoll gefärbt werden. Pro Tier ergaben sich zehn bis zwölf Hirnschnitte für die Färbung. Die restlichen Schnitte wurden in PBS-Azid bei  $4\ ^\circ\text{C}$  gelagert.

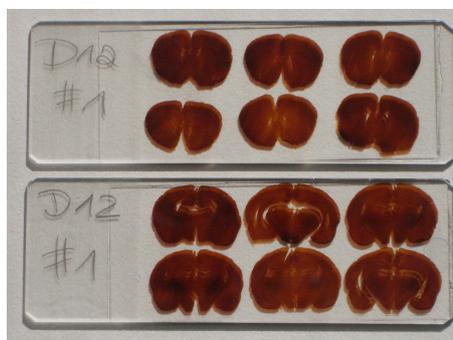
### **2.1.4 DeOlmos Kupfer-Silberfärbung**

Die Färbung begann mit der Überführung der Hirnschnitte in Petrischalen und dreimaligem Waschen in Aqua bidest, woraufhin eine Inkubation mit einer auf  $40\ ^\circ\text{C}$  erhitzten Silberlösung stattfand. Diese Silberlösung setzte sich aus 180 ml auf  $40\ ^\circ\text{C}$  erwärmtem Aqua bidest mit 1,5 g Silbernitrat  $\text{AgNO}_3$  (Roth 9370.3, Karlsruhe, Deutschland), 3 ml 0,5 %iges Kupfernitratt  $\text{CuNO}_3$  (Sigma P-3776), 15 ml 0,1 %ige Allantoinlösung (Sigma A-7878), 9 ml Boratpuffer (ICN Biomedicals

Inc., Ohio, USA), 17 ml Ethanol absolut (Baker 8006, Deventer, Holland) und 9 ml Pyridin (Sigma P-3776) zusammen. Nach einstündiger Inkubation bei 40 °C im Wärmeschrank blieben die Schnitte für weitere 48 bis 72 Stunden bei Raumtemperatur in dieser Lösung bis sie goldbraun leuchteten.

Nach der Spülung der Hirnschnitte mit reinem Aceton (Baker 8002) erfolgte die Inkubation mit einer Silber-Diamin-Lösung für 35 Minuten, die sich wie folgt zusammensetzte: 24 g Silbernitrat  $\text{AgNO}_3$ , 120 ml Aqua bidest, 60 ml 0,4 %ige Natronlauge  $\text{NaOH}$  und 30 ml Ammoniumhydroxid ( $\text{NH}_4\text{OH}$ , Sigma A-6899). Unter Agitation wurden die Schnitte in einer ethanolischen Lösung von Formaldehyd und Zitronensäure reduziert: 135 ml Aqua bidest, 15 ml Ethanol absolut, 180  $\mu\text{l}$  37 %ige Formaldehydlösung (Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland) und 10,5 mg Zitronensäure (Sigma C-0759). Während dieses Vorgangs färbten sich die Schnitte dunkelbraun. Nach zweimaligem Waschen der Präparate wurden diese in 0,3 %iger Kaliumferrizyanidlösung (0,45 g  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , Sigma P-8131, gelöst in 150 ml Aqua bidest) gebleicht, bis sie bernsteinfarben waren. Nach nochmaligem zweifachen Spülen der Schnitte folgte die Stabilisierung des Färbeergebnisses über exakt eine Minute mit 0,1 %iger Natriumthiosulfatlösung (0,2 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , Sigma S-7026, in 200 ml Aqua bidest). Der Abschluss des Färbevorgangs bildete erneut ein dreifacher Waschvorgang in Aqua bidest, um die Präparate von den Färbelösungsrückständen zu reinigen und ein Fortschreiten der Färbung zu verhindern. Die Überführung der dünnen Schnitte auf Objektträger gelang unter Zuhilfenahme eines Gelatine-Mediums: 1,5 g Gelatine (Electron Microscopy Sciences) in 250 ml Aqua bidest auf 50 °C erhitzt, abgekühlt, mit 0,15 g Kalium-Chrom-Sulfat (Sigma P-8131) versetzt und auf 500 ml aufgefüllt. Die Objektträger wurden zum Trocknen unter einen staubfreien Abzug gelegt.

Als nächster Schritt schloss sich die Dehydratation der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe an. Danach konnten die Präparate mit Hilfe von Permount Mounting medium (Electron Microscopy Sciences) mit Deckgläsern (Menzel, Microm, Walldorf, Deutschland) versehen und so langfristig haltbar gemacht werden (vgl. Abbildung 2.2).



**Abbildung 2.2: Nach DeOlmos gefärbte Hirnschnitte auf gedeckelten Objektträgern.** Der Objektträger oben zeigt Hirnschnitte aus dem vorderen Bereich des Gehirns, der untere Objektträger zeigt Schnitte aus der hinteren Hirnhälfte eines 14 Tage alten Versuchstieres.

### 2.1.5 TUNEL-Färbung

Nach der Injektion und Perfusion der Versuchstiere mussten die Gehirne für die TUNEL-Färbung nicht in Agar, sondern in Paraffin eingebettet, am Rotationsmikrotom (Mikrom HM 360 Ser.-Nr. 9709, Walldorf, Deutschland) in 10  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte geschnitten und auf mit 3-Aminopropyltriethoxysilan beschichtete Objektträger (Super Frost Plus, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgebracht werden. Nach Deparaffinisierung in Xylol und Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe wurden die Schnitte mit einer Reaktionslösung nach Angaben des Herstellers inkubiert (Calbiochem, TdT-FragEL<sup>TM</sup> DNA Fragmentation Detection Kit, Cat# QIA33, San Diego, CA, USA). Diese Reaktionslösung enthält das TdT-Enzym (*terminal deoxynucleotidyl transferase*), welches die freien 3'-OH Enden der DNA-Moleküle markiert. Da apoptotische Zellen eine große Anzahl an DNA mit freien 3'-OH Enden aufweisen, verbindet sich die Transferase vorzugsweise mit diesen Zellen. Die Reaktionslösung enthält dUTP, das durch das TdT-Enzym an die freien 3'-OH Enden der DNA-Strangbrüche gebunden wird. Die derart markierten Strangbrüchenden wurden mit Anti-Dioxigenin-Peroxidase inkubiert, die bei der Reaktion mit dem Substrat DAB (3,3'-Diaminobenzidine) eine Farbänderung anzeigt. Die Schnitte wurden im Lichtmikroskop ausgewertet und die degenerierten Zellen ausgezählt. Die TUNEL-positiven Zellen erschienen dunkelbraun, das Zytoplasma wurde mit Methylgrün gegengefärbt.

### 2.1.6 Fluoro-Jade B Färbung

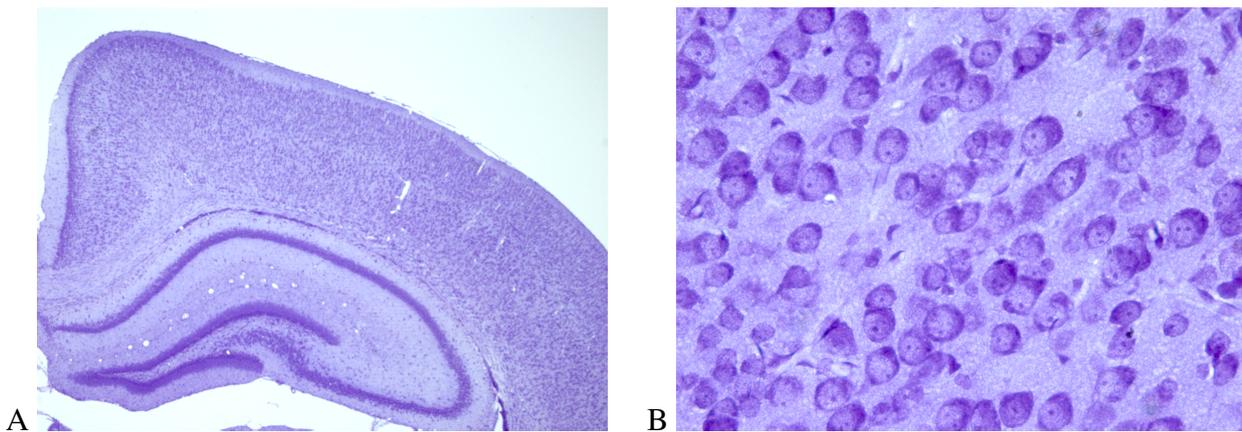
Für die Färbung mit Fluoro-Jade wurden die Hirnschnitte ebenso wie in Abschnitt 2.1.5 beschrieben aufgearbeitet. Anschließend wurden die 10  $\mu\text{m}$  dicken Paraffin-Schnitte für 15 min unter Agitation bei Raumtemperatur in einer Kaliumpermanganat-Lösung inkubiert. Nach dem Waschen in destilliertem Wasser wurden die Gewebeschnitte für 30 min ebenfalls unter Agitation bei Raumtemperatur in einer Fluoro-Jade-Gebrauchslösung (Fluoro-Jade B, Histochem, Jefferson, Arkansas, USA) inkubiert. Währenddessen war jegliche Lichteinwirkung zu vermeiden, bzw. auf ein Minimum zu reduzieren. Nach erneutem Waschen in Aqua bidest wurden die Schnitte getrocknet, mit einem Deckgläschen versehen und bis zur Analyse bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Herstellung der fertigen Gebrauchslösung erfolgte lichtgeschützt aus 8 ml Stammlösung (10 mg Fluoro-Jade in 100 ml Aqua bidest gelöst) und der Zugabe von 192 ml 0,1 %iger Essigsäure. Anschließend wurden die degenerierten Neurone unter einem Fluoreszenzmikroskop im Dunkeln bei einer Extinktion von 450-490 nm und einer Emission von 515-565 nm, ausgezählt und die gefärbten Hirnschnitte photodokumentiert [103]. Die Schnitte wurden ebenso wie die der anderen Färbungen (vgl. 2.1.8) ausgewertet.

### 2.1.7 Cresylviolett-Färbung zur Zelldichtebestimmung

Bei den Versuchstieren, die eine längere Überlebenszeit als 24 Stunden hatten, wie in Versuchsgruppe 3 (vgl. Tabelle 2.1), erwies sich die Cresylviolett-Färbung als geeignete Methode. Die-

se Methode wird benutzt, um die Nissl-Substanz im Zytoplasma von Neuronen zu färben. Nissl ist eine von Zytologen verwendete Bezeichnung für das Endoplasmatische Retikulum (ER). Die Cresylviolett-Färbung färbt die Zellkörper dabei violett-blau (vgl. Abbildung 2.3). Anders als bei der DeOlmos Färbung wurden hier nur die sechs folgenden Hirnregionen ausgezählt und zu einem Gesamtscore summiert: der frontale und parietale Cortex (Lamina 2), der Nucleus caudatus (mediodorsal), der laterodorsale und ventrale Teil des Thalamus und das Subiculum.

Auch für diese Färbemethode erfolgte die Einbettung in Paraffin, wie zuvor bei der TUNEL-Färbung (vgl. 2.1.5) beschrieben. Der erste Schritt der Cresylviolett-Färbung war wiederum die Entparaffinierung in Xylol und Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe. Cresylviolett (Sigma-Aldrich) gelöst in Aqua bidest färbte die Hirnschnitte in fünf bis zehn Minuten ausreichend an. Die Herstellung der Cresylviolett-Lösung erfolgte mit 1,25 g Cresylviolett in 250 ml erwärmtem destilliertem Wasser. Daraufhin wurden die Schnitte mit Aqua bidest gewaschen und es schloss sich die Dehydratation der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe an. Danach konnten die Präparate mit Hilfe von Permount Mounting medium (Electron Microscopy Sciences) mit Deckgläsern (Menzel, Microm) versehen und ausgewertet werden.



**Abbildung 2.3: Hirnschnittpräparate 14 Tage alter Ratten mit Cresylviolett gefärbt.**

Abbildung A zeigt im oberen Teil den Cortex und im unteren Teil den Hippocampus in 2,5-facher Vergrößerung. Auf Abbildung B ist ein Ausschnitt des Hippocampus bei 40-facher Vergrößerung zu sehen, hier sind Zellen aus dem Subiculum abgebildet. Gezählt wurden die violett gefärbten Nervenzellen, welche noch intakt erschienen. Zellfragmente wurden bei der Auswertung nach der quantitativen Dissektionsmethode nicht mit erfasst.

### 2.1.8 Morphometrie und Lichtmikroskopie

Eine quantitative Erfassung und vergleichende Analyse des Ausmaßes der Neurodegeneration ist unerlässlich, um eine vermehrte Zelldegeneration nach Verabreichung von chemischen Substanzen oder Medikamenten im Vergleich zu den Kontrolllösungen nachzuweisen. Diese Untersuchungen zur Dichtebestimmung der degenerierten Neurone erfolgten mittels der stereologischen Dissektionsmethode (*unbiased stereological dissector method*) nach *Gundersen et al.* [42]. Die Bestimmung der Dichte wurde an den nach der Methode von *DeOlmos*, TUNEL, Fluoro-Jade B und

Cresylviolett gefärbten Hirnschnitten durchgeführt.

Zum Mikroskopieren und Auszählen der Hirnschnitte diente ein Lichtmikroskop (BX60 F-3 Olympus, Japan) mit integriertem Zählgitter im Okular. Der Zählrahmen hatte die Maße 0,05 x 0,05 mm bei einer Dissektorhöhe (Dicke der Schnitte) von 0,07 mm.

Das Zählen der angefärbten Neurone in diesem vorgegebenen Raster ermöglichte unter Berücksichtigung der Dicke der Schnitte und des Vergrößerungsfaktors die Berechnung der Zellzahl in diesem Volumen. Alle Neurone, die auf dem linken und unteren Rand des Rasters lagen, entfielen bei der Auszählung. Pro auszuwertender Region wurden zufällig acht bis zehn Felder ausgewählt, dort die degenerierten Neurone ausgezählt und somit pro Region der Mittelwert der Anzahl dieser Neuronen pro  $\text{mm}^3$  errechnet. Durch Addition der Dichten der einzelnen Gehirnbereiche wurde ein Summenscore für jedes Gehirn ermittelt, anhand dessen die Versuchs- und Kontrolltiere verglichen werden konnten. Die Auswertung der Präparate fand blind statt und wurde durch erfahrene Untersucher kontrolliert. Die Hirnareale wurden anhand von Atlanten des sich entwickelnden Gehirns der Ratte identifiziert [104, 110].

Im Einzelnen wurden folgende 17 Hirnregionen ausgewertet:

- frontaler Cortex (Lamina 2 und 4)
- parietaler Cortex (Lamina 2 und 4)
- cingulärer Cortex (Lamina 2 und 4)
- retrosplenialer Cortex (Lamina 2 und 4)
- Nucleus caudatus (mediodorsal)
- Septum
- laterodorsaler, mediodorsaler und ventraler Teil des Thalamus
- Hypothalamus ventromedialis
- Subiculum (Hippocampus)
- Gyrus dentatus (Hippocampus)
- CA1-Region (Cornu ammonis, Hippocampus)

### 2.1.9 Statistische Methoden

Aus den Dichten der degenerierten Zellen der jeweiligen Hirnregionen der Versuchsgruppen wurde der arithmetische Mittelwert ( $M = \text{mean}$ ) und der Standardfehler ( $\text{SEM} = \text{standard error of the mean}$ ) errechnet. Die Dichte der degenerierten Zellen konnte somit für die jeweiligen Gehirnregionen der Versuchsgruppen auf signifikante Verteilungsunterschiede hin verglichen werden. Um das

gesamte Ausmaß der Neurodegeneration in den einzelnen Versuchsgruppen vergleichen zu können, wurde ein kumulativer Wert aus der Summe der Dichtewerte aller Hirnregionen eines Versuchstieres gebildet und so für jede Versuchsgruppe ( $M \pm \text{SEM}$ ) der Summenscore errechnet. Die Abweichungen der Mittelwerte wurden mit dem Student's t-Test für unabhängige Stichproben bei Normalverteilung auf Signifikanz überprüft. Als Signifikanzniveau wurde  $*p < 0,05$  angenommen. Die Angaben der Ergebnisse wurden als  $M \pm \text{SEM}$  präsentiert. GraphPad Prism™ (GraphPad Software, San Diego, USA, Version 4.0) diente als Statistikprogramm und zur grafischen Darstellung der Ergebnisse. Die Säulendiagramme zeigen die Mittelwerte der Versuchsgruppen mit dem dazugehörigen Standardfehler. Die Berechnung der Mittelwerte und Standardfehler erfolgte mit Microsoft Excel®.

## 2.2 Transkriptionsanalyse mittels semiquantitativer PCR

### 2.2.1 Tierversuche und Versuchsplan

Für die molekularbiologischen Versuche bekamen Han Wistar Ratten im Alter von sieben Tagen 20 mg/kg KG und eine zweite Versuchsgruppe 60 mg/kg KG MDMA intraperitoneal injiziert. Die Kontrollgruppe dagegen erhielt intraperitoneal isotone Kochsalzlösung (Natriumchlorid 0,9 %ig) appliziert. Die Haltung der Jungtiere erfolgte gleichfalls nach oben erwähnten Richtlinien zum Tierschutz (vgl. Abschnitt 2.1.1) und sie wurden ebenso schnellstmöglichst nach den Injektionen zu ihrer Mutter zurückgegeben, um den Stressfaktor so gering wie möglich zu halten.

Versuchsgruppe	NaCl 0,9 %ig (ml/10g KG)	MDMA (mg/kg KG)	Alter/ Injektionstag	Über- lebenszeit
4	0,1	20	P7	2 h 6 h 12 h 24 h 48 h
5	0,1	60	P7	2 h 6 h 12 h 24 h 48 h 72 h

Tabelle 2.2: Versuchsplan Molekularbiologie

### 2.2.2 Präparation der Gehirne

Die Tiere wurden nach zuvor festgelegter Überlebenszeit (vgl. Tabelle 2.2) durch Dekapitation getötet. Die bei den Jungtieren noch weiche Schädeldecke wurde mit einer Schere eröffnet und das freiliegende Gehirn vorsichtig mit einem Spatel von der Schädelbasis abgelöst. Unter Zuhilfenahme einer Rasierklinge wurden folgende Hirnregionen freipräpariert: retrosplenialer, cingulärer, frontaler und parietaler Kortex, Striatum, Hippocampus, Thalamus und Cerebellum. Bis auf Letzteres wurden die Hirnanteile nach rechter und linker Hemisphäre getrennt, sofort in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und dann bei -80 °C bis zur weiteren Aufbereitung gelagert.

### 2.2.3 RNA-Extraktion

Die Isolation der RNA aus dem Gewebe der bei -80 °C gelagerten Proben erfolgte mit dem RNA-Clean<sup>TM</sup>-Reagenz (Hybaid, Heidelberg, Deutschland). Pro 100 mg tiefgefrorenem Gewe-

be wurde 2,0 ml RNA-Clean<sup>TM</sup>-Lösung zugefügt und durch mehrmaliges Pipettieren der Probe und anschließendes Vortexen eine homogene Mischung der Gehirnproben erreicht. Durch Hinzugabe von 1/10 Volumina Chloroform (Baker), bezogen auf das Volumen der eingesetzten RNA-Clean<sup>TM</sup>-Lösung wurde die RNA-Extraktion begonnen. Die weitere Aufarbeitung des Gewebes erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Für die Zwischenschritte wurde zusätzlich Isopropanol (Merck) benötigt. Die Zentrifugationen wurden bei 12.000 g durchgeführt. Bei dem letzten Zentrifugationsschritt entstand das RNA-Pellet. Danach wurde das Pellet zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und nochmals nach jedem Waschschrift bei 12.000 g für zehn Minuten zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet in 50 µl RNase freiem Wasser gelöst und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren.

## 2.2.4 RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration und Überprüfung der Reinheit der Präparation wurde die Absorption der Proben mit einem Spektralphotometer (Gene Quant II, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) bestimmt. Die Reinheit der RNA-Proben lässt sich durch die Bestimmung der Extinktionen bei 260 und 280 nm ermitteln. RNA hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm, Proteine dagegen bei 280 nm. Der Quotient aus Extinktion  $E_{260}:E_{280}$  ist ein Maß für die Reinheit der Präparation und sollte in der Größenordnung zwischen 1,6 und 2,0 liegen. Liegt der Wert darunter, handelt es sich wahrscheinlich um Verunreinigungen mit Proteinen, genomischer DNA und/oder aromatischen Substanzen (z.B. Phenolen aus der Waschphase der RNA-Extraktion). In diesem Fall sollte die RNA erneut gereinigt werden. Die RNA-Konzentration lässt sich ebenso photometrisch bestimmen. Da eine OD (Optische Dichte) von 1 bei 260 nm einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht, lässt sich die RNA-Konzentration wie folgt berechnen:  $O.D.[E_{260}] \times V \times F = c$ ; Extinktion bei 260 nm x Verdünnungsfaktor x 40 µg/ml (RNA-Faktor) = Konzentration [µg/ml].

## 2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Überprüfung der Integrität und der Kontaminationsfreiheit der RNA erfolgte mit einer Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurde ein 1%iges Agarosegel hergestellt und die Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer; pH 7,7; aufgefüllt. Das zehnfache Konzentrat setzte sich wie folgt zusammen: 1 mM EDTA; 2,3% Eisessig und 0,5 M Tris. Von der RNA wurden mindestens 500 ng auf ein Endvolumen von 9 µl verdünnt und zusätzlich mit 1 µl Probenpuffer (0,1% Bromphenolblau, 10 mM EDTA pH 8,0; 60% Glycerin; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1% Xylencyanol) versehen. Bromphenolblau ist ein Farbstoff, um den Fortschritt der Elektrophorese abschätzen zu können. Ein Marker (phiX 174 DNA/Hae III, Promega, Mannheim, Deutschland) in Form von einer sogenannten DNA-Leiter dient der Größenbestimmung und groben Quantifizierung der DNA-Stränge. Davon werden 9 µl mit 1 µl Probenpuffer versehen. Die Proben wurden kurz vor Beginn bei 70 °C für zehn Minuten erhitzt, um Sekundärstrukturen zu vermeiden und dann auf Eis gestellt. Nachdem

die Proben in die Taschen pipettiert wurden, konnten sie bei einer Spannung von 50 V für zehn Minuten konzentriert werden. Um eine adäquate Trennung zu erreichen, wurde für 30 Minuten eine Spannung von 80 V angelegt. Zum Sichtbarmachen der Banden wurde das Gel in einer 0,00001 Ethidiumbromid-Lösung (Fluka, Buchs, Schweiz) für 30 Minuten inkubiert. Ethidiumbromid interkaliert als organischer Fluoreszenzfarbstoff in Nukleinsäuren. Es fluoresziert im ultravioletten Licht und so konnte das Gel unter einer UV-Lampe betrachtet werden.

### 2.2.6 Reverse Transkription der RNA

Mit der im Folgenden beschriebenen semiquantitativen PCR kann die Genexpression auf mRNA-Ebene analysiert werden. Da die Taq DNA-Polymerase einzelsträngige RNA nicht als Matrize in der PCR nutzen kann, muss diese zunächst in cDNA umgeschrieben werden. In der Reversen Transkription wird mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase, zur Ausgangs-RNA ein komplementärer DNA-Strang (cDNA) synthetisiert. Diese einzelsträngige cDNA wird durch die Taq DNA-Polymerase zum Doppelstrang vervollständigt und dieser in der PCR amplifiziert.

Zu Beginn wurden von jeder Probe 500 ng Gesamt-RNA mit 1  $\mu\text{l}$  Oligo-d(T) Primer (50  $\mu\text{M}$  Promega, Mannheim, Deutschland) versetzt und mit PCR-Wasser auf 13,5  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Jede Probe wurde gemischt, für zehn Minuten bei 70 °C inkubiert und danach auf Eis gekühlt. Das Umschreiben der RNA erfolgte nun mit Hilfe einer MMLV-Reversen-Transkriptase (Promega), eine veränderte Enzymvariante aus einem Retrovirus (*Moloney Murine Leukemia Virus*). Davon wurden 1  $\mu\text{l}$  mit 0,5  $\mu\text{l}$  RNasin (Ribonuklease Inhibitor, Promega); 5  $\mu\text{l}$  dNTP's (2 mM) und 5  $\mu\text{l}$  5x RT-Puffer (Promega) gemischt. Die reverse Transkription erfolgte bei 42 °C für eine Stunde. Danach wurde das Enzym für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert.

### 2.2.7 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der PCR (*polymerase chain reaction*) wurde im Jahre 1983 von *Kary B. Mullis* entwickelt [97]. Aufgrund dieser Methode ist es möglich, ausgewählte Nukleotidsequenzen in vitro millionenfach zu amplifizieren. Dadurch können auch geringe Mengen an DNA einer Analyse schnell zugänglich gemacht werden. Die zuvor durch reverse Transkription gewonnene cDNA konnte nun als Vorlage dienen, um entsprechende Abschnitte zu vervielfältigen. Bei der PCR wurden zwei Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, die homolog zu den beiden Enden der Zielsequenz waren und sich während der PCR an die cDNA anlagerten (vgl. Tabelle 2.3). Die cDNA wurde in 30 Zyklen amplifiziert. Jeder Zyklus bestand aus:

1. der Denaturierung der doppelsträngigen DNA über 45 Sekunden bei 94 °C,
2. dem Anlagern der Primer an die einzelsträngige Matrizen-DNA in der Annealingphase für eine Minute bei 60 °C und

3. der Synthese während der Elongation vom 3'-Ende der Primer ausgehend eines neuen DNA-Doppelstranges durch ein thermostabiles Enzym, der Taq-Polymerase bei 72 °C.

Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Oligonukleotid-Primerpaares konnte gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Aufgrund einer zyklischen Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte - Denaturierung, Annealing und Elongation - wurde die Ziel-DNA exponentiell amplifiziert. Um Mengenabschätzungen der Expression spezifischer mRNAs vorzunehmen, kann das Prinzip der internen endogenen Standardisierung genutzt werden. Dabei wird die cDNA eines sogenannten Housekeeping-Gens zusätzlich zum untersuchenden Gen in der PCR koamplifiziert. Indem das Signal des zu untersuchenden Gens ins Verhältnis zu dem des Housekeeping-Gens gesetzt wird, können semiquantitative Abschätzungen vorgenommen werden, wobei diese nur in der exponentiellen Phase der PCR erfolgen dürfen. Ein Housekeeping-Gen ist ein Gen, welches unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert wird, im Unterschied zu regulierten Genen, daher eignet es sich als interner Standard. Der zuvor hergestellte Master-Mix beinhaltete pro Probe 5 µl 10x PCR-Puffer; 5 µl dNTP's (2 mM); je 0,5-1,5 µl genspezifische F- und R-Primer des Housekeeping-Gens 18S rRNA (BioTeZ, Berlin, Deutschland); die Primer der Zielgene also entweder für BDNF, NT-3 oder NGF (BioTeZ, 1,5 µl F- und R-Primer [10 µM] für BDNF, 4 µl F- und R-Primer [10 µM] für NT-3 oder 4 µl F- und R-Primer [10 µM] für NGF; 0,3 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) und wurde auf 49 µl mit PCR-Wasser aufgefüllt. Dazu wurde je 1 µl der cDNA gegeben. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler mit Heizdeckel (Thermocycler UNO II, Biometra) durchgeführt.

Primer		Primer Position	Sequenz (5'-3')	Größe (bp)	Genbank Nummer	Annealing Temperatur
BDNF	sense	2296-2316	CGACGTCCTGGCTGACACTTTT	491	D10938	60 °C
	antisense	2762-2786	AGTAAGGGCCCGAACATACGATTGG			
NT-3	sense	308-332	GGTCAGAATTCCAGCCGATGATTGC	484	M34643	60 °C
	antisense	767-791	CAGCGCCAGCCTACGAGTTTGTGT			
NGF	sense	456-480	CTGAACCAATAGCTGCCCGTGTGAC	491	M36589	60 °C
	antisense	922-946	GGCAGCCTGTTTGTCTGTGTGTC			
18S rRNA	sense	596-613	AACGAGGATCCATGGAG	814	M11188	60 °C
	antisense	1392-109	ATGCCAGAGTCTCGTTCG			

**Tabelle 2.3: Nukleotidsequenzen der Primer**

## 2.2.8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Um eine Auftrennung der einzelnen DNA-Abschnitte zu erreichen, wurde ein Polyacrylamidgel benutzt. Für die Herstellung wurden zwei gereinigte Glasplatten mit vorgeformten Probestaschen benötigt. Zwischen diese Platten wurde eine Folie gelegt, die später nach dem Trocknen das Gel trägt. Für ein 5 %iges Polyacrylamidgel benötigte man 4,5 ml 10-fachen TBE-Puffer (1 M Borsäure; 20 mM EDTA; 0,5 M Tris; pH 8,3); 2,5 ml Glycerol und 12,5 ml 20 %iges Acrylamid. Dieser Ansatz wurde mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Die Zugabe von 100 µl 30 %igem APS

und 45  $\mu\text{l}$  TEMED führten dann zur Polymerisation des Geles zwischen den Glasplatten. Während das Gel aushärtete, konnten die Proben für die Elektrophorese vorbereitet werden. Dafür wurden pro Probe 9  $\mu\text{l}$  des PCR-Produktes mit 1  $\mu\text{l}$  DNA-Probenpuffer versehen. Zusätzlich wurde ein DNA-Marker auf die gleiche Weise hergestellt. Alle Proben wurden anschließend 10 Minuten bei 70 °C hitzebehandelt. Die Elektrophorese wurde in einer kühlbaren Kammer (Biometra, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die mit PAGE-Laufpuffer (90 ml 10-facher TBE-Puffer, 50 ml Glycerol, 760 ml Aqua bidest) getränkten Tücher schlossen den elektrischen Stromkreis zwischen Gel und den Pufferreservoirs. Danach wurden die Proben in die vorhandenen Taschen gefüllt und der Lauf konnte beginnen. Für die anfängliche Konzentrierung der Proben wurde zunächst eine elektrische Leistung von 10 Watt für zehn Minuten angelegt. Danach erfolgte die Separation bei 25-35 Watt für ungefähr 90 Minuten.

### 2.2.9 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung ist ein Verfahren zum Anfärben und optischen Darstellen von Nukleinbanden nach einer Elektrophorese [68]. Die Färbung beruht auf der Veränderung des Redoxpotentials von Silber durch die Nukleinsäuren, wobei sich elementares Silber abscheidet. Das der Elektrophoresekammer entnommene Gel wurde dreimal für 2 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Das Gel wurde in einer Kunststoffwanne nach folgendem Rezept inkubiert: 3 Minuten in 2 %iger Salpetersäure, zweimaliges waschen für 2 Minuten in destilliertem Wasser, 20 Minuten in 0,2 %iger Silbernitratlösung (300 ml destilliertes Wasser; 0,6 g Silbernitrat), dreimaliges Waschen in destilliertem Wasser, für 10 Minuten in Natriumbicarbonatlösung (2 l destilliertes Wasser; 968  $\mu\text{l}$  Formalin; 59,36 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), nochmals waschen mit destilliertem Wasser, 3 Minuten in 1 %iger Essigsäure, wiederum waschen mit destilliertem Wasser, 5 Minuten in 5 %iger Glycerollösung. Die gefärbten Gele werden für 1 h im Trockenschrank bei 55 °C getrocknet und anschließend densitometrisch, unter UV-Licht, mit der Software BioDocAnalyse (Biometra) ausgewertet.

### 2.2.10 Densitometrische Auswertung der Polyacrylamidgele und deren statistische Analyse

Die Auswertung der Silbergele erfolgte nach vorheriger Trocknung mit der BioDocAnalyse Software (Biometra, Heidelberg, Deutschland). Als Kontrollbande diente das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Aktin. So konnten Unterschiede in der Transkription verschiedener Gene im Verhältnis zum normalisierten  $\beta$ -Aktin-mRNA-Gehalt einer jeden Probe bestimmt werden. Die Ergebnisse wurden als  $M \pm \text{SEM}$  (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler) dargestellt. Die Mittelwerte zweier Gruppen wurden mit dem Student's t-Test für unabhängige Stichproben bei Normalverteilung auf signifikante Unterschiede überprüft. Wurden mehr als zwei normalverteilte Stichproben auf Unterschiedlichkeit der Grundgesamtheit getestet, konnte eine Varianzanalyse mit one-way ANOVA durchgeführt werden.

## 2.3 Transkriptionsanalyse mittels real-time PCR

Die real-time PCR ist ebenso eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Da die real-time PCR zudem eine vielfach höhere Sensitivität besitzt, wurde sie zur Bestätigung der Ergebnisse aus der semiquantitativen PCR für *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) durchgeführt. Sie erfordert hingegen ein exakteres Pipettieren und Arbeiten. Bei der real-time PCR kann die Quantität der amplifizierten Matrizen direkt abgelesen werden. Bei dieser PCR wurden FRET-Sonden (*fluorescence resonance energy transfer*) in Form von sogenannten TaqMan-Sonden verwendet. Das 5'-Ende der TaqMan-Sonde ist mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (FAM oder VIC) markiert, während das 3'-Ende einen Quencher-Fluoreszenzfarbstoff (TAM-RA oder NFQ) trägt und außerdem mit einem Phosphatrest blockiert ist. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Fluoreszenzfarbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher-Molekül durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern zunächst sequenzspezifisch an den Matrizen-Strang. In der Extensionsphase trifft die Taq DNA-Polymerase nun auf diese Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq DNA-Polymerase aktiviert und die Sonde hydrolysiert wird. Kommt es zur Sondenhydrolyse, so wird die räumliche Nähe zwischen Reportermolekül und Quencher unterbrochen. Der FET wird aufgehoben und die abgegebene Fluoreszenz kann detektiert werden. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkten steigt das Fluoreszenzsignal des Reportermoleküls mit jedem Zyklus an. Das gebildete Signal ist strikt sequenzspezifisch, da nicht 100%ig gebundene Sondenmoleküle verdrängt werden, noch bevor die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq DNA-Polymerase aktiviert wird. Zum Ausgleich eventueller Schwankungen aufgrund von geringen Pipettierfehlern, beinhaltet der TaqMan-PCR-Reaktionsansatz einen passiven Referenzfarbstoff (ROX), der in die Analyse der Fluoreszenzsignale mit einfließt. Die erhaltenen Fluoreszenzsignale wurden mittels der ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System Software (Applied Biosystems) analysiert, graphisch wiedergegeben und schließlich mit der vergleichenden  $\Delta\Delta C_T$ -Methode quantifiziert, wobei als interner Standard 18S rRNA (TaqMan® Ribosomal RNA Control Reagents, Applied Biosystems) eingesetzt wird. Um die jeweiligen mRNA-Expressionen mittels der vergleichenden  $\Delta\Delta C_T$ -Methode quantifizieren zu können, müssen zunächst die Effizienzen für die jeweiligen Gene und 18S rRNA als endogenes Referenzgen bestimmt werden. Unter Effizienz versteht man dabei die Bestimmung der optimalen cDNA-Menge zum Einsatz in der TaqMan-PCR. Für die Optimierung der in der TaqMan-PCR einzusetzenden cDNA-Mengen werden jeweils vier bzw. sechs verschiedene cDNA-Konzentrationen für die jeweiligen Gene (2 ng, 8 ng, 32 ng, 128 ng) bzw. für 18S rRNA (5 pg, 20 pg, 40 pg, 80 pg, 160 pg, 320 pg) in Vierfachbestimmung zur TaqMan-PCR verwendet. Für die Quantifizierung der mRNA-Expressionen in der TaqMan-PCR werden die in den Versuchen zur Bestimmung der Effizienz erhaltenen optimalen cDNA-Konzentrationen, TaqMan® Universal PCR Master Mix No

AmpErase® UNG (Applied Biosystems) und die jeweilige TaqMan-Sonde (Assay-on-Demand oder TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems) bzw. TaqMan® Ribosomal RNA Control Reagents eingesetzt. Die aus der TaqMan-PCR resultierenden Daten, die sogenannten  $C_T$ -Werte werden mittels der vergleichenden  $\Delta\Delta C_T$ -Methode quantifiziert.

Die Arbeitsschritte zur Quantifizierung der cDNA für BDNF begannen ebenfalls mit der Extraktion der RNA und der Gewinn der cDNA erfolgte nach obigem Protokoll (vgl. Abschnitt 2.2.3-2.2.6). Für BDNF (30 ng cDNA) setzte sich der Ansatz wie folgt zusammen: 9  $\mu$ l cDNA-Probe, 1  $\mu$ l Sonde mit dem bereits enthaltenem Primerpaar und 10  $\mu$ l Mastermix. Die Sonde markiert am 5'-Ende mit fluoreszentschem Reporter-Farbstoff (6-Carboxy-Fluorescein, 6-FAM) und am 3'-Ende mit dem Quencher-Farbstoff (6-Carboxy-Tetramethylrhodamin, TAMRA) sowie der Mastermix wurden nach Anleitung des Herstellers (Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet. 18S rRNA diente als interner Standard. Für diese Probe setzte sich der Ansatz aus 9,7  $\mu$ l cDNA (100 pg); jeweils 0,1  $\mu$ l F- und R-Primer; 0,1  $\mu$ l Sonde und 10  $\mu$ l Mastermix zusammen. Die Sonde wurde ebenfalls mit einem fluoreszenten Farbstoff (VIC) am 5'-Ende markiert und am 3'-Ende mit dem Quencher-Farbstoff (6-Carboxy-Tetramethylrhodamin, TAMRA) versehen. Dafür wurde das TaqMan Ribosomal RNA Control Reagent Kit von Applied Biosystems verwendet. Jede Probe wurde als Zweifachbestimmung in einem gesamten Probenvolumen von 20  $\mu$ l getestet. Die Amplifikation erfolgte in 96-well-Platten für 40 Zyklen. Jeder Zyklus durchlief eine Denaturierung bei 90°C für 15 Sekunden und ein Annealing bei 60°C für eine Minute in einem PCR-Zycler (ABI Prism 7000 SDS Applied Biosystems).

## 2.4 Proteinanalyse mittels Western Blot

### 2.4.1 Proteinextraktion

Die Tierversuche und die Präparation der Rattengehirne erfolgte für die Proteinanalyse nach dem gleichen Protokoll wie für die Transkriptionsanalyse (vgl. 2.2.2). Diese wurde für *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) 24 Stunden nach Injektion einer einmaligen Dosis von 60 mg/kg KG MDMA am 7. Lebenstag der Versuchstiere durchgeführt. Um die Menge an benötigtem Extraktionspuffer (RIPA-Puffer, Sigma R 0278) zu bestimmen, musste das Gewicht der gewonnenen Gehirnproben zuvor bestimmt werden. Unmittelbar vor der Extraktion wurden dem Puffer jedes mal frisch noch diverse Protease- und Phosphataseinhibitoren zugeführt, um einer Spaltung der Proteine und Phosphatreste vorzubeugen. Dazu gehörten: 0,5  $\mu$ g/ml Leupeptin, 1  $\mu$ g/ml Pepstatin, 2 mg/ml Aprotinin, 1 mM Natriumorthovanadat und 1 mM Phenylmethan-Sulphonyl-Fluorid. Die Gehirnproben wurden mit der zehnfachen Menge an Extraktionspuffer (v/w) versetzt. Unter Zuhilfenahme eines rotierenden Stabes wurden die Gewebeproben mit 900 U/min homogenisiert. Die Probe wurde dann in eine Phiolen zurück pipettiert. Jetzt erfolgte die Auftrennung der verschiedenen Fraktionen der Gewebeproben. Durch drei Zentrifugationsschritte bei 4 °C wurden eine nukleäre, eine mitochondriale und eine zytosolische Phase aus der Probe gewonnen. Für die Proteinanalyse

mittels Western Blot wurde die zytosolische Fraktion verwendet. Dafür wurden die Proben zuerst bei 3.000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Im Pellet befand sich nun der nukleäre Anteil der Zellen, der in Extraktionspuffer resuspendiert wurde. Der entstehende Überstand enthielt die zytosolische und die mitochondriale Fraktion. Dieser Überstand wurde in ein neues Eppendorfggefäß überführt und für weitere 20 Minuten bei 17.000 g zentrifugiert. Der dabei entstehende Überstand enthielt die zytosolische Fraktion und das Pellet, den mitochondrialen Anteil. Der Überstand wurde wieder in ein neues Gefäß pipettiert und das Pellet in Extraktionspuffer (RIPA-Puffer) gelöst. Das gelöste nukleäre Pellet wurde ebenfalls ein weiteres Mal zentrifugiert und der Überstand als nukleäre Probe in ein frisches Gefäß gegeben. Alle drei Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrem weiteren Gebrauch bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Ermittlung der für den Western Blot zu verwendenden Probenmengen erfordert die Bestimmung des Proteingehaltes der gewonnenen Proben. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe des Bicichinonsäure(BCA)-Assays (Micro BC Assay, Uptima, Interchim, Montluçon, Frankreich) und wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Als Standardprotein wurde bovines Serumalbumin (BSA) verwendet. BSA und die Proteinproben wurden in PBS gelöst. Die Standardreihe und die Proben wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die BCA-Lösung den Proben zugeführt. Die Platte wurde für 30 Sekunden geschüttelt und dann im Wärmeschrank bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 30 Minuten inkubiert. Die Absorptionsrate wurde mit dem Wallac Multilabel Counter 1420 (Wallac, Freiburg, Deutschland) bei 562 nm bestimmt. Nach Abzug des RIPA-Puffer-Leerwertes ließen sich jetzt unter Verwendung der Standardkurve die, den entsprechenden Absorptionswerten zugehörigen, gesuchten Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben ermitteln. Für alle Proben wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

### 2.4.3 Western Blot-Verfahren

#### SDS-PAGE

Als erstes wurden zwei Glasplatten gereinigt, zwischen welche die Gele letztendlich gegossen werden konnten. Danach wurde die Lösung für ein 15 %iges Trenngel hergestellt. Dazu gehörten 6 ml eines Trenngelpufferkonzentrates (90,8 g Tris und 2 g SDS ad 500 ml Aqua bidest, pH 8,8); 5,9 ml Aqua bidest; 12 ml Acrylamid 30 %. Die Trenngelmischung wurde mit  $96\text{ }\mu\text{l}$  Ammoniumpersulfat (APS) 12,5 % sowie  $20\text{ }\mu\text{l}$  des Polymerisierungskatalysators Tetramethylethylendiamin (TEMED) versetzt und zügig in einen Spalt zwischen den beiden abgedichteten Glasplatten bis zu einer Markierung gegossen. APS und TEMED bewirkten die Polymerisation des Geles innerhalb von 30 Minuten. Auf das Gel direkt im Anschluss gegossenes Isopropanol (Merck) verhinderte die Bildung von Luftblasen. Zwischenzeitlich konnte die Lösung für das 4,5 %ige Sammelgel vorbereitet werden. Dafür kamen 3,7 ml eines Sammelgelpufferkonzentrates (30,3 g Tris und 2 g SDS

ad 500 ml Aqua bidest; pH 6,8); 9 ml Aqua bidest; 2,2 ml Acrylamid 30 %; 50  $\mu$ l APS und 30  $\mu$ l TEMED zusammen. Nachdem Isopropanol vollständig entfernt war, konnte die Sammelgellösung zwischen die Glasplatten über das bereits polymerisierte Trenngel hineingegossen werden. Bevor das Sammelgel ebenfalls polymerisieren konnte, wurde nachfolgend ein Kamm hineingesteckt, dessen Zinken später die Taschen für die Proben ausbildeten. Nach weiteren 30 Minuten war das Gel gebrauchsfertig. Die Proben für die Elektrophorese wurden von -80 °C langsam auf Eis aufgetaut. Jeder Probe wurden 20  $\mu$ g Protein entnommen und mit PCR-Wasser auf 9  $\mu$ l aufgefüllt. Zusätzlich wurde dieselbe Menge an Lämmli-Puffer (2 ml 0,625 M Tris-HCl pH 6,8; 0,2 g SDS; 5 ml Glycerin; 0,5 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,1 ml Bromphenolblau; 2,4 ml Aqua bidest) hinzugefügt, so dass eine Gesamtmenge von 18  $\mu$ l pro Probe entstand. Während des Verarbeitungsprozesses befanden sich die Proben ständig auf Eis. Zur Abschätzung des Molekulargewichtes eines unbekanntes Polypeptides wurde ein Marker (Sigma Colour Burst, Sigma) mit unterschiedlichen, standardisierten Proteingewichten mitgeführt. Diese Probe setzte sich aus 3  $\mu$ l Marker, 6  $\mu$ l PCR-Wasser und 9  $\mu$ l Lämmli-Puffer zusammen. Alle Proben wurden dann bei 95 °C im Wasserbad für 5 Minuten denaturiert. Daraufhin kamen die Proben wieder für 3 Minuten auf Eis.

Die zuvor hergestellten inzwischen polymerisierten Gele wurden aus ihren Halterungen genommen und in die Elektrophoresekammer eingebaut. Diese wurde dann mit Elektrophorese-Puffer (10-fach Konzentrat: 72 g Glyzin; 15,15 g Tris; 5 g SDS ad 500 ml Aqua bidest) gefüllt. Schließlich wurden die Proben in die dafür vorgesehenen Taschen pipettiert, beginnend mit 2  $\mu$ l des Proteinmarkers. War dieser Vorgang abgeschlossen, wurde die Elektrophorese (Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell, BioRad, München, Deutschland) mit 100 Volt für 20 Minuten gestartet. In dieser Zeit wanderten die Proteinproben zu der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel. Konzentrierten sich dort die Proben, so wurde die Voltzahl auf 160 Volt erhöht, um die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen.

### **Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran**

Für den Transfer der Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran wurde ein Semidry-Blot-System (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad, München, Deutschland) verwendet. Die Gele wurden nach Beendigung der Elektrophorese in einem Transferpuffer (5,8 g Tris; 2,93 g Glyzin; 200 ml Methanol ad 1000 ml Aqua bidest) für 20 Minuten äquilibriert. Danach wurde ein Sandwich aus Chromatographiepapier, Nitrozellulosemembran (0,2  $\mu$ m Porengröße, Schleicher&Schuell Bioscience, Dassel, Deutschland) und dem Gel gebildet und dieser wurde in die Blottingapparatur eingelegt. Der Transfer fand daraufhin für 30 Minuten bei ca. 400 mA statt. Nach dem Transfer wurde die Membran in eine Ponceau-Lösung (0,5 g Ponceau S gelöst in 1 ml Essigsäure; Zugabe von 100 ml dH<sub>2</sub>O) gelegt, um die Proteine reversibel rot anzufärben und damit die Effizienz des Proteintransfers zu überprüfen. Mittels TBS-Tween 0,1 % (TBST, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) bestehend aus 100 ml 10x TBS, 1ml Tween 20 ad 1000 ml Aqua bidest, wurde die Farbe wieder entfernt. Zum Abschluss wurden freie Bindungsstellen auf der Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 10 % Roti-Block (Carl Roth GmbH, Karls-

ruhe, Deutschland) blockiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Nitrocellulose zu vermeiden.

### Immunreaktion

Die gewaschenen Membranen wurden mit einem für BDNF spezifischen Antikörper (anti-BDNF) inkubiert. Dazu wurde in TBS-Tween (0,1 %) gelöstes 1 %iges BSA verwendet, in welches der Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 gegeben wurden (vgl. Tabelle 2.4). Es erfolgte die Inkubation der Membran über Nacht bei 4 °C unter ständiger Agitation. Am nächsten Tag wurde die Membran dreifach für jeweils 10 Minuten in TBST gewaschen, um schwächer haftende unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen. Daraufhin konnte die Nitrocellulosemembran mit dem zweiten Antikörper inkubiert werden (vgl. Tabelle 2.4). Dieser wurde ebenfalls in 1 %iger BSA-Lösung aufgenommen und für eine Stunde bei Raumtemperatur zu der Membran gegeben und diese unter ständiger Agitation inkubiert. Ein nochmaliges dreifaches Waschen mit TBST folgte. Der zweite Antikörper ging eine Bindung mit der Fc-Region des primären Antikörpers ein. An den sekundären Antikörper ist wiederum eine Peroxidase gekoppelt, die in der Lage ist, ein Substrat in ein Produkt umzuwandeln. Bei diesem Enzym-Antikörper-Konjugat wurde durch das Enzym eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert, d.h. es kommt zu einer Emission von Lichtwellen. Vorteilhaft bei dieser zweistufigen Detektion war, dass mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden konnten. Dadurch entstand eine Signalverstärkung [91, 112, 14]. Im Anschluss an die Inkubation mit sekundärem Antikörper wird die Membran nochmals dreifach mit TBST für 10 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen, wonach der Nachweis positiver Bindungen mittels Chemilumineszenz erfolgt (ECL, Amersham Biosciences). Unter Rotlicht wird die ECL-behandelte Membran in eine Filmkassette gelegt und mit einem Röntgenfilm versehen. Die Expositionszeit variiert in Abhängigkeit vom zu detektierenden Protein zwischen 30 Sekunden und 15 Minuten. Die Entwicklung des Films findet anschließend in einer Filmentwicklungsmaschine statt und die erhaltenen Proteinbanden werden mittels der densitometrischen BioDocAnalyse Software erfasst und quantifiziert. Um die Membran im Anschluss nochmals zu verwenden, damit diese mit einem, gegen ein internes Standardprotein ( $\beta$ -Aktin) gerichteten, primären Antikörper inkubiert werden kann, wird die Membran gereinigt („stripping“). Zum Entfernen der gebundenen Antikörper wird die Membran zweimal für 10 Minuten bei Raumtemperatur in TBST gewaschen und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur in Stripping-Puffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST bei Raumtemperatur wird die Membran erneut mit 10 % Roti-Block (Carl Roth GmbH) blockiert, wiederum dreimal für 10 min bei Raumtemperatur in TBST gewaschen und es erfolgten die Inkubationen mit primärem und sekundärem Antikörper, sowie die jeweiligen Waschschrte und Durchführungen der Chemilumineszenz-Reaktion. Die erhaltenen Proteinbanden wurden ebenfalls mit der densitometrischen BioDocAnalyse Software erfasst, quantifiziert und schließlich zur Normalisierung des jeweiligen Zielproteins herangezogen.

	<b>Primärer Antikörper</b>	<b>Sekundärer Antikörper</b>
Protein	BDNF	
Antikörper/ Verdünnung	anti-BDNF/ 1:200	Anti-Rabbit IgG, peroxidase-linked species- specific F(ab') <sub>2</sub> fragment/ 1:1000
Firma	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA	Amersham Pharmacia Buckinghamshire, UK

Tabelle 2.4: Verwendete Antikörper für Immunoblot

### Röntgenfilmentwicklung und Auswertung

Die Entwicklung und Auswertung erfolgte mittels Densitometrie. Im ersten Entwicklungsschritt wurden die Membranen nach einminütiger Trocknung mit ECL-Lösungen (*enhanced chemiluminescence*, Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK) inkubiert. Die Membran wurde daraufhin mit einem lichtempfindlichen Film (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK) in eine Fotokassette gegeben. Die Entwicklung des Filmes erfolgte mit Entwickler, Stoppbad und einer Fixierlösung, zwischen diesen Lösungen wurde jeweils mit Wasser gewaschen. Entsprechend der Expositionszeit fiel die Färbung des Filmes schwächer oder stärker aus. Die densitometrische Auswertung der belichteten Filme erfolgte mit dem Bildanalyseprogramm BioDocAnalyze (Biometra). Das Programm ermöglicht die Messung des Schwärzegrades der Banden in Form von Grauwerten pro Flächeneinheit. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Intensität der Schwärzung des Filmes und die Breite der Bande korrelieren. Nach der Auswertung mit BioDocAnalyze (Biometra) wurde das Verhältnis der BDNF-Banden zu den  $\beta$ -Aktin-Banden gebildet und die Kontrollen 100 % gesetzt. Daher wurde im Folgenden immer von Prozentwerten ausgegangen.

## 2.5 BDNF Knockout Mäuse

Um den Zusammenhang zwischen dem Neurotrophin BDNF und dem Neurotoxin MDMA zu hinterfragen, wurden Versuche mit BDNF Knockout Mäusen durchgeführt. Für die Versuche wurden sieben Tage alte CD1/BDNF +/- Knockout Mäuse verwendet. Sie erhielten ebenso wie die neonatalen Ratten eine Dosis von 60 mg/kg KG bzw. Natriumchloridlösung 0,9 % intraperitoneal appliziert. 24 Stunden nach der Injektion wurden die Tiere getötet, intrakardial wie unter 2.1.2 beschrieben perfundiert und die Hirnschnitte nach der TUNEL-Färbemethode (vgl. 2.1.5) immunhistochemisch gefärbt. Die Hirnschnitte wurden dann mittels der stereologischen Dissektionsmethode in verschiedenen Hirnregionen ausgezählt und die numerische Dichte der degenerierten Zellen (Zellen/mm<sup>3</sup>) bestimmt. Die Dichten der einzelnen Hirnregionen wurden zu einem Gesamtscore der Nervenzelldegeneration addiert. Die Bestimmung des Genotyps erfolgte nach der Extraktion der DNA aus Schwanzspitzenproben der Mäuse mit Hilfe der schon zuvor beschriebenen PCR (vgl. Abschnitt 2.2.7).



## 3 Ergebnisse

Es besteht eine wachsende Befürchtung über die potentiellen Risiken, insbesondere die neurotoxischen Schäden, die MDMA (3,4-Methylenedioxyamphetamin, Ecstasy) im Gehirn verursachen kann [60]. Da der Konsum von MDMA mehrheitlich in einer Altersgruppe von 18-25 Jahren auftritt [79] und ungewollte Schwangerschaften in dieser Altersgruppe mutmaßlich höher sind, erhebt sich die Frage nach den Auswirkungen auf den Fetus im Mutterleib und dessen Entwicklung [60]. Sowohl MDMA, als auch sein Metabolit MDA (3,4-Methylenedioxyamphetamin) sind plazentagängige Substanzen [16]. Um die Wirkung auf das ungeborene Kind zu hinterfragen, dessen Mutter in der Schwangerschaft MDMA konsumiert, wurden die im Folgenden beschriebenen Versuche an der neonatalen Ratte durchgeführt. Die Ratte eignet sich gerade in dieser Fragestellung besonders als Tiermodell, da sie die Phase des größten Hirnwachstums postnatal vollzieht, in dem Zeitraum nach der Geburt bis zur dritten Lebenswoche. Während beim Menschen im letzten Trimenon der Schwangerschaft bis zum Beginn des 3. Lebensjahres das stärkste Hirnwachstum stattfindet [30].

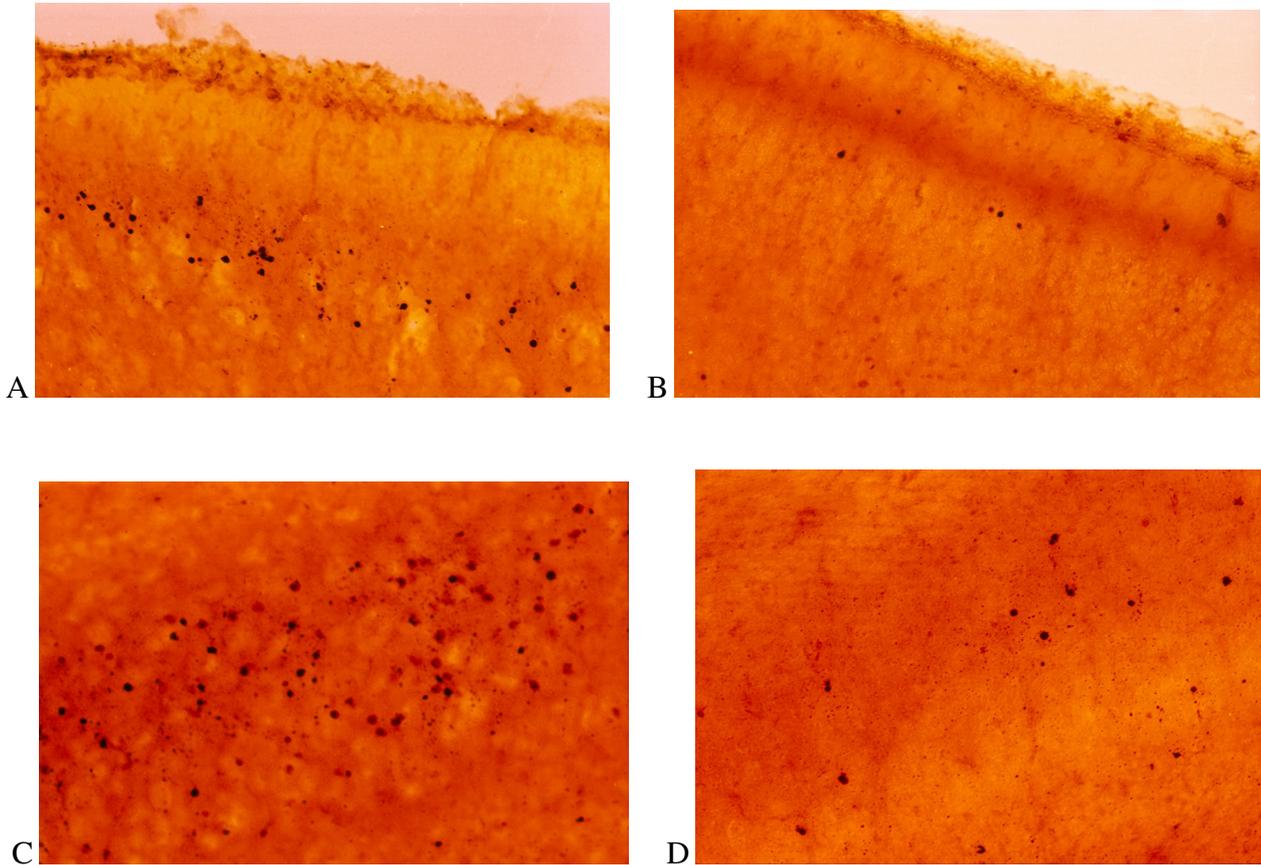
Mit Hilfe dieses Tiermodells wurden zum einen histologische Untersuchungen über die neurodegenerative Wirkung von MDMA durchgeführt, zum anderen wurde der Einfluss von MDMA auf die Genexpression der Nervenwachstumsfaktoren, insbesondere von BDNF, näher beleuchtet.

### 3.1 Neurodegeneration im unreifen Gehirn der Ratte

Um festzustellen, ob MDMA eine neurotoxische Wirkung im sich entwickelnden Gehirn verursacht, wurde den Versuchstieren am siebten Lebenstag (P7) MDMA bzw. Placebo (Natriumchloridlösung 0,9 %) in einer Dosis von 60 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Nach 24 Stunden Überlebenszeit wurden die Tiere getötet und die Gehirne zur histologischen Analyse entnommen. Die degenerierten Nervenzellen wurden nachdem sie nach DeOlmos (vgl. Methodik Abschnitt 2.1.4), Fluoro-Jade (vgl. Abschnitt 2.1.6) bzw. TUNEL (vgl. Abschnitt 2.1.5) gefärbt worden waren mittels der stereologischen Dissektionsmethode in 17 verschiedenen Hirnregionen ausgezählt und die numerische Dichte dieser Zellen pro  $\text{mm}^3$  ermittelt. Diese Zelldichtewerte jedes einzelnen Gehirnpräparates wurden zu einem Gesamtwert, dem Summscore, addiert.

Mit der **DeOlmos Kupfer-Silberfärbung** werden degenerierte Axone und Neurone dunkelbraun bis schwarz gefärbt und heben sich deutlich vom goldgelben Hintergrund ab [26]. In histologischen nach DeOlmos gefärbten Gehirnschnitten sieben Tage alter Ratten, die mit Kochsalzlösung behandelt wurden sind einzelne degenerierte Neurone unter dem Mikroskop zu erkennen (vgl. Abbildung 3.1 B und D). Dagegen ist in Schnitten aus Gehirnen der mit MDMA behandelten

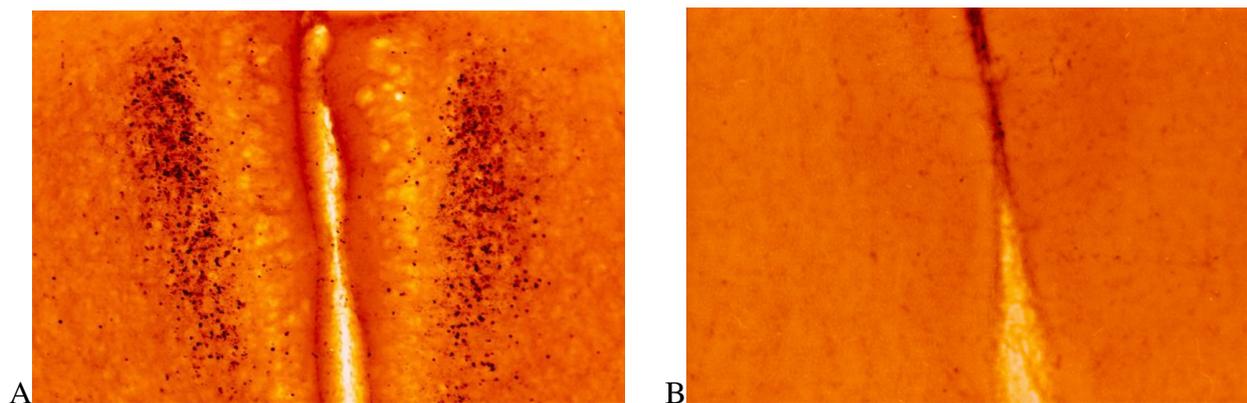
Tiere ein vermehrter Nervenzelluntergang zu beobachten (vgl. Abbildung 3.1 A und C). In diesen folgenden Abbildungen von Hirnschnittpräparaten treten die degenerierten Nervenzellen als schwarze Punkte im Kortex frontalis und im Subiculum unter dem Mikroskop in Erscheinung.



**Abbildung 3.1: Hirnschnittpräparate sieben Tage alter Ratten gefärbt nach DeOlmos.**

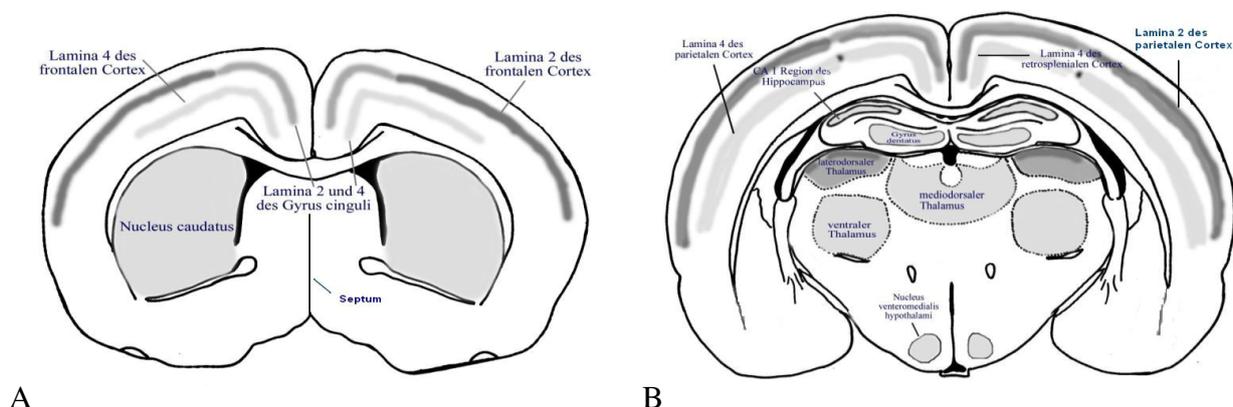
In A und B ist der Kortex frontalis bei 200-facher Vergrößerung abgebildet. Die Gehirne wurden 24 Stunden nachdem die Tiere mit (A) MDMA 60 mg/kg KG oder (B) Placebo behandelt wurden, entnommen und nach dem Protokoll aufbereitet. Degenerierte Nervenzellen sind in den vorliegenden Abbildungen als schwarze Punkte zu erkennen. Unter Verabreichung von 60 mg/kg KG MDMA, wie Bild A zeigt, sind deutlich mehr degenerierte Zellen im Vergleich zu den Kontrollen in Bild B ersichtlich.

In C und D ist das Subiculum, ein Teil des Hippocampus in 200-facher Vergrößerung dargestellt. Die Überlebenszeit betrug sowohl für die Tiere die (C) 60 mg/kg KG MDMA als auch für die Kontrolltiere (D), die Kochsalzlösung erhielten 24 Stunden. Im Subiculum waren im Mittel bei den Tieren, die MDMA erhielten deutlich mehr degenerierte Nervenzellen (vgl. Abbildung C) unter dem Mikroskop sichtbar. Allerdings konnte nach statistischer Analyse aufgrund der großen Streuung bei den MDMA-Tieren keine Signifikanz für diese Aussage errechnet werden. Der Mittelwert liegt jedoch gegenüber den Kontrolltieren deutlich höher. In einer folgenden Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse für die einzelnen Hirnregionen mit Mittelwert und Standardfehler separat aufgeführt.



**Abbildung 3.2: Vermehrter Zelluntergang in der Tenia tecta in Hirnschnittpräparaten 7 Tage alter Ratten.**  
 In der DeOlmos Färbung wird in dieser Arbeit eine von *Schmued et al.* in einer Studie von 2003 als Tenia tecta bezeichnete Hirnregion übereinstimmend mit einem vermehrten Zelluntergang beobachtet [101]. Die Autoren beschrieben diese Region als besonders sensibel für einen durch MDMA verursachten Schaden. Sie befindet sich auf beiden Seiten des Septums in den vorderen Hirnschnitten. In der vorliegenden Dissertation erfolgte für diese Region keine quantitative Analyse der Neurodegeneration, sondern war ein rein objektiv mikroskopisch erhobener und fotografisch festgehaltener Befund. Die Darstellung erfolgt in 100-facher Vergrößerung, 24 Stunden, nachdem die Tiere in A 60 mg/kg KG MDMA und in B Kochsalzlösung erhalten haben.

In den histologischen Schnitten aus den Gehirnen sieben Tage alter Ratten, die 60 mg/kg KG MDMA erhielten, finden sich nach 24 Stunden Überlebenszeit eine signifikant erhöhte Anzahl degenerierter Zellen. Diese sind in mehreren Hirnregionen im Vergleich zu den mit Placebo (isotone Kochsalzlösung) behandelten Tieren nachweisbar (vgl. Tabelle 3.1). Betroffene Gehirnregionen, die eine signifikante neurotoxische Wirkung von MDMA zeigen sind die Lamina II des frontalen Kortex, die Laminae II und IV des parietalen Kortex, die Lamina II des Kortex cinguli, das Septum, der Thalamus ventralis, der Hypothalamus ventromedialis und die CA1-Region des Hippocampus. In Abbildung 3.3 sind die meisten Regionen in ihrer Lokalisation im Rattengehirn grafisch dargestellt. In Tabelle 3.1 sind die Hirnregionen, die eine signifikant erhöhte Anzahl an degenerierten Nervenzellen aufweisen grau unterlegt.



**Abbildung 3.3: Übersicht der untersuchten Hirnregionen.**

(A) Schnittebene aus dem vorderen Bereich des Gehirns und (B) aus dem hinteren Bereich des Rattengehirns. Grafik modifiziert nach Sherwood und Timiras aus „*A stereotaxic atlas of the developing rat brain*“ [104].

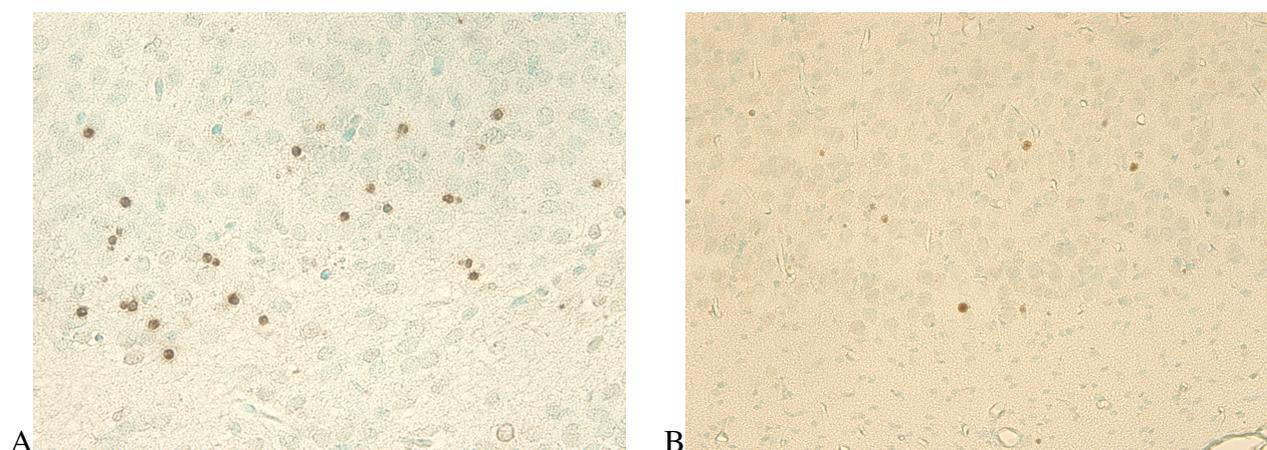
Gehirnregion	Numerische Zelldichte degenerierter Neurone M±SEM	
	NaCl 0,9 %ig (n=13)	MDMA 60 mg/kg (n=11)
Kortex frontalis, II	1571±255	3571±825*
Kortex frontalis, IV	187±38	301±62
Kortex parietalis, II	2052±278	6456±1882*
Kortex parietalis, IV	216±43	620±152*
Kortex cinguli, II	1792±325	3978±717*
Kortex cinguli, IV	195±43	338±82
Kortex retrosplenialis, II	1662±338	2341±657
Kortex retrosplenialis, IV	221±57	461±113
Nucleus caudatus	135±44	332±80
Septum	216±40	439±62**
Thalamus mediodorsalis	254±55	442±85
Thalamus laterodorsalis	184±32	413±127
Thalamus ventralis	62±28	169±37*
Hypothalamus ventromedialis	348±59	716±101**
Subiculum (Hippocampus)	509±88	2147±737
Gyrus dentatus (Hippocampus)	650±167	1114±283
CA1-Region (Hippocampus)	534±133	1399±367*
Summenscore	10789±1542	25238±5206*

**Tabelle 3.1: Die Neurotoxische Wirkung von MDMA auf verschiedene Hirnregionen.**

Am siebten Lebenstag (P7) wurde den Ratten 60 mg/kg KG MDMA bzw. isotone Kochsalzlösung injiziert. Nach 24 Stunden Überlebenszeit wurden die Gehirne histologisch aufbereitet und nach dem DeOlmos-Protokoll gefärbt. Die Dichte der degenerierten Neurone (Zellen/mm<sup>3</sup>) wurde in 17 Gehirnregionen mit der stereologischen Dissektionsmethode bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte der numerischen Dichte der degenerierten Zellen und deren Standardfehler (M±SEM). In einigen Gehirnregionen wurde eine signifikante neurotoxische Wirkung von MDMA ersichtlich (\*p<0,05 und \*\*p<0,01; Student's t-Test). Die Regionen, die einen signifikanten Nervenzelluntergang aufwiesen, sind in der Tabelle grau unterlegt. II und IV gelten für Laminae corticales II und IV.

Grundlegend ist demzufolge festzustellen, dass MDMA im neonatalen Gehirn der Ratte einen neurodegenerativen Zelluntergang verursacht. Allerdings sagt die DeOlmos Färbung nichts über den Pathomechanismus aus, der zu der neuronalen Degeneration geführt hat, d.h. es werden sowohl apoptotische als auch nicht-apoptotische Zellen angefärbt. Für den differenzierteren Nachweis, dass der neurodegenerative Prozess tatsächlich apoptotischen Ursprungs ist, sind weitere Untersuchungen möglich, wie z.B. die TUNEL-Färbung, Fluoro-Jade Färbung, die Elektronenmikroskopie und molekularbiologische Untersuchungstechniken, was in vergangenen Studien bereits gezeigt werden konnte [18, 109, 106]. In dieser Arbeit wurde die TUNEL-Färbung und die Fluoro-Jade B Färbung vergleichsweise durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.1.5 und 2.1.6). Ein ähnliches Verteilungsmuster degenerierter Zellen in den korrespondierenden Hirnregionen zeigen die nach der TUNEL-Methode und Fluoro-Jade gefärbten Hirnschnitte im Vergleich zu den nach DeOlmos gefärbten Präparaten. Die Apoptose ist durch eine von DNA-spaltenden Enzymen verursachte typische internukleosomale Fragmentierung der DNA in Segmente mit ca. 180 Basenpaaren bzw. Viel-

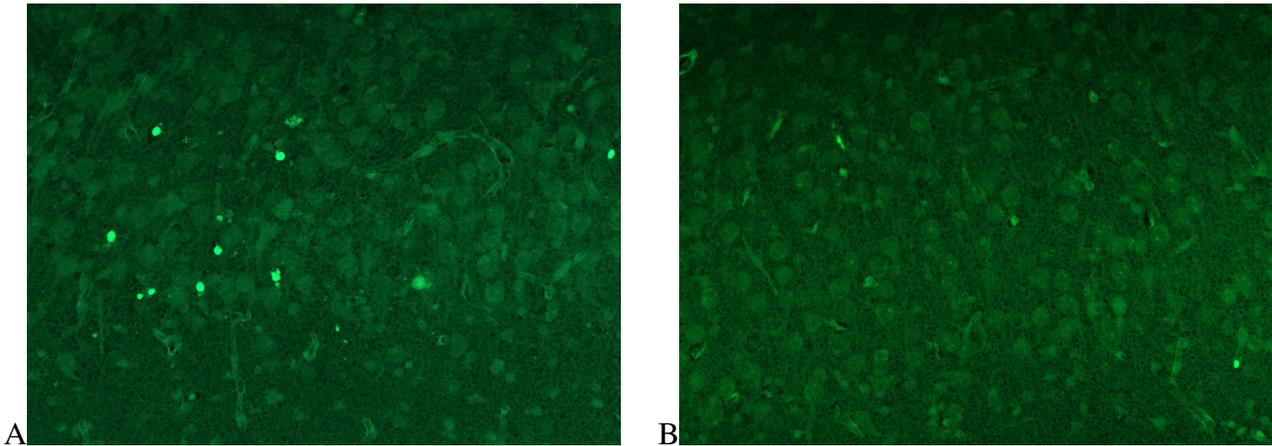
fachen davon charakterisiert [67, 43]. *Gavrieli et al.* beschrieben (1992) eine histologische Methode, um Zellen in situ anzufärben, deren DNA durch Endonukleasen-Spaltung fragmentiert ist [39]. Sie nannten diese Nachweismethode der Apoptose **TUNEL-Färbung**. Da auch z.B. bei Nekrose-induzierten Strangbrüchen oder postmortalen Autolyse 3'-OH-DNA-Enden freiliegen können, ist die TUNEL-Technik nicht Apoptose-spezifisch [41, 28]. Die TUNEL-Technik wird daher gemeinsam mit anderen Methoden zum Apoptosenachweis verwendet. In Abbildung 3.4 sind TUNEL-positive Kerne degenerierter Zellen sichtbar. Die TUNEL-Methode färbt Zellen mit fragmentierter DNA, das wie schon erwähnt u.a. ein Kennzeichen der Apoptose darstellt.



**Abbildung 3.4: Hirnschnittpräparate nach einer TUNEL-Färbung.**

Gezeigt wird eine Detailansicht des Thalamus von drei Tage alten Ratten, 24 Stunden nachdem sie A: 60 mg/kg KG MDMA und B: Placebo (Kochsalzlösung) erhalten haben. Die TUNEL-positiven degenerierten Neurone sind als braune Punkte zu erkennen, Vergrößerung 40-fach.

Um noch eine dritte unabhängige Färbung der Hirngewebe vergleichend zu studieren, wurden die Gehirnschnitte 7 Tage alter Ratten mit **Fluoro-Jade B** gefärbt, nachdem sie 60 mg/kg KG MDMA erhalten hatten. Mit Hilfe der Fluoro-Jade B Färbung (vgl. 2.1.6) können neurodegenerative Zellen sehr zuverlässig und mit einer hohen Sensitivität detektiert werden. Obwohl der Mechanismus durch den eine Zelle stirbt durch diese Färbung nicht spezifiziert wird, wurden strukturelle Veränderungen, die mit der Morphologie apoptotisch sterbender Zellen übereinstimmen, beobachtet [32]. Fluoro-Jade ist ein neuronenspezifischer Fluoreszenzfarbstoff, der sich auch bei gekühlter Lagerung nicht permanent hält, sondern eine baldige mikroskopische Auswertung erfordert [102]. Die mit 60 mg/kg MDMA behandelten 7 Tage alten Ratten zeigen Fluoro-Jade B positive Neurone in verschiedenen Hirnregionen (vgl. Abbildung 3.5 Thalamus). Die Anzahl an degenerierten Nervenzellen in den entsprechenden Hirnregionen ist vergleichbar mit den in der Silberfärbung erzielten Ergebnissen.



**Abbildung 3.5: Hirnschnittpräparate nach Fluoro-Jade B gefärbt.**

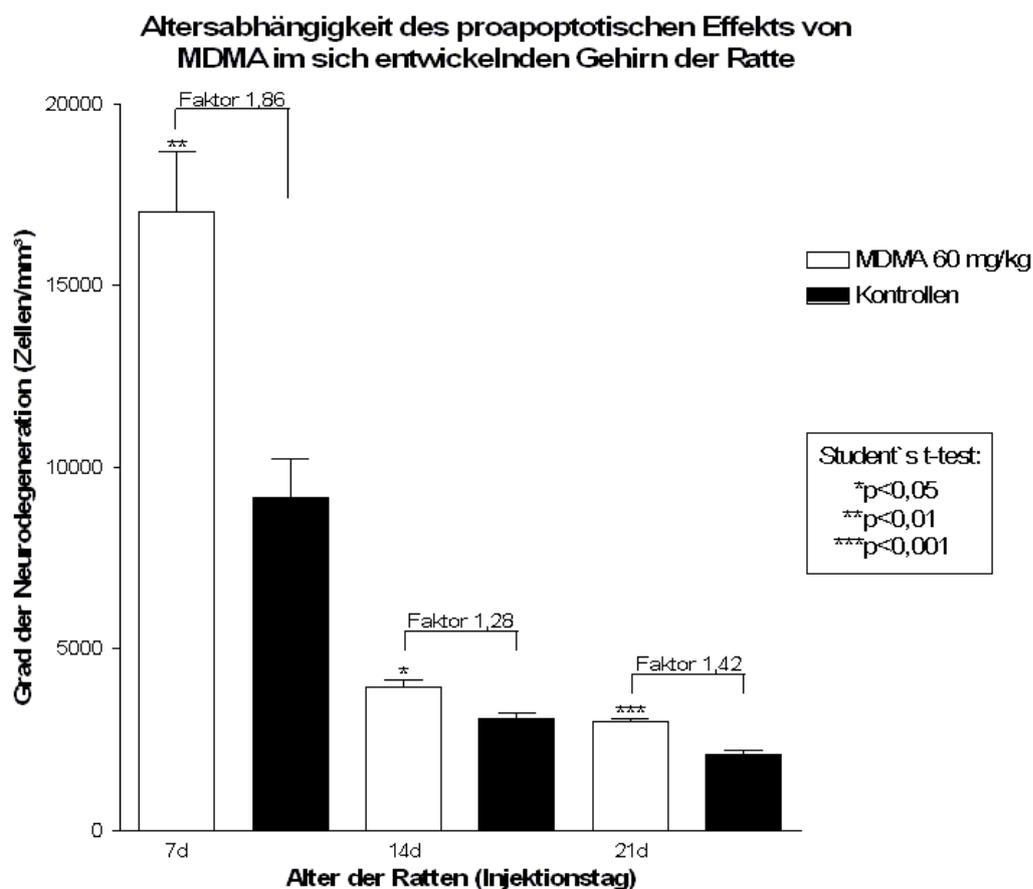
Abgebildet sind Hirnschnitte von sieben Tage alten Ratten mit einem Ausschnitt aus dem Subiculum (Hippocampus), Vergrößerung 200-fach. Die degenerierten Neurone sind Fluoro-Jade B positiv gefärbt und in der Abbildung deutlich als fluoreszierende hellgrün leuchtende Punkte zu erkennen. A: 60 mg/kg KG MDMA, vermehrt degenerierte Neurone detektiert. B: Kontrollversuch, NaCl-Lösung 0,9%, deutlich weniger degenerierte Nervenzellen nachweisbar.

Die Übereinstimmung der Ergebnisse dreier voneinander unabhängiger Färbemethoden, bestärkt die These, dass es sich um einen Nervenzelluntergang apoptotischen Ursprungs handelt. Eindeutige Hinweise darauf sind auch in anderen Studien gefunden worden [106, 18, 17, 77, 109, 54].

### 3.1.1 Altersabhängigkeit der Neurodegeneration unter MDMA

Um eine mögliche Altersabhängigkeit der proapoptotischen MDMA-Wirkung darzustellen, wurde Ratten in unterschiedlichem Alter MDMA in konstanter Dosierung von 60 mg/kg KG MDMA bzw. den Kontrolltieren Natriumchloridlösung injiziert. Das Alter der Tiere betrug 3, 7, 14 und 21 Tage. Nach 24 Stunden Überlebenszeit wurden die Tiere perfundiert und wie unter 2.1.8 beschrieben ausgewertet. Trotz wiederholter Versuche sind die Färbungen der 3 Tage alten Ratten nur bei einzelnen Tieren geglückt, so dass die Gesamtzahl nicht ausreichend hoch war, eine statistische Analyse dieser Versuchsgruppe zu ermöglichen. Zum einen lag das an der langwierigen Prozedur der Färbemethode, zum anderen an der Winzigkeit der Gehirne. Es sind aber aus den wenigen Hirnschnitten der 3 Tage alten Tiere eindrucksvolle Fotografien (vgl. Abbildung 3.4) entstanden. Ein Vergleich der anderen drei Versuchsgruppen von 7, 14 und 21 Tagen ist in Abbildung 3.6 grafisch dargestellt. In der Grafik ist deutlich erkennbar, dass MDMA signifikant die apoptotische Neurodegeneration im Vergleich zu den Kontrollgruppen des gleichen Alters vor allem in den Gehirnen der 7 Tage alten Ratten verstärkt (7 Tage:  $**p < 0,01$ ). Aber auch bei den 14 und 21 Tage alten Tieren, wenn jedoch in einem geringeren Ausmaß, war ein signifikanter Untergang von Neuronen gegenüber den Kontrollen der gleichen Altersgruppe nachweisbar (14 Tage:  $*p < 0,05$ ; 21 Tage:  $***p < 0,001$ ; Student's t-Test,  $n=7-9$ ). Um die Neurodegeneration in den drei Gruppen quantitativ vergleichen zu können, wurde ein Faktor rechnerisch ermittelt, um den die Neurodegeneration im Vergleich zu den Kontrollen erhöht ist. Bei den 7 Tage alten Ratten ist eine Zunahme der Neurodegeneration gegenüber den Kontrolltieren um den Faktor 1,86 zu verzeichnen; dementsprechend bei

den 14 Tage alten Tieren um den Faktor 1,28 und bei den 21 Tage alten Versuchstieren um den Faktor 1,42 (errechnet anhand der Mittelwerte der jeweiligen Gruppe, auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet). Dementsprechend erreicht im Alter von sieben Tagen, welches mit der rapiden Hirnwachstumsphase (vgl. 1.2) zusammenfällt, die Sensibilität gegenüber der Substanz MDMA im unreifen Gehirn der Ratte unter den beobachteten Altersgruppen in Form eines apoptotischen Nervenzellunterganges ihr Höchstmaß.



**Abbildung 3.6: Altersabhängigkeit der proapoptischen Wirkung von MDMA.**

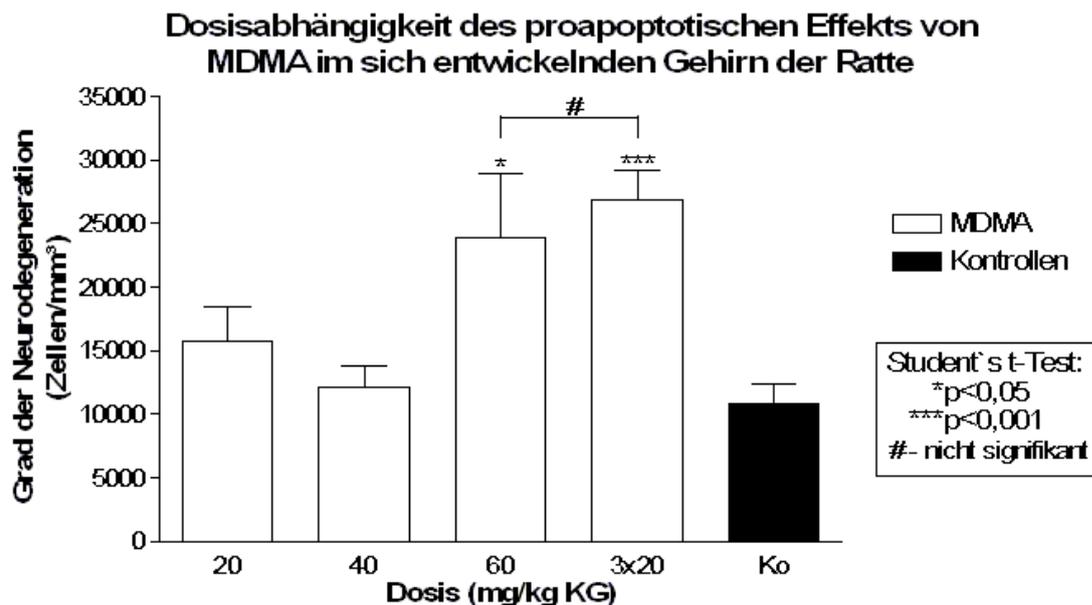
Ratten unterschiedlichen Alters erhielten an Tag 7, 14 und 21 MDMA in konstanter Dosierung (60mg/kg KG) bzw. Placebo. Nach 24 Stunden Überlebenszeit wurden die Gehirne histologisch analysiert. Die nach De Olmos gefärbten Präparate wurden mittels der stereologischen Dissektionsmethode in verschiedenen Hirnregionen ausgezählt und die numerische Dichte der degenerierten Zellen (Zellen/mm<sup>3</sup>) bestimmt. Die Dichten in den einzelnen Hirnregionen wurden zu einem Score der Neurodegeneration addiert. Die Säulen zeigen die Mittelwerte und SEM (Standardfehler) der Scores pro Versuchsgruppe an. Die statistische Analyse erfolgte zwischen den Kontroll- und den MDMA-Gruppen des gleichen Alters mittels des Student's t-Tests für unverbundene Stichproben (n=7-9 Tiere pro Versuchsgruppe). MDMA verstärkt signifikant die apoptotische Neurodegeneration bei den 7, 14 und 21 Tage alten Ratten, mit einem Maximum am siebten Tag. Bei den 7 Tage alten Tieren findet eine verstärkte Neurodegeneration durch MDMA um den Faktor 1,86 statt, bei den 14 Tage alten Tieren um einen geringeren Faktor von 1,28 und bei den 21 Tage alten Tieren um den Faktor 1,42 gegenüber den Kontrollgruppen (errechnet anhand der Mittelwerte der Versuchsgruppen, gerundet auf zwei Stellen nach dem Komma).

Mit dieser Untersuchung wurde gezeigt, dass das neonatale Gehirn der Ratte aller drei Altersgruppen (7, 14 und 21 Tage) anfällig für eine neurotoxische Wirkung durch MDMA ist. Das neonatale Gehirn 7 Tage alter Ratten zeigte dabei den stärksten neurodegenerativen Schaden. Schlussfolgernd reagiert das Rattengehirn um den 7. Lebenstag herum am empfindlichsten auf die Schädigung durch MDMA. Zu diesem Zeitpunkt, der mit der größten Hirnwachstumsphase (vgl. 1.2) zusammenfällt, ist sowohl die physiologische als auch die durch MDMA induzierte apoptotische Neurodegeneration am stärksten ausgeprägt.

### 3.1.2 Dosisabhängigkeit der Neurodegeneration unter MDMA

Um eine mögliche Dosisabhängigkeit der proapoptotischen MDMA-Wirkung aufzuzeigen, wurde eine Dosis-Wirkungs-Studie durchgeführt. Im Alter von sieben Tagen (P7) bekamen die Versuchstiere in unterschiedlicher Dosis MDMA bzw. Natriumchloridlösung (0,9%ig) appliziert. Die getesteten Dosen lagen bei 20, 40, 60 und 3x20 mg/kg KG. Nach 24 Stunden Überlebenszeit wurden die Gehirne entnommen und nach zuvor beschriebenem Protokoll aufgearbeitet und analysiert (vgl. Abschnitt 2.1).

Wie in Abbildung 3.7 zu ersehen ist, existiert eine Dosisabhängigkeit des Ausmaßes der apoptotischen Neuronenuntergänge nach MDMA-Injektion. Bei einer einmaligen Dosis von 20 und 40 mg/kg KG ist noch keine signifikante Nervenzelldegeneration zu erheben. Ab einer einmaligen Dosis von 60 mg/kg KG MDMA ist im neonatalen Gehirn der Ratte eine signifikante Degeneration von Neuronen gegenüber den mit Placebo behandelten Tieren nachweisbar. Eine dreimalige Injektion von 20 mg/kg KG MDMA, bezeichnet als „binge-dosing“ [99], bewirkt das gleiche Maß an apoptotischem Nervenzelluntergang. Allerdings ist ein Trend ablesbar, der für einen höheren Schaden bei dreimaliger Injektion von 20 mg/kg MDMA gegenüber einer einmaligen Applikation von 60 mg/kg MDMA, spricht. Denn der Mittelwert des Summenscores für 3x20 mg/kg KG MDMA ist um den Faktor 1,125 höher als bei den Tieren, die 60 mg/kg KG bekamen. Für diesen Trend lässt sich statistisch keine Signifikanz erheben, dafür müssten weitere Versuche unternommen werden. Zumindest aber kann, aufgrund der hier erhobenen Ergebnisse, von einer Tendenz in Richtung einer verstärkenden Wirkung bei mehrfacher Exposition mit MDMA gesprochen werden.



**Abbildung 3.7: Dosisabhängigkeit der proapoptotischen Wirkung von MDMA.**

Untersucht wurden die Gehirne von 7 Tage alten Ratten. Die Versuchstiere bekamen in unterschiedlichen Dosierungen von 20, 40, 60, 3x20 mg/kg KG MDMA, bzw. die Kontrolltiere Natriumchloridlösung 0,9% appliziert. Nach 24 Stunden Überlebenszeit wurden die Gehirne histologisch analysiert. Die nach De Olmos gefärbten Präparate wurden mittels der stereologischen Dissektionsmethode in verschiedenen Hirnregionen ausgezählt und die numerische Dichte der degenerierten Zellen (Zellen/mm<sup>3</sup>) bestimmt. Die Dichten in den einzelnen Hirnregionen wurden zu einem Gesamtwert der Neurodegeneration addiert. Die Säulen zeigen die Mittelwerte und SEM ( $M \pm SEM$ ) der Scores pro Versuchsgruppe an. Die MDMA-Dosierungen 3x20 und 60 mg/kg KG MDMA zeigen das gleiche Maß an Neurodegeneration und verursachen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte apoptotische Neuronenuntergänge. Die statistische Analyse erfolgte zwischen Kontroll- und MDMA-Gruppen mittels des Student's t-Tests, n=7-14 Tiere pro Versuchsgruppe.

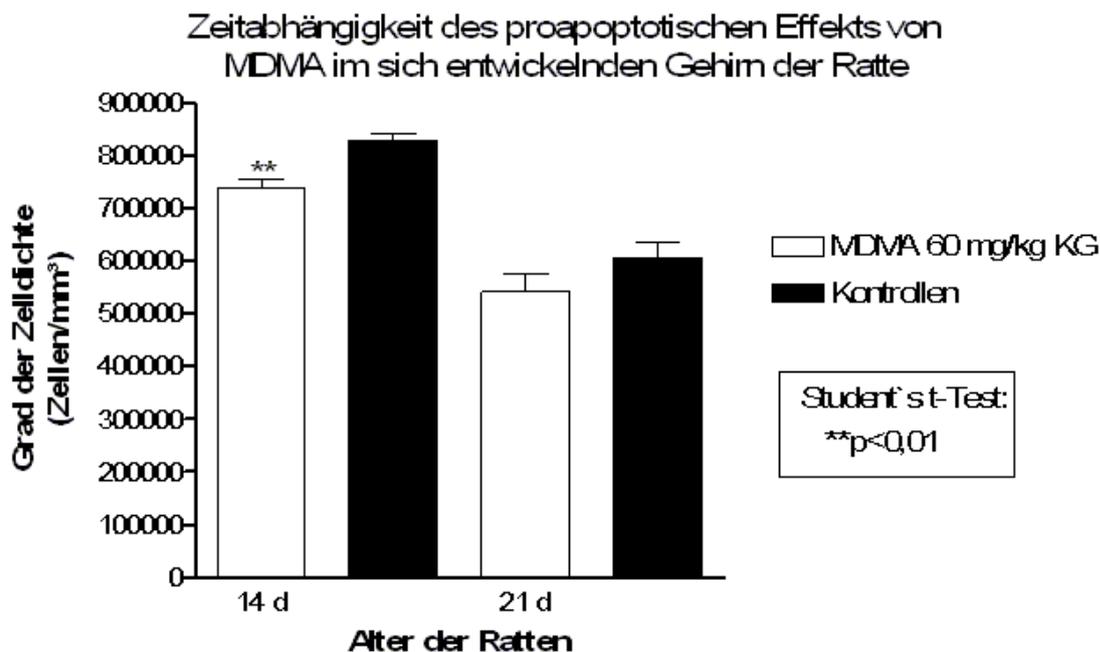
Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine Dosisabhängigkeit der proapoptotischen Wirkung von MDMA besteht. Mit dieser Methode ist eine Neurodegeneration über das physiologische Maß hinaus ab einer Dosis von 60 mg/kg KG signifikant nachgewiesen und wurde fortan als Standarddosis für weitere Versuchsreihen verwendet. Da bei einer Dosis von 3x20 mg/kg KG MDMA der Zelluntergang um den Faktor 1,125 (bezogen auf die Mittelwerte) größer war als im Vergleich zur Dosis von 1x60 mg/kg KG, scheint hier eine kumulative apoptotische Wirkungsweise zu Grunde zu liegen. Allerdings waren die Unterschiede dieser zwei Gruppen mit den verschiedenen Dosen von 3x20 und 1x60 mg/kg KG MDMA nicht signifikant, was u.a. auf die hohen Standardabweichungen bzw. Standardfehler durch eine extreme Streuung der Werte zurückzuführen ist. Um genauere Angaben in diesem Sachverhalt machen zu können, müssten weitere Studien mit noch größeren Versuchsreihen folgen.

### 3.1.3 Zeitabhängigkeit der Neurodegeneration unter MDMA

Um die Abhängigkeit der apoptotischen Neurodegeneration von der Überlebenszeit der Versuchstiere zu überprüfen, wurden zwei Versuchsgruppen nach Injektion von 60 mg/kg KG MDMA bzw. Kochsalzlösung am siebten Lebenstag (P7), nach 7 und 14 Tagen Überlebenszeit, untersucht. Die Überlebenszeit nach Injektion betrug zum einen 7 und zum anderen 14 Tage. Entsprechend betrug das Alter der Tiere zum Perfusionszeitpunkt 14 und 21 Tage.

Mit der zuvor angewandten Methode, der Zählung der apoptotischen Zellen in der DeOlmos Kupfer-Silberfärbung konnte der Nachweis in dieser Fragestellung nicht erbracht werden. Die apoptotischen Zellen waren nach längeren Überlebenszeiten (post injectionem) schon phagozytiert und somit quantitativ unter dem Mikroskop mit dieser Färbemethode nicht mehr erfassbar, da zwischen der Verabreichung von MDMA und der Perfusion der Jungtiere 7 Tage oder mehr lagen. Um trotzdem die Neurodegeneration auch 7 und 14 Tage nach MDMA-Injektion noch nachzuweisen, wurde die Zelldichtebestimmung (Zellen/mm<sup>3</sup>) mittels der Cresylviolett-färbung (vgl. Abbildung 2.3 und Abschnitt 2.1.7) als geeignete Methode ausgewählt. Dieses Verfahren ermöglichte einen indirekten Nachweis von vermehrtem Zelluntergang bei den mit MDMA behandelten Tieren, indem die Zellen quantitativ mittels der stereologischen Dissektionsmethode ermittelt und mit denen der Kontrollgruppe verglichen wurden. Waren nachweislich signifikant weniger Gesamtzellen in der Testgruppe vergleichsweise zu denen der Kontrollgruppe verifizierbar, so war der Beleg für eine Verminderung der Neuronenzahl in der MDMA-Versuchsgruppe erbracht.

Wie in Abbildung 3.8 ersichtlich wird, waren selbst nach 7 und 14 Tagen Überlebenszeit noch eine verminderte Zellzahl im Vergleich zu den Kontrollgehirnen mit der quantitativen Zellzählung unter dem Mikroskop nachweisbar. Für die 14 Tage alten Ratten, bei denen die Injektion von MDMA am siebten Tag (P7) erfolgte, ist eine signifikante Erniedrigung der Zelldichte festzustellen. Somit war eine Zellverminderung durch MDMA nachgewiesen, die auch hier auf eine apoptotische Neurodegeneration, die über das physiologische Maß hinausgeht, schließen lässt. Bei den 21 Tage alten Ratten, die MDMA ebenfalls am siebten Tag (P7) erhielten, ist eine Tendenz der erniedrigten Gesamtzellzahl gegenüber den Kontrolltieren abzuleiten. Allerdings ist keine Signifikanz für diesen Sachverhalt mehr zu erheben.



**Abbildung 3.8: Zeitabhängigkeit der proapoptotischen Wirkung von MDMA.**

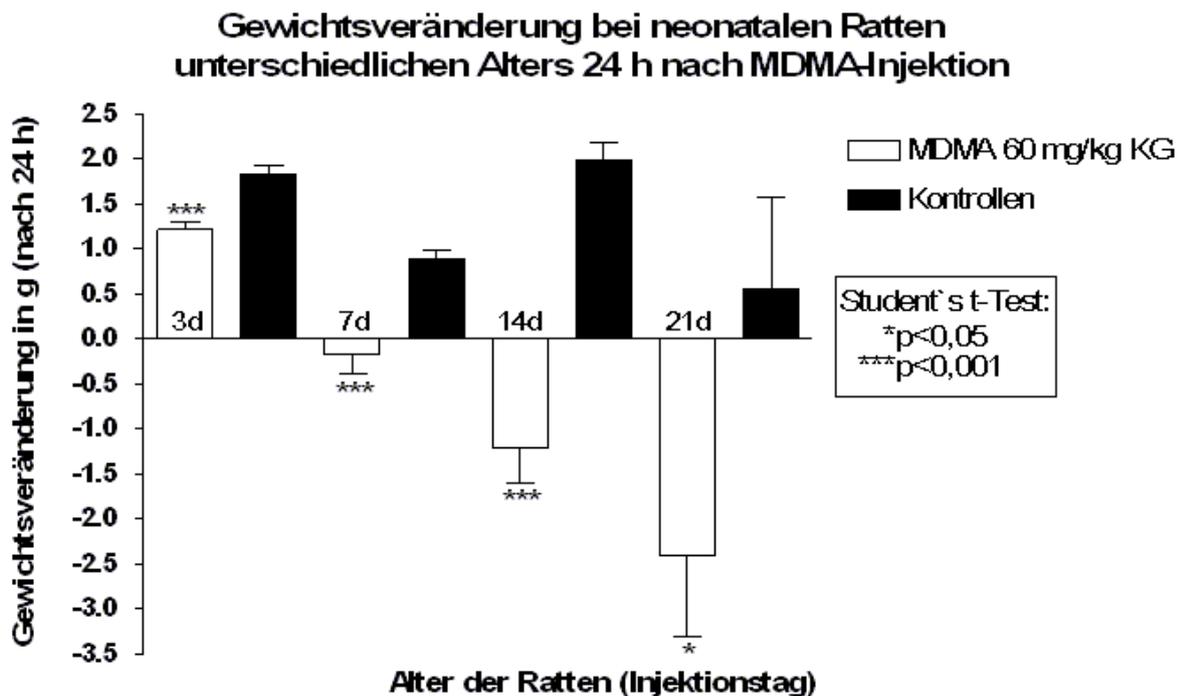
Der Nachweis erfolgte durch Zelldichtebestimmung einzelner Regionen nach einer Cresylviolett-Färbung. Mittels der stereologischen Dissektionsmethode wurde die Zelldichte (Zellen/mm<sup>3</sup>) bei 14 und 21 Tage alten Ratten bestimmt, die am Tag 7 (P7) 60 mg/kg KG MDMA bzw. Placebo erhalten hatten. Die 14 Tage alten Ratten (Überlebenszeit 7 Tage) zeigen eine signifikant verminderte Zellzahl im Vergleich zu den Kontrollen, ein Nervenzelluntergang ist damit indirekt nachgewiesen. Bei den 21 Tage alten Tieren (Überlebenszeit 14 Tage) ist kein signifikanter Unterschied der Zelldichte zu den Kontrolltieren aufzuzeigen. Die Analyse erfolgte mit dem Student's t-Test für unverbundene Stichproben (n=5-6 pro Versuchsgruppe).

Diese Ergebnisse belegen einen anhaltenden degenerativen Effekt auch 7 Tage nach Verabreichung von MDMA. 14 Tage nach MDMA-Injektion scheint die neuronale Degeneration fast vollständig kompensiert worden zu sein und ist nicht mehr signifikant nachweisbar. Die Untersuchungen bestätigen demnach eine Zeitabhängigkeit der proapoptotischen Wirkung von MDMA.

## 3.2 Einfluss von MDMA auf das Verhalten und das Körpergewicht der Versuchstiere

Einige Sekunden nach der Injektion von MDMA veränderte sich das Verhalten der neonatalen Tiere. Zwischen den Versuchsgruppen, die 20 mg/kg und 60 mg/kg erhielten war im Verhalten subjektiv kein Unterschied ersichtlich. In der Akutwirkung löste MDMA eine starke unkoordinierte Hyperaktivität und stereotypes Verhalten aus. Die 3 und 7 Tage alten Tiere wirkten orientierungslos, lagen zwischenzeitlich auf dem Rücken oder rollten gar wild umher. Die Bewegungsaktivität stieg so stark an, als dass die Tiere überhaupt nicht mehr innehielten, sondern in ständiger Bewegung blieben. Die 14 und 21 Tage alten Tiere blieben mit den Füßen auf dem Boden, waren aber ebenso hyperaktiv und rannten wild umher und gaben quietschende Laute von sich. Für die nächsten Stunden saugten sie keine oder kaum Milch bei dem Muttertier, was die im Folgenden be-

schriebenen Gewichtsveränderungen erklärt. Die sinkende Gewichtszunahme der MDMA-Gruppe gegenüber den Kontrolltieren während der Durchführung der Versuche war augenscheinlich auffällig. Aus diesem Grund sollte sie anhand von Gewichtsmessungen objektiviert werden. Für einen Großteil der MDMA-Versuchstiere war sogar eine Gewichtsabnahme zu verzeichnen, wie in Abbildung 3.9 grafisch dargestellt. Bei einer Dosis von 60 mg/kg Körpergewicht steigt bei drei Tage alten Ratten das Gewicht innerhalb von 24 Stunden trotz der Gabe von MDMA an, zweifellos in geringerem Maße als bei den Kontrolltieren. Gegenüber den 3 Tage alten Kontrolltieren existiert eine signifikant verminderte Gewichtszunahme 24 Stunden nach der Injektion. Bei den 7, 14 und 21 Tage alten Ratten zeigt sich eine signifikante Gewichtsreduktion gegenüber den Kontrollen. Gemessen wurde unmittelbar vor der Injektion und 24 Stunden danach. Bei einer einmaligen Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht bleibt das Gewicht 24 Stunden nach der Injektion annähernd konstant (Daten nicht gezeigt). Die Auswertung erfolgte mit dem Student's t-Test für unverbundene Stichproben (n=6-9 Versuchstiere pro Gruppe).



**Abbildung 3.9: Gewichtsveränderungen 24 Stunden nach MDMA- Injektion.**

Bei Ratten in unterschiedlichem Alter sind die Gewichtsveränderungen zum Vergleich dargestellt. Gemessen wurde unmittelbar vor der Injektion von 60 mg/kg KG MDMA bzw. Placebo und 24 Stunden danach. Es wurde der Mittelwert aus der Gewichtszunahme oder -abnahme statistisch ausgewertet und mit dem Standardfehler grafisch dargestellt. Die 3 Tage alten Tiere zeigen eine signifikant geringere Gewichtszunahme als die Kontrollen dieser Altersgruppe. Bei den 7, 14 und 21 Tage alten Ratten hingegen, ist eine signifikante Gewichtsreduktion innerhalb von 24 Stunden gegenüber den Kontrollen des gleichen Alters festzustellen. Die Analyse erfolgte mit dem Student's t-Test für unabhängige Stichproben (n=6-9 Tiere pro Versuchsgruppe).

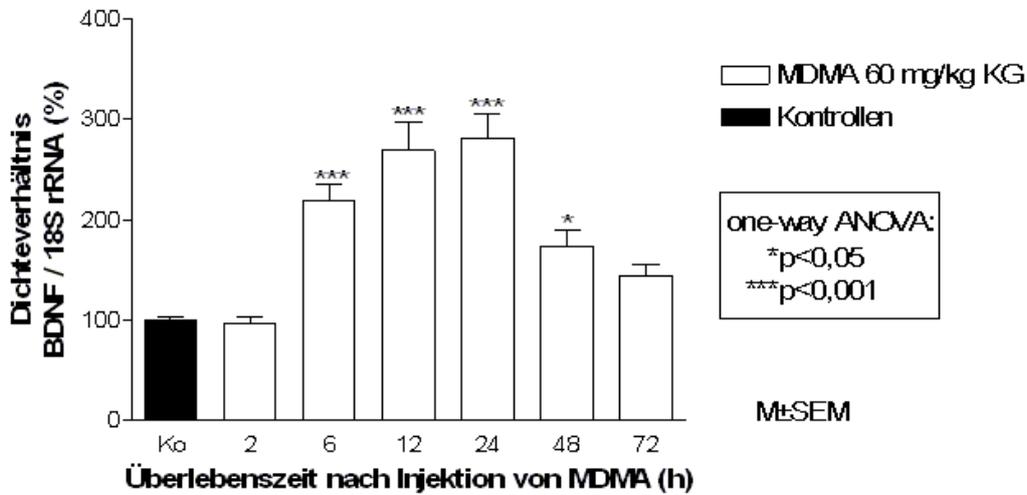
### 3.3 Einfluss von MDMA auf die Genexpression der Wachstumsfaktoren

Im Folgenden wurden mögliche Mechanismen untersucht, die bei der Pathogenese der apoptotischen Neurodegeneration im sich entwickelnden Gehirn involviert sind. Es wurde geprüft, ob MDMA die Expression von BDNF, NGF und NT-3 im retrosplenialen Cortex beeinflusst. Die Transkription wurde mittels der semiquantitativen PCR und für BDNF auch mit der real-time PCR nach zuvor beschriebenem Protokoll analysiert (vgl. 2.2 und 2.3). Die Genexpression auf Proteinebene für BDNF wurde mittels dem Western Blot-Verfahren näher betrachtet (vgl. 2.4). Aus diesem Grund wurde Ratten am siebten Lebenstag (P7), zum einen in einer Dosis von 20 mg/kg KG und zum anderen 60 mg/kg KG MDMA injiziert. Bei 20 mg/kg KG wurde nur die Transkriptionsebene begutachtet. Die Überlebenszeiten nach Injektion betragen 2, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden, um den zeitlichen Verlauf einer möglichen Veränderung der Genexpression und Proteinsynthese der Wachstumsfaktoren zu verfolgen.

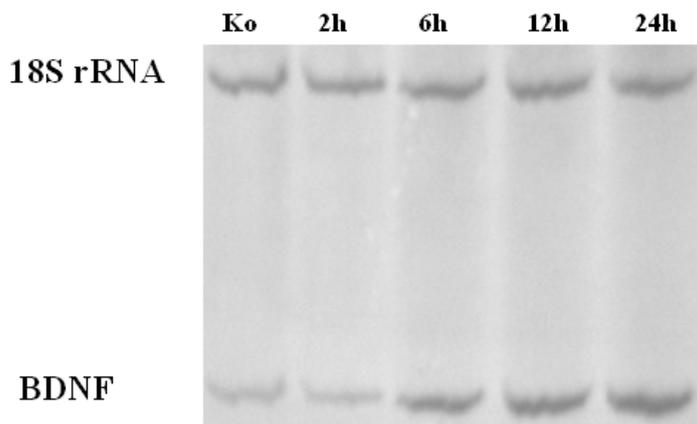
#### 3.3.1 Genexpression von BDNF bei einer Dosis von 60 mg/kg KG MDMA

Zuerst wurde die Standarddosis von 60 mg/kg KG MDMA aus den vorherigen histologischen Versuchen auch für die folgenden Studien auf molekularbiologischer Ebene verwendet. Wie der Abbildung 3.10 zu entnehmen ist, führt MDMA zu einer vermehrten Expressionsrate von BDNF auf mRNA-Ebene in der untersuchten Hirnregion des retrosplenialen Cortex im Gehirn der infantilen Ratte. Signifikant erhöhte Werte sind bei einer Dosis von 60 mg/kg MDMA nach 6, 12, 24 und auch noch nach 48 Stunden nachweisbar, mit einem Maximum der Hochregulation nach 24 Stunden. Als interner Standard wurde 18S rRNA verwendet und die mRNA für BDNF ins Verhältnis zu 18S rRNA gesetzt. Die Angaben erfolgen in Prozent bezogen auf die Kontrolltiere (Kontrolltiere = 100%). Eine Varianzanalyse zum Vergleich der verschiedenen Überlebenszeiten mit den Kontrolltieren wurde mit one-way ANOVA (Newman-Keuls Multiple Comparison Test, \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) durchgeführt.

### Einfluss von MDMA auf die Expression von BDNF



A



B

#### Abbildung 3.10: Semiquantitative PCR zur Bestimmung von BDNF.

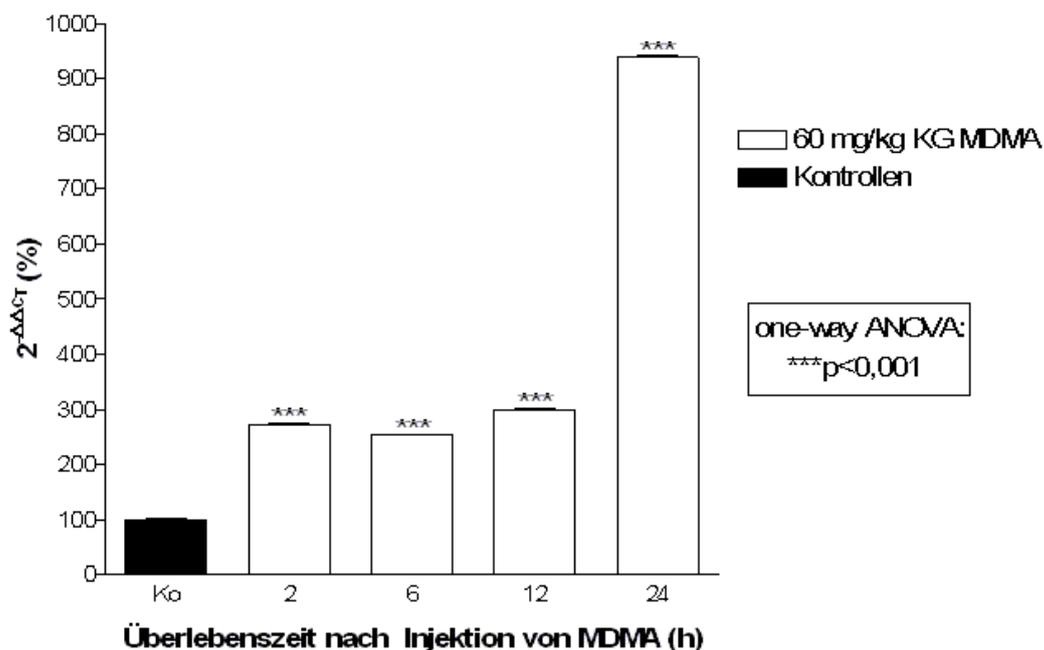
Untersucht wurde der retrospleniale Kortex nach einmaliger Injektion von 60 mg/kg KG MDMA am 7. Lebenstag der Versuchstiere (P7). Nach zuvor definierten Überlebenszeiten von 2, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden wurden die Tiere getötet und die Gehirne entsprechend aufgearbeitet. 18S rRNA galt als interner Standard zu dem die Werte von BDNF ins Verhältnis gesetzt wurden (Angaben erfolgen in %). Die Kontrolltiere erhielten NaCl 0,9 % und wurden mit 100% gleichgesetzt. Wie in Abbildung A zu ersehen ist, steigert MDMA die mRNA-Expression von BDNF signifikant gegenüber den Kontrollen nach 6, 12, 24 und 48 Stunden Überlebenszeit, mit einem Maximum bei 24 Stunden. Nach 72 Stunden ist keine signifikante Erhöhung der Transkription von BDNF mehr festzustellen. Die Varianzanalyse erfolgte mit one-way ANOVA (Newman-Keuls Multiple Comparison Test, n=5 Versuchstiere pro Gruppe).

In Abbildung B ist ein Polyacrylamidgel abgelichtet, welches mit zunehmender Überlebenszeit für BDNF verstärkte dunklere Banden zeigt. Daraus ergab sich nach densitometrischer Messung und statistischer Analyse eine Hochregulation der mRNA-Expression von BDNF.

Aus diesen Untersuchungen geht somit hervor, dass eine Abhängigkeit von der Überlebenszeit nach der Injektion von MDMA für die Regulation von BDNF besteht und nach 24 Stunden ein Maximum erreicht.

Zur Kontrolle und Bestätigung der aus der semiquantitativen PCR gewonnenen Erkenntnisse wurde zusätzlich eine real-time PCR durchgeführt. Es wurde wiederum Material des retrosplenialen Cortex von Tieren, die eine einmalige Injektion von 60 mg/kg KG MDMA am siebten Lebenstag (P7) erhalten haben, verwendet. Die Überlebenszeit betrug 2, 6, 12 und 24 Stunden. Bei der real-time PCR ergibt sich gleichfalls ein durch MDMA induzierter signifikanter Anstieg der Gentranskription für BDNF, allerdings ist dieser hier schon nach 2 Stunden zu verzeichnen. Wie der Abbildung 3.11 zu entnehmen ist, liegt das Maximum der hier untersuchten Überlebenszeiten ebenso wie bei der semiquantitativen PCR bei 24 Stunden. Die unterschiedliche Transkription wird als n-fache Expression mit Hilfe des  $\Delta\Delta C_T$ -Wertes angegeben. Wichtig bei dieser Berechnung ist eine gleiche Effizienz der beiden beteiligten PCR-Reaktionen. Die  $C_T$ -Werte werden hierbei voneinander abgezogen, die beiden  $\Delta C_T$ -Werte der einzelnen Gruppen ebenfalls voneinander abgezogen und in die Gleichung: n-fache Expression =  $2^{-(\Delta\Delta CT)}$  eingesetzt.

### Einfluss von MDMA auf die Expression von BDNF



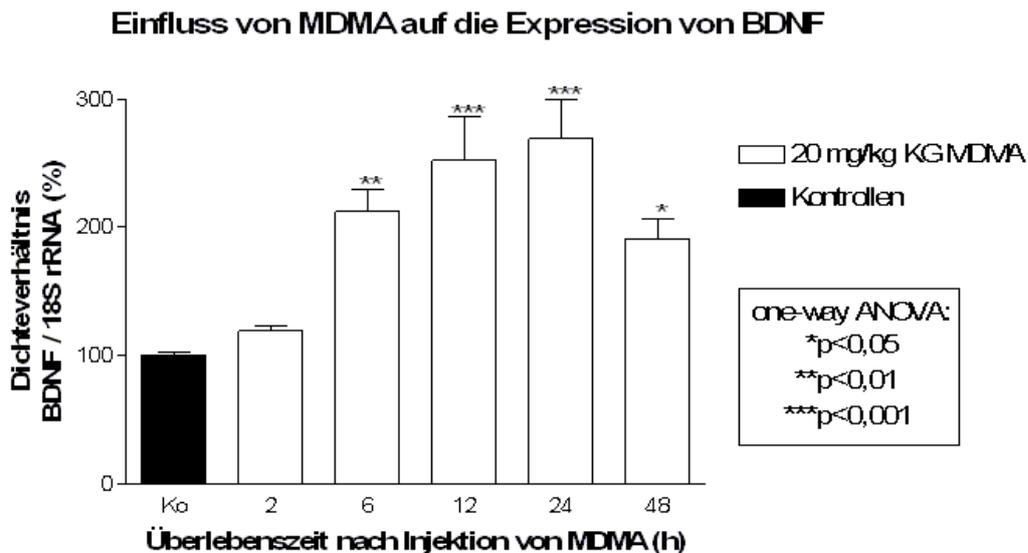
**Abbildung 3.11: Real-time PCR zur Bestimmung von BDNF.**

Untersucht wurde der retrospleniale Cortex nach einmaliger Injektion von 60 mg/kg KG MDMA am 7. Lebenstag der Versuchstiere (P7). Nach zuvor definierten Überlebenszeiten von 2, 6, 12 und 24 Stunden wurden die Tiere getötet und die Gehirne entsprechend aufgearbeitet. Angaben erfolgen in  $2^{-(\Delta\Delta CT)}$  (in %). Die Kontrolltiere erhielten Natriumchloridlösung 0,9 % und wurden mit 100 % gleichgesetzt. MDMA steigert die mRNA-Expression von BDNF signifikant gegenüber den Kontrollen nach 2, 6, 12, 24 Stunden Überlebenszeit, mit einem Maximum der hier erhobenen Überlebenszeiten bei 24 Stunden. Die Varianzanalyse erfolgte mit one-way ANOVA (Newman-Keuls Multiple Comparison Test, n=5 Versuchstiere pro Gruppe).

Resümierend aus den durchgeführten Untersuchungen haben sich die Ergebnisse der semiquantitativen PCR durch die real-time PCR bestätigen lassen. Der Nachweis der Hochregulation der Transkription von BDNF induziert durch MDMA ist somit durch zwei verschiedene Methoden erbracht. Da die real-time PCR sensitiver ist, sind die Ergebnisse aus dieser Untersuchung als verlässlicher einzustufen. Auszugehen ist daher von einer verstärkten Expression auf mRNA-Ebene für BDNF schon zwei Stunden nach Injektion von MDMA (vgl. Abbildungen 3.10 und 3.11).

### **3.3.2 Genexpression von BDNF bei einer Dosis von 20 mg/kg KG MDMA**

Um herauszufinden, ob auch eine geringere Dosis zu einem deckungsgleichen Anstieg der Transkriptionsraten von BDNF führt, wurde in der nächsten Versuchsreihe eine Dosis von 20 mg/kg KG MDMA gewählt. Wiederum wurden nach einer Überlebenszeit von 2, 6, 12, 24 und 48 Stunden die Transkriptionsraten ermittelt. Auf mRNA-Ebene wurde mit der semiquantitativen PCR BDNF quantitativ analysiert. MDMA führt ähnlich wie bei einer Dosis von 60 mg/kg KG zu einer vermehrten Transkription von BDNF in der untersuchten Hirnregion des retrosplenialen Cortex im Gehirn der infantilen Ratte. Wie in Abbildung 3.12 veranschaulicht, ist eine signifikant erhöhte Menge an mRNA für BDNF bei einer Dosis von 20 mg/kg MDMA nach 6, 12, 24 und auch noch nach 48 Stunden nachweisbar. Ein Maximum der Hochregulation ergibt sich auch bei dieser Dosis nach 24 Stunden. Als interner Standard wurde 18S rRNA verwendet und die Transkription von BDNF ins Verhältnis zu 18S rRNA gesetzt. Die Angaben erfolgen in Prozent, die Kontrollen wurden mit 100 % gleichgesetzt. Die statistische Auswertung wurde mit der Varianzanalyse nach one-way ANOVA (Newman-Keuls Multiple Comparison Test, n=4-5 Versuchstiere pro Gruppe) durchgeführt.



**Abbildung 3.12: Semiquantitative PCR zur Bestimmung von BDNF bei 20 mg/kg KG MDMA.**

Untersucht wurde der retrospleniale Cortex nach einmaliger Injektion von 20 mg/kg KG MDMA am 7. Lebenstag der Versuchstiere (P7). Nach zuvor definierten Überlebenszeiten von 2, 6, 12, 24 und 48 Stunden wurden die Tiere getötet und die Gehirne entsprechend aufgearbeitet. 18S rRNA wurde als interner Standard verwendet, zu dem die Werte von BDNF ins Verhältnis gesetzt wurden (Angaben erfolgen in %). Die Kontrolltiere erhielten Natriumchloridlösung 0,9 % und wurden mit 100 % gleichgesetzt. MDMA steigert die mRNA-Expression von BDNF signifikant gegenüber den Kontrollen nach 6, 12, 24 und 48 Stunden Überlebenszeit, mit einem Maximum bei 24 Stunden. Nach 72 Stunden ist keine signifikante Erhöhung der Transkription von BDNF festzustellen. Die Varianzanalyse erfolgte mit one-way ANOVA (Newman-Keuls Multiple Comparison Test, n=4-5 Versuchstiere pro Gruppe).

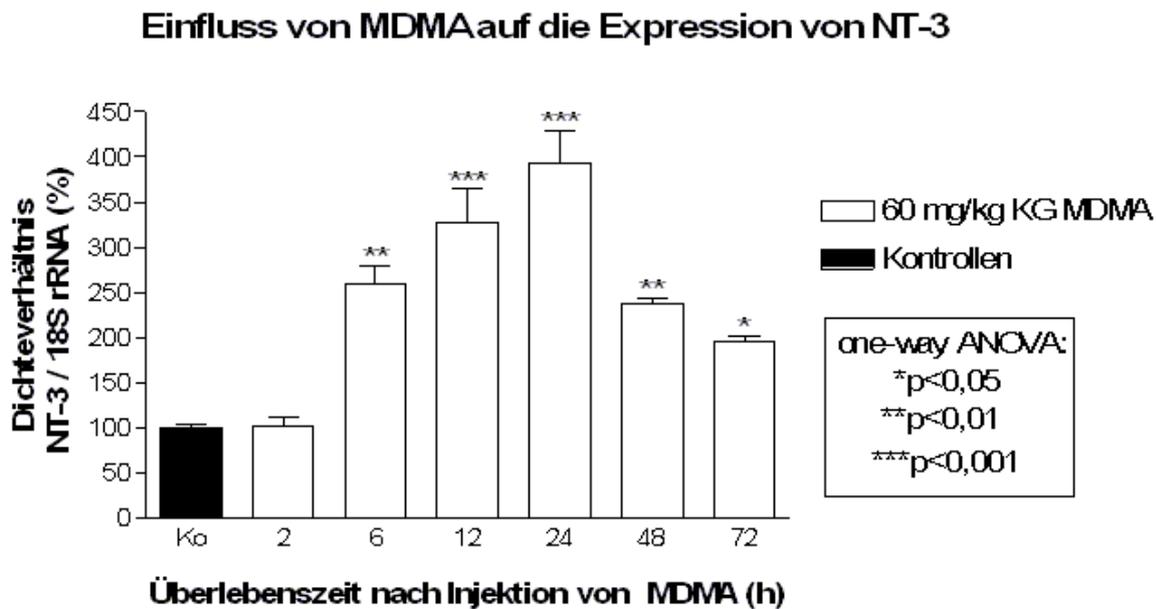
Schlussfolgernd ist festzustellen, dass MDMA eine vermehrte Transkription von BDNF in der untersuchten Hirnregion des retrosplenialen Cortex im Gehirn der infantilen Ratte auf mRNA-Ebene, nicht nur bei 60 mg/kg KG, sondern auch schon bei 20 mg/kg KG auslöst.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass eine **Zeitabhängigkeit**, genauer gesagt eine Abhängigkeit von der Überlebenszeit nach der Injektion für die Regulation von BDNF besteht und nach 24 Stunden ihr Maximum erreicht.

Dagegen kann die Frage der **Dosisabhängigkeit** aus den gewonnenen Ergebnissen nur eingeschränkt beantwortet werden. Denn insgesamt wurden nur zwei verschiedene Dosen untersucht und bei einem Vergleich der Resultate bei 20 und 60 mg/kg KG MDMA eine nahezu identische Expression für BDNF auf mRNA-Ebene festgestellt. Bei ausschließlicher Betrachtung dieser beiden Dosen kann geschlussfolgert werden, dass keine Dosisabhängigkeit für die Expression von BDNF besteht (vgl. Abbildungen 3.12 und 3.10).

### 3.3.3 Genexpression von NT-3 und NGF

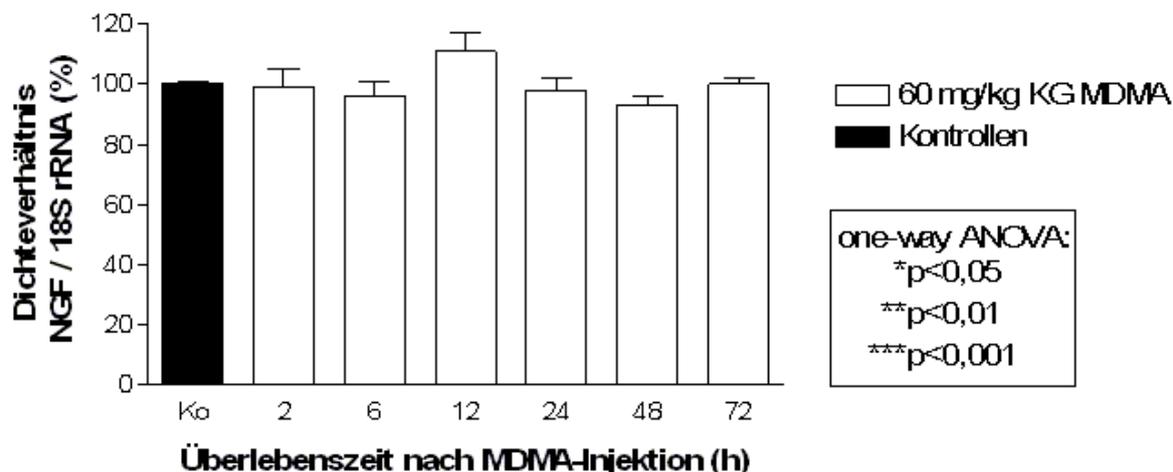
Für eine vergleichende Analyse sollten zunächst noch zwei weitere Wachstumsfaktoren untersucht werden, um der Frage nachzugehen, ob MDMA nur spezifisch die Transkription für BDNF verändert oder eventuell auch eine vermehrte Expression anderer Wachstumsfaktoren induziert. Die Versuche wurden gleichermaßen wie für BDNF durchgeführt. Der Abbildung 3.13 ist zu entnehmen, dass sich der Anstieg der Expression von NT-3 ähnlich zu dem von BDNF verhält. Eine signifikante Zunahme der mRNA-Menge von NT-3 gegenüber den Kontrolltieren ist nach 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden zu verzeichnen. Das Maximum liegt ebenso wie bei BDNF bei 24 Stunden. Für NGF konnte im Vergleich zu den Kontrollen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein signifikanter Anstieg festgestellt werden (vgl. Abbildung 3.14).



**Abbildung 3.13: Semiquantitative PCR zur Bestimmung von NT-3.**

Untersucht wurde der retrospleniale Cortex nach einmaliger Injektion von 60 mg/kg KG MDMA am 7. Lebenstag der Versuchstiere (P7). Nach zuvor definierten Überlebenszeiten von 2, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden wurden die Tiere getötet und die Gehirne entsprechend aufgearbeitet. 18S rRNA wurde als interner Standard verwendet, zu dem die Werte von NT-3 ins Verhältnis gesetzt wurden (Angaben erfolgen in %). Die Kontrollen wurden mit 100 % gleichgesetzt. MDMA steigert die mRNA-Expression von NT-3 signifikant gegenüber den Kontrollen nach 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden Überlebenszeit, mit einem Maximum bei 24 Stunden. Nach 2 Stunden ist noch keine signifikante Erhöhung der Transkription von NT-3 festzustellen. Die statistische Analyse erfolgte mit einer Varianzanalyse nach one-way ANOVA (Newman-Keuls Multiple Comparison Test, n=5-9 Versuchstiere pro Gruppe).

### Einfluss von MDMA auf die Expression von NGF



**Abbildung 3.14: Semiquantitative PCR zur Bestimmung von NGF.**

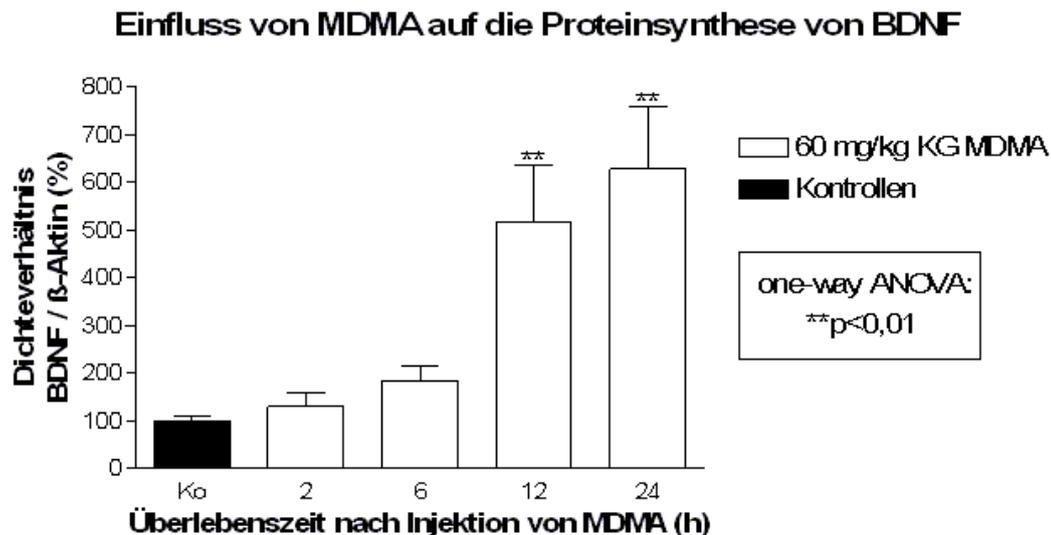
Untersucht wurde der retrospleniale Cortex nach einmaliger Injektion von 60 mg/kg KG MDMA am 7. Lebenstag der Versuchstiere (P7). Nach zuvor definierten Überlebenszeiten von 2, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden wurden die Tiere getötet und die Gehirne entsprechend aufgearbeitet. 18S rRNA wurde als interner Standard verwendet, zu dem die Werte von NGF ins Verhältnis gesetzt wurden (Angaben erfolgen in %). Die Kontrollen wurden mit 100 % gleichgesetzt. MDMA beeinflusst die Transkription von NGF nicht. Die statistische Analyse erfolgte mit einer Varianzanalyse nach one-way ANOVA (Newman-Keuls Multiple Comparison Test, n=5-9 Versuchstiere pro Gruppe).

Zusammenfassend ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass die mRNA-Expression von BDNF und NT-3 spezifischerweise durch MDMA beeinflusst werden. Bei beiden Neurotrophinen war ein signifikanter Anstieg der Transkriptionsraten festzustellen. Sowohl BDNF, also auch NT-3 erreichten ein Maximum nach 24 Stunden. Dagegen war die Expression von NGF von MDMA unabhängig. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte gab es eine signifikante Veränderung des Expressionsgehaltes.

### 3.3.4 Einfluss von MDMA auf die Regulation von BDNF auf Proteinebene

Um zu überprüfen, ob eine gesteigerte Transkription tatsächlich auch in eine gesteigerte Menge des exprimierten Proteins BDNF resultiert, wurde mittels dem Western Blot-Verfahren die Proteinregulation für BDNF in Abhängigkeit von MDMA untersucht. Die Überlebenszeiten nach einer einmaligen Injektion von 60 mg/kg KG MDMA bei sieben Tage alten Ratten lagen bei 2, 6, 12 und 24 Stunden.

Im Western Blot zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Proteinregulation für BDNF bei 12 und 24 Stunden gegenüber den Kontrolltieren, die Placebo erhielten (vgl. Abbildung 3.15). Das Maximum der hier untersuchten Überlebenszeiten lag bei 24 Stunden, wobei dies gleichzeitig die längste Dauer der untersuchten Überlebenszeiten darstellte. Somit ist eine durch MDMA induzierte Steigerung der Genexpression von BDNF nach 12 und 24 Stunden Überlebenszeit ebenso auf Proteinebene belegt.



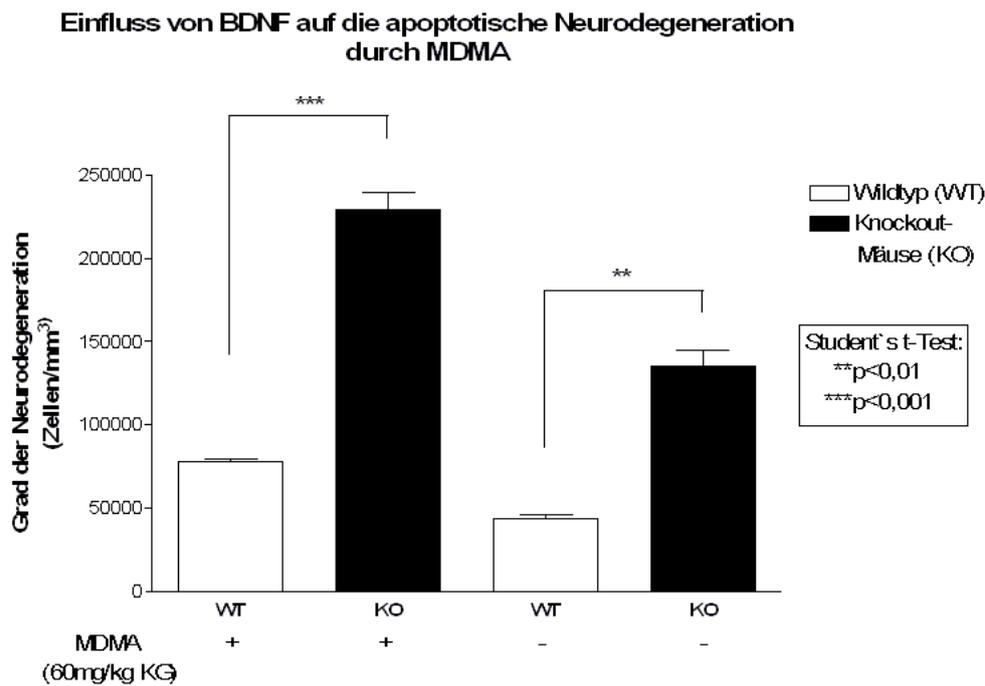
**Abbildung 3.15: Proteinanalyse mittels Western Blot zur Bestimmung von BDNF.**

Untersucht wurde der retrospleniale Cortex nach einmaliger Injektion von 60 mg/kg KG MDMA am 7. Lebenstag der Versuchstiere (P7). Nach zuvor definierten Überlebenszeiten von 2, 6, 12 und 24 Stunden wurden die Tiere getötet und die Gehirne entsprechend aufgearbeitet.  $\beta$ -Aktin wurde als interner Standard verwendet, zu dem die Werte von BDNF ins Verhältnis gesetzt wurden (Angaben erfolgen in %). Die Kontrollen wurden mit 100 % gleichgesetzt. MDMA steigert die Regulation des Proteins BDNF signifikant gegenüber den Kontrollen nach 12 und 24 Stunden Überlebenszeit, mit einem Maximum bei 24 Stunden. Die statistische Auswertung erfolgte mit einer Varianzanalyse nach one-way ANOVA (Newman-Keuls Multiple Comparison Test, n=5 Versuchstiere pro Gruppe).

Schlussfolgernd ist zum einen eine Erhöhung der Transkriptionsraten (vgl. Abbildung 3.10) durch MDMA-Injektionen mit Hilfe einer PCR nachgewiesen. Zum anderen spiegelt sich eben dieser Anstieg in ähnlicher Weise auf der Ebene der Proteinexpression von BDNF im Western Blot als tatsächlich synthetisiertes Protein wider.

### 3.4 Einfluss von BDNF auf die apoptotische Neurodegeneration

Um die Funktion von BDNF bei der Verabreichung von neurotoxischen Substanzen, wie MDMA näher zu beleuchten, wurden Versuche mit BDNF Knockout Mäusen durchgeführt. Wenn die These zutrifft, dass BDNF eine neuroprotektive Aufgabe zukommt, so müssten die Knockout Tiere einen noch stärkeren Schaden an den Nervenzellen aufzeigen als der Wildtyp. Für diese Versuche wurden sieben Tage alte CD1/BDNF +/- Knockout Mäuse verwendet. Sie bekamen eine Dosis von 60 mg/kg KG bzw. Natriumchloridlösung 0,9 % intraperitoneal appliziert. 24 Stunden nach der Injektion wurden die Tiere getötet, intrakardial wie unter 2.1.2 beschrieben perfundiert und die Hirnschnitte nach der TUNEL-Färbemethode (vgl. 2.1.5) immunhistochemisch gefärbt. Die Hirnschnitte wurden dann mittels der stereologischen Dissektionsmethode in verschiedenen Hirnregionen ausgezählt und die numerische Dichte der degenerierten Zellen (Zellen/mm<sup>3</sup>) bestimmt. Die Dichten der einzelnen Hirnregionen wurden zu einem Gesamtscore der Nervenzelldegeneration addiert. Die Säulen zeigen die Mittelwerte und SEM (Standardfehler) der Gesamtscores pro Versuchsgruppe als Grad der Neurodegeneration an. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's t-Test für unverbundene Stichproben. In den Gehirnen der BDNF Knockout Mäuse zeigten sich signifikant vermehrt degenerierte Zellen im Vergleich zu den Kontrollen des Wildtyps, obwohl beide Gruppen die gleiche Dosis von 60 mg/kg KG MDMA erhalten haben (vgl. Abbildung 3.16). In Folge dessen ist bei einem verminderten Vorliegen von BDNF der Grad der Neurodegeneration erhöht. Zusätzlich wird in diesem Versuch deutlich, dass auch die BDNF Knockout Tiere, denen keine exogene Noxe, sondern nur physiologische Kochsalzlösung appliziert wurde, eine signifikant vermehrte apoptotische Zelldegeneration aufweisen, im Vergleich zum Wildtyp. Bei einem weiteren Vergleich der beiden Gruppen der Knockout Mäuse, wird deutlich, dass die Neurodegeneration signifikant erhöht ist unter den Knockout Mäusen, die MDMA erhielten, gegenüber den Knockout Mäusen, die als Kontrollgruppe Kochsalzlösung erhielten. Folglich ist dieser vermehrte Schaden eindeutig MDMA-abhängig und der neurotoxischen Wirkung von MDMA zuzuschreiben.



**Abbildung 3.16: Der Einfluss von BDNF auf die apoptotische Neurodegeneration.**

Untersucht wurden verschiedene Hirnregionen von sieben Tage alten BDNF knockout Mäusen nach der Applikation von 60 mg/kg KG MDMA bzw. Natriumchloridlösung. Die TUNEL-gefärbten Präparate wurden mittels der stereologischen Dissektionsmethode in verschiedenen Hirnregionen ausgezählt und die numerische Dichte der degenerierten Zellen (Zellen/mm<sup>3</sup>) bestimmt. Die Säulen geben die Summe der Dichten der Hirnregionen als Mittelwerte und SEM (Standardfehler) pro Versuchsgruppe an. MDMA verstärkt in den Gehirnen der BDNF knockout Mäuse die Degeneration der Nervenzellen im Vergleich zu den Kontrollen des Wildtyps nahezu um das Dreifache.

## 4 Diskussion

Ein Risikofaktor für motorische und kognitive Funktionsstörungen während der frühkindlichen Entwicklung könnte ein Drogenkonsum von MDMA (3,4 Methylendioxyamphetamin, Ecstasy) der Mutter während der Schwangerschaft sein. In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass Amphetamine, zu denen MDMA gehört, zum einen das Risiko für eine Frühgeburt erhöhen [69, 56], zum anderen existieren Nachweise im Tierversuch, dass MDMA eine degenerative Wirkung auf Neuronen im sich entwickelnden Gehirn hat [77], die auch beim Menschen eine Neurotoxizität auf das unreife Gehirn vermuten lassen.

Ungeachtet der Tatsache, dass Ecstasy unter Verdacht steht, das Risiko für angeborene Fehlbildungen ebenfalls zu erhöhen [33], wurde im Rahmen dieser Dissertation ausschliesslich die pränatale Wirkung von Ecstasy (MDMA) auf das Gehirn des ungeborenen Kindes studiert. Als Tiermodell dienten Han Wistar Ratten im Alter von 3 bis 21 Tagen. Dieser Lebensabschnitt in dem die Phase des rapiden Hirnwachstums stattfindet, umfasst bei Ratten die ersten drei Lebenswochen mit maximaler Wachstumsgeschwindigkeit am siebten Lebenstag und ist vergleichbar beim Menschen mit dem Zeitraum vom dritten Trimenon der Schwangerschaft bis zum Beginn des dritten Lebensjahres [30]. Aus diesem Grund eignet sich die Ratte besonders als Tiermodell, um diese Fragestellung zu beantworten.

### 4.1 Neurodegeneration durch MDMA im unreifen Rattengehirn

In der vorliegenden Dissertationsarbeit konnte gezeigt werden, dass MDMA während der Entwicklung des neonatalen Rattengehirnes eine neurodegenerative Wirkung entfaltet. Mit der DeOlmos Kupfer-Silberfärbung wurden degenerierte neuronale Zellen im ZNS detektiert. Im Speziellen sind Silberfärbungen sensible Indikatoren für einen Schaden der durch neurotoxische Substanzen verursacht wurde [7]. Die Schwellendosis von MDMA, bei der eine signifikante Neurodegeneration im jungen Rattengehirn ausgelöst wurde, lag bei 60 mg/kg KG (Körpergewicht) bei einer Überlebenszeit von 24 Stunden.

Aus den histologischen Untersuchungen dieser Arbeit wurde deutlich, dass eine dreimalige Injektion von 20 mg/kg KG MDMA aller 8 Stunden eine ebenso hohe Nervenzelldegeneration verursacht wie die einmalige Injektion von 60 mg/kg KG (vgl. Abbildung 3.7). Damit ist zumindest eine additive neurotoxische Wirkung für MDMA bestätigt. Darüber hinaus war eine minimal stärkere toxische Wirkung von MDMA bei einer dreimaligen Injektion von 20 mg/kg KG festzustellen (vgl. Abbildung 3.7). Da bei dieser Untersuchung aber eine relativ hohe Streuung vorlag konnte

keine Signifikanz erhoben werden. Nichtsdestoweniger konnte hier ein Trend beobachtet werden, so dass eine Potenzierung der Neurotoxizität durch häufigen Gebrauch der Droge in kurzen Abständen gut vorstellbar wurde. Eine Potenzierung der Neurotoxizität wäre auch von dem Aspekt her denkbar, als dass MDMA zu einer Hemmung seines eigenen Metabolismus und somit zu einer Akkumulation bei multiplem Konsum führt [24]. Um diesen Sachverhalt genauer zu beleuchten könnten zukünftige Versuchsreihen mit einer größeren Fallzahl aufschlussreich sein, um die große Streuung, die bei diesem Versuch problematisch für die Auswertung war, gering zu halten. Der Grad der Apoptose ist laut *Capela et al.* abhängig von der verwendeten Dosis [18]. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation stimmen insofern damit überein, als das auch hier eine Dosisabhängigkeit beobachtet werden konnte (vgl. Abbildung 3.7). Während in dieser Studie bei 20 und 40 mg/kg KG keine signifikante Neurodegeneration zu ermitteln war, kam es sowohl bei 60 mg/kg KG, als auch bei einer dreimaligen Injektion von 20 mg/kg KG aller 8 Stunden zu einer signifikanten Nervenzelldegeneration bei 7 Tage alten Ratten.

In einer mit dem histologischen Teil dieser Arbeit vergleichbaren Studie von *Jensen et al.* 1993 wurde ebenfalls die DeOlmos Kupfer-Silberfärbung verwendet, um Regionen im adulten Rattengehirn zu beschreiben, die durch MDMA geschädigt wurden. MDMA verursachte dabei einen dosisabhängigen Anstieg an silberpositiven Zellen in verschiedenen Hirnregionen. Die meisten gefärbten Zellen wurden von den Autoren assoziiert mit degenerierten Axonendigungen, aber auch Zellkörper wurden durch die Silberfärbung dargestellt [52]. Diese Ergebnisse, verdeutlichen, dass der durch MDMA in der Silberfärbung sichtbare Anstieg an degenerierten Axonen, nicht die Neurotoxizität auf serotonerge Axone reflektiert.

Welcher Zusammenhang besteht zwischen der durch MDMA verursachten Schädigung der serotonergen Axone und dem in dieser Arbeit festgestellten neurodegenerativen Prozess? In der Literatur existieren unzählige Studien über die schädliche Wirkung von MDMA auf die serotonergen Axonendigungen bei Nagern und Affen [59, 92]. Diese sind allerdings beschränkt auf adulte Tiere. Bei neonatalen Ratten ist eine anhaltende Serotoninspiegelsenkung, die bei adulten Tieren mittlerweile unumstritten ist, fraglich. Die Ergebnisse von Tierstudien zu diesem Aspekt sind zum Teil kontrovers. In einigen Studien wird das Ausmaß der Verringerung an Serotonin um ein Vielfaches kleiner beschrieben als bei adulten Ratten [12]. Andere Autoren berichten sogar von keiner persistierenden Serotoninspiegelsenkung bei neonatalen Ratten [11, 2]. Trotzdem ist die Neurotoxizität im Bereich des größten Hirnwachstums um den siebten Lebenstag laut den erzielten Ergebnissen aus dieser Arbeit (vgl. 3.1.1) am ausgeprägtesten. Demzufolge ist nicht die anhaltende Serotoninspiegelsenkung oder die Schädigung an den serotonergen Nervenendigungen für den erhöhten Apoptosescore im neonatalen Gehirn verantwortlich. Vielmehr erhebt sich dadurch die Frage, welche anderen Mechanismen, wenn nicht die Schädigung an serotonergen Nervenendigungen durch die Exposition mit MDMA zu kognitiven Defiziten und Nervenzelluntergängen führt. Es existieren bedauerlicherweise nur wenige Studien, welche die Neurotoxizität von MDMA auf das neonatale Gehirn der Ratte untersucht haben. In einer Arbeit von *Broening et al.* wurden bei 11 bis 20 Tage alten neonatalen Ratten dosisabhängige Verschlechterungen der Lernerfolge und der Ge-

dächtnisleistungen nach MDMA Applikation beobachtet. Diese stünden, so die Autoren nicht im Zusammenhang mit den Veränderungen der Mengen, die an Serotonin, Dopamin und Noradrenalin nach MDMA-Gabe gemessen wurden [12]. Diese Studie verstärkt somit auch den Verdacht, dass ein anderer Mechanismus als die Schädigung an serotonergen Neuronen den Zelluntergang und auch die Verschlechterungen in den Lern- und Gedächtnisleistungen verursachen muss. Der neurodegenerative Schaden, der gleichzusetzen ist mit der Toxizität von MDMA ist demnach laut den aus dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen abhängig von der Dosis, der Überlebenszeit und dem Alter der Tiere. Außerdem ist der Grad der Neurodegeneration abhängig von der untersuchten Hirnregion der neonatalen Ratte, worauf im folgenden Abschnitt im Speziellen eingegangen wird. Die Ergebnisse in einer Arbeit von *Capela et al.* stimmen mit denen dieser Arbeit überein. Sie beschreiben eine Dosis- und Zeitabhängigkeit der Toxizität von MDMA. Zusätzlich betonen die Autoren eine Temperaturabhängigkeit der Neurotoxizität von MDMA [18], die in der vorliegenden Dissertation nicht untersucht wurde, aber dennoch aufgrund des relevanten Einflusses auf die Neurodegeneration durch MDMA in Abschnitt 4.1.4 erörtert werden soll.

#### **4.1.1 Betroffene Hirnregionen der neurotoxischen Wirkung von MDMA**

In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, auf welche Hirnregionen MDMA bei sieben Tage alten Ratten eine signifikant neurodegenerative Wirkung ausübt. Signifikante Nervenzelluntergänge wurden mit der Silberfärbung im Kortex frontalis, Kortex parietalis, Kortex cinguli, Septum, Thalamus ventralis, Hypothalamus ventromedialis und der CA1-Region des Hippocampus gefunden (vgl. Tabelle 3.1). In der Fluoro-Jade B und TUNEL-Färbung zeigte sich ein ähnliches Verteilungsmuster an neuronaler Degeneration in den äquivalenten Hirnregionen.

*Schmued et al.* zeigten in einer Studie von 2003 ähnliche Ergebnisse mit einer Fluoro-Jade B Färbung nach einer einmaligen Injektion von MDMA mit einer Dosis von 20 und 40 mg/kg KG. Übereinstimmend wurden ebenfalls im parietalen Cortex, im ventromedialen und ventrolateralen Thalamus vermehrte Neurodegenerationen festgestellt, zusätzlich auch in anderen speziell von dieser Arbeitsgruppe untersuchten Regionen des Rattengehirns. Zum Beispiel als besonders auffällig beschrieben wird eine mit verstärktem neurodegenerativem Zelluntergang reagierende, als *Tenia tecta* bezeichnete Hirnregion [101], die auch während der Untersuchungen zu dieser Dissertation unter dem Mikroskop durch einen vermehrten Zelluntergang auffiel. Allerdings wurde diese Hirnregion nicht mit der quantitativen Dissektionsmethode analysiert, sondern war ein rein objektiv mikroskopisch beobachteter Befund (vgl. Abbildung 3.2).

### 4.1.2 Gesteigerte Vulnerabilität des unreifen Gehirns für externe Noxen

In den letzten Jahren wurden mehr und mehr Arzneimittel und Drogen als Auslöser des programmierten Zelltodes im sich entwickelnden Gehirn entdeckt und untersucht. So wurde beschrieben, dass Wirkstoffe, wie Sedativa [48], Anästhetika [53], Antikonvulsiva [8], die in neonatalen Intensivstationen eingesetzt werden und die physiologische Aktivität von Synapsen im Zentralen Nervensystem verändern, massive apoptotische Neurodegenerationen im infantilen Ratten- und Mäusegehirn auslösen können. Auch Alkohol, während der Schwangerschaft und/oder Stillzeit konsumiert, hat diese Veränderungen auf das sich entwickelnde Gehirn zur Folge [47]. Dieser neurotoxische Effekt anhand von verschiedenen Substanzen bei Nagern studiert, ist streng limitiert auf einen Entwicklungsabschnitt, der als Periode des rapiden Hirnwachstums (vgl. Abschnitt 1.2) bezeichnet wird. Beim Menschen beginnt dieser Zeitraum pränatal ab der 23. SSW, hat seinen Höhepunkt zum Zeitpunkt der Geburt und dauert ungefähr bis zum Beginn des dritten Lebensjahres [30]. Die Neurotoxizität von MDMA bei der neonatalen Ratte ist ebenso altersabhängig und fällt in den Zeitraum der stärksten Hirnwachstumsphase. Die höchste Vulnerabilität gegenüber der neurotoxischen Wirkung von MDMA fällt mit der Phase des rapiden Hirnwachstums zusammen, wobei das Maximum der Wachstumsgeschwindigkeit am siebten Lebenstag der Ratte beobachtet wird [30]. In der vorliegenden Arbeit war das Gehirn der sieben Tage alten Ratte ebenfalls am meisten vulnerabel und es fand sich quantitativ der größte Schaden im Gehirn im Vergleich zur Kontrollgruppe (vgl. Abschnitt 3.1.1). Diese altersabhängige Empfindlichkeit des Rattengehirns gegenüber Noxen steht im Einklang mit zahlreichen Studien. Welche genauen Mechanismen der gesteigerten Sensitivität des unreifen Gehirns gegen schädigende Einflüsse zugrunde liegen, sind bisher weitgehend unbekannt. Es wird davon ausgegangen, dass entwicklungsbedingte Veränderungen im NMDA-Rezeptorsystem eine Rolle spielen [48]. Das Tiergehirn hat eine gesteigerte Empfindlichkeit in der ersten Lebenswoche, was mit einer hypersensitiven Phase mit maximaler Vulnerabilität am siebten postnatalen Tag für NMDA übereinstimmt [49]. Neuere Studien zeigen, dass durch MDMA eine Hochregulation der Gentranskriptionslevel der Glutamatrezeptoruntereinheiten von NMDA (NR1, NR2A und NR2B) im Kortex und Hypothalamus bei adulten Ratten stattfindet [58]. Ein Grund für die erhöhte Vulnerabilität des sich entwickelnden Gehirns gegenüber MDMA könnte ein unreifes Antioxidationssystem sein. Durch MDMA entstehen vermehrt freie Radikale und neonatale Tiere sind nicht in der Lage Antioxidationssysteme, wie Superoxid-dismutase, Katalase oder Glutathionperoxidase adäquat hochzuregulieren [20, 18]. Die möglichen Mechanismen, die zu einer gesteigerten Neurodegeneration durch MDMA führen, seien im folgenden Abschnitt gegenüber gestellt.

### 4.1.3 Mechanismen der Neurodegeneration induziert durch MDMA

Eine der zentralen Fragen in der Forschung mit MDMA ist, welche Mechanismen zum Zelluntergang im Gehirn führen. Die Annahme, dass Apoptose ein vorherrschendes Phänomen in diesem Sachverhalt ist, scheint mittlerweile unangefochten. Erstmals wurde die Aktivierung der

apoptotischen Kaskade durch MDMA in vivo im unreifen Gehirn der neonatalen Ratte von Meyer *et al.* 2004 nachgewiesen [77]. Zuvor gab es auch schon eine Arbeit von 1999, die zeigen konnte, dass der apoptotische Signalweg in vitro zumindest beteiligt ist an einer Amphetamin-induzierten Neurotoxizität [109]. Auch in einer anderen Studie von Capela *et al.* wurde der Ursprung der Neurodegeneration durch Untersuchungen mit dem Phasenkontrastmikroskop und einer Ethidiumbromid/Akridin-Orange Färbung zu einem überwiegenden Teil der Apoptose zugeschrieben. Im Phasenkontrastmikroskop konnten die typischen morphologischen Kennzeichen der Apoptose gesehen werden und bestätigten den apoptotischen Ursprung der Neurodegeneration. MDMA induzierte eine DNA-Fragmentation in neuronalen Zellkulturen, was ein typisches Zeichen für den programmierten Zelltod ist [18].

In der vorliegenden Arbeit zeigten die nach TUNEL gefärbten Hirnschnitte im Vergleich zu den nach DeOlmos gefärbten Präparaten ein ähnliches Verteilungsmuster degenerierter Zellen in den äquivalenten Hirnregionen (vgl. Abbildung 3.4). Die geschädigten Zellen waren unter der Färbung TUNEL-positiv. Dies beweist, dass nukleosomale DNA-Fragmentierung in den betroffenen degenerierten Neuronen stattfand. Diese DNA-Fragmentierung ist eines der Kennzeichen des programmierten Zelltodes [39]. Andere Mechanismen wie exzitotoxische Neurodegeneration scheinen laut Capela *et al.* eine untergeordnete Rolle zu spielen, d.h. nur ein geringer Teil des neuronalen Zellunterganges scheint auf einen exzitotoxischen (nekrotischen) Zelltod zurückzugehen, wobei unklar bleibt, welche weiteren Mechanismen zusätzlich zum Zelluntergang führen können. Der Grad der Apoptose ist, so Capela *et al.* abhängig von der Dosis und der Körpertemperatur der Versuchstiere [18].

Die in dieser Dissertation gewonnenen Ergebnisse, insbesondere der Nachweis des Zellunterganges in den nach TUNEL und Fluoro-Jade gefärbten Gehirnen, bestätigen weiterhin den Fokus auf die Neurodegeneration durch Apoptose zu legen. Molekularbiologische Studien konnten in der Vergangenheit einen Nachweis für eine erhöhte Aktivierung von Caspase 3 nach MDMA Applikation erbringen [54], Caspase 3 ist eine der letzten Effektorcaspasen in der Kaskade des programmierten Zelltodes. Die Versuchsreihe von Jiménez *et al.* spricht ebenso für eine Aktivierung der apoptotischen Kaskade durch MDMA, der eine mitochondriale Dysfunktion mit nachfolgender Freisetzung von Cytochrom C zugrunde liegen soll [54]. Es existieren mehrere Mechanismen, die für die Toxizität von MDMA verantwortlich gemacht werden können. Dazu gehört auch, wie zuvor erwähnt, die Produktion von freien Radikalen durch MDMA, die einen oxidativen Zellschaden verursachen, mit einer Störung des mitochondrialen Membranpotentials einhergehen, das zu einer Freisetzung von Cytochrom C, der Aktivierung der Caspase-Kaskade und somit zur Aktivierung des intrazellulären Todesprogrammes führt [54]. Als Ursachen für die Neurotoxizität von MDMA sind demzufolge unter anderem auch oxidativer Stress, Exzitotoxizität, Hyperthermie und mitochondriale Dysfunktion anzusehen [90].

#### 4.1.4 Einfluss der Körpertemperatur auf die Neurodegeneration

In einer Studie von *Broening et al.* zur Evaluation der Bedeutung der Körpertemperatur im Zusammenhang mit einem Konsum von MDMA wurde beschrieben, dass bei adulten Ratten in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur eine eindeutige Körpertemperaturveränderung festzustellen ist. Bei einer kühlen Umgebungstemperatur von 10°C reagiere der Körper mit einer Temperaturerniedrigung, bei einer warmen Umgebungstemperatur von mindestens 25°C mit einer Erwärmung der Körperkerntemperatur. Gekoppelt mit einer Körpertemperaturerwärmung bei einer warmen Umgebungstemperatur sei ein anhaltender Verlust an Serotonin und eine Verminderung der Wiederaufnahme von Serotonin in die präsynaptische Membran im frontalen Kortex [11]. Einige Versuche zeigen, dass die Neurodegeneration bei externer Temperaturerwärmung von adulten Ratten noch gesteigert werden kann [18]. Schlussfolgernd ist der Konsum für junge Menschen auf diversen Rave-Partys, wo es durch die Menge und ausdauerndes Tanzen zu einer erhöhten Temperatur kommt, besonders in Kombination mit wenig Flüssigkeitsaufnahme gefährlich in Bezug auf eine Schädigung an serotonergen Axonen.

Demgegenüber kommt es nach Applikation von MDMA bei neonatalen Tieren nicht zu einer solchen Erhöhung der Körpertemperatur unabhängig von der Umgebungstemperatur [11]. Die fehlende Temperaturzunahme bei neonatalen Ratten im Vergleich zu den adulten Tieren könnte mit der Unreife des Gehirns und des Temperaturregulationsmechanismus zusammenhängen. Daraus resultiert die Vermutung, dass sich die fehlende Körpererwärmung bei neonatalen Tieren günstig, sozusagen antidegenerativ auf den neuronalen Untergang von Zellen auswirkt [11]. Interessant wäre zu überprüfen, inwiefern sich die Neurotoxizität von MDMA bei neonatalen Tieren bei externer Zuführung von Wärme ebenfalls verstärkt. In zukünftigen Studien könnten die Jungtiere nach der Applikation von MDMA in einer wärmeren Umgebungstemperatur von über 25 °C für einige Stunden zusammen mit der Mutter gehalten werden, um diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen.

## 4.2 MDMA beeinflusst die Genexpression von Nervenwachstumsfaktoren

Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Wirkung von externen Noxen und der Menge an daraufhin exprimierten Wachstumsfaktoren. Ergebnisse von Tierstudien über die Neurotrophinexpression unter externen Schädigungsmechanismen im unreifen Gehirn sind zwar zum Teil kontrovers und abhängig von der Schädigungsart, der untersuchten Hirnregion und von dem experimentellen Tiermodell. Beispielsweise aber wurde bei durch Pilocarpin induzierten Krampfanfällen und traumatischen Verletzungen des sich entwickelnden Gehirns eine Hochregulation der Neurotrophine beobachtet [61, 35], wohingegen Ethanol und Antiepileptika zu einer verminderten Expression der Neurotrophine führten [8, 19]. Für MDMA verhält es sich folgendermaßen: Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.3 liefern den Beweis, dass MDMA BDNF und NT-3 im retrosplenialen

Cortex der neonatalen Ratte hochreguliert. Erstmals wurde in dieser Arbeit eine Zeitabhängigkeit für die Hochregulation von BDNF durch MDMA nachgewiesen, mit einem Maximum der Expression von mRNA nach 24 Stunden (vgl. Abbildung 3.10). Dieser Nachweis konnte für NGF nicht erbracht werden, die Transkription war auf einem gleichbleibenden Level zu allen untersuchten Überlebenszeiten von 2, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden geblieben (vgl. Abbildung 3.14).

Die Ergebnisse anderer Arbeiten bezüglich der Wirkung von MDMA auf die Regulation der Neurotrophine beschreiben ebenso eine Hochregulation der Wachstumsfaktoren [60, 73] im frontalen Kortex. *Koprach et al.* untersuchten gleichfalls neonatale Versuchstiere. Die Ergebnisse ergaben erhöhte Transkriptionsraten für BDNF im frontalen Kortex nach mehrmaligen Injektionen von 20 mg/kg KG MDMA [60]. Erhöhte BDNF-Werte im retrosplenialen Kortex konnten in der vorliegenden Arbeit nach einmaligen Injektionen von 20 und 60 mg/kg KG durch eine semiquantitative PCR bestätigt werden. Interessanterweise wurde mit dieser Arbeit gezeigt, dass nicht nur die Transkriptionsraten für BDNF und NT-3 erhöht sind, sondern es konnte gleichzeitig ein Beleg für ein simultanes Verhalten auf Proteinebene (Expressionslevel) erbracht werden, d.h. dass BDNF tatsächlich vermehrt synthetisiert wird (vgl. Abbildung 3.15). In einer Studie von *Martínez-Turillas* wurde die Menge an mRNA für BDNF simultan in zwei verschiedenen Hirnregionen bestimmt. Während im frontalen Cortex (wie bei den Ergebnissen dieser Arbeit) eine Erhöhung der BDNF mRNA-Expression um 33-70 % zu verzeichnen war, berichten die Autoren über eine erniedrigte Rate der Transkription von BDNF im Hippocampus. Dieser Umstand wird auf die Entleerung der Serotoninspeicher und den Mangel an Serotonin zurückgeführt, der im frontalen Kortex, aber nicht im Hippocampus nachweisbar ist [73]. Eine andere Arbeit von *Salzmann et al.* zeigt ebenso, dass eine einzige Injektion von MDMA zu Veränderungen auf der Ebene der Transkription im Striatum der Maus führt. Eine Kaskade führt über die Hochregulation von ERK (*extracellular signal-related kinases*, extrazellulär signalregulierte Kinasen), welche zum einen eine Rolle in der apoptotischen Kaskade spielen, zum anderen in Verbindung gebracht werden mit der Entwicklung von Suchtverhalten gegenüber MDMA [98]. MDMA verursacht folglich multiple Veränderungen auf der Ebene der Transkription durch eine einzige Injektion. Das Ausmaß der Veränderungen ist noch nicht vollends abzusehen und zu verstehen.

Die durch MDMA induzierte Hochregulation der Expression von BDNF und NT-3, welche die Aussprossung und Wegleitung von Axonen beeinflussen, legt die Vermutung nahe, dass sich dahinter ein möglicher neuroprotektiver Mechanismus verbirgt. Es bleibt aber zu hinterfragen, ob die erzielten Ergebnisse in Bezug auf die Hochregulation von BDNF auf die neurochemische Wirkung von MDMA oder auf die hungerunterdrückende Wirkung und verminderte Nahrungsaufnahme der Tiere zurückzuführen ist. Erwähnenswert an dieser Stelle ist, dass sich in einer früheren Arbeit von *Duan et al.* erhöhte BDNF-Werte im zerebralen Kortex, im Hippocampus und im Cerebellum allein aufgrund einer streng reduzierten diätätischen Ernährung von adulten Ratten zeigten. Wiederum wirkt sich dieser durch Nahrungsrestriktion entstandene BDNF-Anstieg protektiv auf Neuronen gegen exzitotoxische Nervenzellschäden aus [31]. Da wir von einem hauptsächlich apoptotischen Ursprung der erhöhten Neurodegeneration nach MDMA ausgehen, kann hier eine nahrungsunab-

hängige Hochregulation von BDNF vermutet werden. Dieser Zusammenhang sollte in zukünftigen Untersuchungen mit Hilfe von PCR und Western Blot nach strenger Nahrungsrestriktion speziell bei neonatalen Ratten weiter untersucht werden.

### 4.2.1 Neuroprotektion durch BDNF

Überlebensfaktoren haben neuromodulatorische Funktionen, d.h. sie können sowohl proapoptisch als auch antiapoptisch auf die Nervenzelle einwirken (vgl. Abschnitt 1.4) [65]. In unserem Modell scheint eine antiapoptische bzw. neuroprotektive Wirkung von BDNF zu überwiegen. Dafür geben die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit BDNF Knockout Mäusen entscheidende Beweise (vgl. Abbildung 3.16). Der Grad der Neurodegeneration ist bei den Mäusen die BDNF nicht oder weniger exprimieren können signifikant erhöht gegenüber den Kontrolltieren. Das BDNF tatsächlich neuroprotektiv auf serotonerge Axone wirkt, darauf gibt folgende Studie von *Mamounas et al.* an adulten Ratten interessante Hinweise. BDNF-Infusionen in den frontoparietalen Kortex hatten eine signifikante protektive Wirkung auf serotonerge Axone, die normalerweise durch das serotonerge Neurotoxin PCA (p-Chloroamphetamin), welches wie MDMA ein Amphetaminderivat darstellt, geschädigt werden [71]. Der neurotoxische Verlust an serotonergen Axonen durch PCA konnte in der zuvor erwähnten Studie mit Hilfe von BDNF-Infusionen vollständig verhindert werden. In der gleichen Arbeit führten allein BDNF-Infusionen ohne die Zugabe des Neurotoxins PCA in den Neokortex, bei ansonsten unbehandelten Ratten zu einem Anstieg der Serotonin-Axondichte in einem Umkreis der Kanüle von 3mm. Demnach unterstützt BDNF das Sprießen von reifen unverletzten serotonergen Axonen und steigert in großem Umfang das Überleben von durch PCA geschädigten Axonen [71]. Da das Amphetaminderivat MDMA ebenfalls serotonerge Axone schädigt, ist ein ähnliches Verhalten für MDMA-geschädigte serotonerge Axone anzunehmen.

Während ein Anstieg von BDNF bisher generell mit neuronalen Reparaturmechanismen und Neuroprotektion in Verbindung gebracht wurde, geben neuere Studien auch gegensätzliche Hinweise. BDNF kann gleichfalls zur Ausschüttung des Exzitotoxins Glutamat führen, stärker sogar in unreifen als in reifen Astrozyten. Diese Glutamatfreisetzung bewirkt eher eine Verstärkung der Neurotoxizität, als diese zu verhindern [85]. In einer anderen Studie von *Quinton et al.* behaupten die Autoren, dass eine wiederholte Injektion von MDMA nicht zu einer erhöhten Glutamatfreisetzung führen würde [90]. Der Aspekt der Glutamatfreisetzung durch MDMA, der ebenfalls für einen nekrotischen Zelltod sprechen würde scheint demnach umstritten und nicht ausreichend studiert.

## 4.3 Auswirkungen von MDMA auf das Körpergewicht

Eine Vielzahl von Studien haben die Gewichtsreduktion bzw. die geringere Gewichtszunahme bei neonatalen Ratten unter einer Verabreichung von MDMA gezeigt [60, 12]. Die Ergebnisse aus

dieser Arbeit bestätigen diese Wirkung von MDMA auf das Gewicht (vgl. Abschnitt 3.2). Das Gewicht nahm bei allen Versuchstieren, die sieben Tage oder älter waren nach Applikation von MDMA innerhalb von 24 Stunden ab. Bei den drei Tage alten, mit MDMA behandelten Ratten resultierte wenn auch keine Gewichtsabnahme, so doch eine geringere Gewichtszunahme innerhalb von 24 Stunden als bei den Kontrolltieren. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass bei Neugeborenen, deren Mütter Ecstasy während der Schwangerschaft konsumieren, eine Wachstumsretardierung auffällig werden könnte [86].

## 4.4 Übertragbarkeit des Tiermodells auf den Menschen

Das hier verwendete Tiermodell der neonatalen Ratte umfasst die rapide Hirnwachstumsphase vom Zeitpunkt der Geburt bis zum Ende der dritten Lebenswoche der Ratte [30]. Wie zuvor schon erwähnt ist dieses Modell auf den Menschen im dritten Trimenon der Schwangerschaft bis zum 3. Lebensjahr zu übertragen, in der der Mensch die Phase des schnellsten Hirnwachstums vollzieht (vgl. 1.2). Trotzdem bleiben bei einem Tiermodell immer Fragen offen. Diese seien hier kurz erwähnt und diskutiert.

Als Dosis wurde in diesem Modell eine vielfach Höhere gewählt, als bei einem Menschen üblicherweise eingenommen werden würde, um die erwünschten Wirkungen zu erzielen. Als Standarddosis wurde in dieser Arbeit 60 mg/kg KG angenommen, da ab dieser Dosis in den histologischen Färbungen ein signifikanter neurotoxischer Effekt auf die Nervenzellen nachweisbar war. Die Dosis, die beim Menschen ausreichend ist, um die erwünschten psychostimulatorischen Wirkungen zu erhalten, liegt ungefähr bei 2 mg/kg KG [101, 94].

Es bleibt zu klären inwiefern die höhere Dosis bei Ratten mit einem erhöhtem Stoffwechsel zu deuten ist, den Ratten im Vergleich zum Menschen haben. Anzunehmen wäre, ein schnellerer Abbau von MDMA durch einen vielfach schnelleren Metabolismus, der den Abbau von MDMA im Organismus der Ratte im Vergleich zum Menschen beschleunigt. Auch ist die Frage der Körpertemperatur an dieser Stelle sehr interessant, die bei Ratten deutlich niedriger liegt als beim Menschen und daher eventuell eine höhere Dosis bei Ratten erforderlich macht. Vorstellbar wäre eine deutlich stärkere Wirkung durch die höhere Körpertemperatur beim Menschen. Grund zu dieser Annahme geben Studien im Tierexperiment, bei denen durch externe Körpertemperaturerhöhung der neurodegenerative Schaden deutlich höher war [18]. Erwiesenermaßen reagieren Affen viel sensibler auf die neurotoxischen Effekte von MDMA als Ratten [92]. Dies lässt vermuten, dass beim Menschen ebenso eine viel geringere Dosis als bei Ratten ausreicht, um zur exzessiven Ausschüttung von Serotonin und zur Degeneration von Nervenzellen zu führen. Vermutlicherweise existieren zusätzlich andere Zusammenhänge, die bisher nicht bekannt oder nicht ausreichend untersucht sind. *Baumann et al.* behaupten darüberhinaus, dass MDMA in äquivalenten Dosen beim Menschen, wie bei der Ratte neurochemische, endokrine und Verhaltensveränderungen verursacht. Von daher sei eine Anpassung der Dosen zwischen den verschiedenen Spezies unnötig [7].

## 4.5 Bezug zur Klinik und Schlussfolgerungen

Da ein Konsum von MDMA während der Schwangerschaft von außen meist unbemerkt bleibt und Befragungen der Mütter durch moralische Bedenken kaum reelle Zahlen wiedergeben würden, bleibt die klinische Forschung auf wenige Studien mit kleinen Fallzahlen beschränkt [27].

Im Tierversuch konnte zum einen eine degenerative Wirkung von MDMA auf Neuronen im sich entwickelnden Gehirn nachgewiesen werden, die auch beim Menschen eine Neurotoxizität auf das unreife Gehirn wahrscheinlich macht [77]. Zum anderen steht die Droge unter Verdacht das Risiko für die Frühgeburtlichkeit zu erhöhen [56, 69]. Bei der Alkoholembryopathie ist dem Neugeborenen nach der Geburt durch die typischen phänotypischen Merkmale der Alkoholkonsum der Mütter während der Schwangerschaft anzusehen [83]. Bei Ecstasy (MDMA) sind die Veränderungen viel differenzierter und schwer zu diagnostizieren. Daher herrscht vermutlich eine hohe Dunkelziffer an Neugeborenen die unter einer Frühgeburt und/oder den Folgen des Amphetaminkonsums während der pränatalen Entwicklung leiden. Eine Wachstumsretardierung und Schädigung des sich entwickelnden Gehirns, vor allem bei vermehrtem Ecstasy-Abusus schwangerer Frauen kann fatale Folgen für die gesamte Entwicklung des ungeborenen Kindes haben. Zu denken sind Frühgeburt und die damit verbundenen Risiken: motorische, sowie kognitive Unterentwicklung gegenüber Altersgenossen, Wachstumsretardierung und Fehlbildungen lebenswichtiger Organe [69, 33, 86].

Eine Einnahme von MDMA (Ecstasy) während einer bekannten Schwangerschaft ist im Hinblick auf die Entwicklung des Gehirns in seiner vulnerablen Phase, das bedeutet besonders im letzten Trimenon der Schwangerschaft anhand der hier erzielten Ergebnisse unverantwortlich. Es bleibt zu wünschen übrig, dass über die Risiken jeglicher Art von Drogenkonsum während der Schwangerschaft in Zukunft eine ausreichende Aufklärung sowohl im medizinischen, als auch im öffentlichen Bereich stattfindet.

## 5 Zusammenfassung

Die Anfälligkeit des sich entwickelnden Gehirns für Veränderungen von außen ist seit Jahrzehnten bekannt. Während der Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) ist die Empfindlichkeit gegenüber Drogen bei akuter oder chronischer Exposition besonders hoch. Das neurotoxische Potential von MDMA (3,4-Methylenedioxyamphetamin, Ecstasy) stand im Mittelpunkt vieler Untersuchungen und wurde kontrovers diskutiert, nicht zuletzt wegen der großen Verbreitung der Droge als ein illegales Psychostimulanz [101]. MDMA (Ecstasy) ist das am weitesten verbreitete und bekannteste plazentagängige Amphetamin [16]. Es steht mittlerweile an zweiter Stelle der am häufigsten illegal konsumierten Drogen in Deutschland [107]. Derzeit haben die meisten Studien die Effekte von MDMA auf das adulte Gehirn untersucht. Ungeachtet der Tatsache, dass die Mehrzahl der Konsumenten in der Gruppe junger Erwachsener und somit unter jungen Frauen im gebärfähigem Alter liegt, ist aber wenig über die Exposition des Fetus mit MDMA bekannt. Es herrscht eine wachsende Befürchtung über seine potentielle Toxizität für das unreife Gehirn [60].

Um die Frage nach den potentiellen Schädigungsmechanismen auf das unreife Gehirn näher zu betrachten, wurden in dieser Arbeit neonatale Gehirne von Ratten im Alter von 3, 7, 14 und 21 Tagen untersucht. Die Hirnschnitte wurden mit verschiedenen Färbemethoden behandelt und nach der stereologischen Dissektionsmethode mikroskopisch ausgewertet. In dieser Arbeit konnte am unreifen Rattengehirn nachgewiesen werden, dass eine einmalige intraperitoneale Injektion ab einer Dosis von 60 mg/kg KG MDMA zu einer ausgeprägten apoptotischen Neurodegeneration in verschiedenen Regionen des Gehirns führt. Es hat sich gezeigt, dass eine MDMA-Applikation in dieser Dosis besonders um den siebten Lebenstag, also in einer sehr vulnerablen Phase der Hirnentwicklung („*brain growth spurt period*“, vgl. 1.2), zu ausgeprägten Veränderungen im unreifen Gehirn führt. In dieser Phase der Hirnentwicklung, die dem letzten Trimenon der Schwangerschaft beim Menschen entspricht [30], dürfte das menschliche Gehirn am empfindlichsten auf MDMA reagieren. Während sowohl die physiologische, als auch die durch MDMA verursachte Neurodegeneration am siebten Lebenstag der Versuchstiere am ausgeprägtesten war, zeigen auch 14 und 21 Tage alte Ratten einen signifikant erhöhten apoptotischen Nervenzelluntergang im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die untersuchten Hirnregionen reagierten mit einer unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber der neurodegenerativen Wirkung von MDMA. Ein signifikanter Nervenzelluntergang war in folgenden Hirnregionen der sieben Tage alten Ratten nachweisbar: Kortex, Septum, Thalamus ventralis, Hypothalamus und der CA1-Region des Hippocampus. Selbst sieben Tage nach einer Injektion von 60 mg/kg KG MDMA war noch eine signifikant erhöhte Nervenzelldegeneration nachweisbar und konnte nicht vollständig kompensiert werden.

Zusammenfassend konnte im Rahmen des histologischen Teils der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Grad der neurodegenerativen Schädigung durch MDMA abhängig von der verwendeten Dosis, dem Alter der Tiere, der Überlebenszeit und der untersuchten Hirnregion ist.

Da Neurotrophine unter anderem eine wichtige Rolle im Überleben und der Differenzierung von Neuronen spielen, wurde im zweiten Abschnitt dieser Arbeit der Effekt von MDMA-Injektionen auf die Neurotrophinexpression molekularbiologisch untersucht. Mit Hilfe der PCR konnte der Einfluss von MDMA auf die Transkriptionsrate der Wachstumsfaktoren BDNF, NGF und NT-3 überprüft werden. Darüberhinaus wurde für BDNF die Regulation unter Zuhilfenahme eines Westernblots auch auf Proteinebene betrachtet. Dabei wurde deutlich, dass MDMA Einfluss auf die Expression von Wachstumsfaktoren nimmt. Schon eine einmalige Dosis von 20 mg/kg KG MDMA führte zu einem Anstieg der Transkriptionsraten für BDNF. Die Exposition mit 60mg/kg KG MDMA führte im unreifen Rattengehirn zu einer deutlich erhöhten Transkriptionsrate für BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) und NT-3 (*neurotrophin 3*), während die Expression von NGF (*nerve growth factor*) MDMA-unabhängig war. Ein maximaler Anstieg von BDNF und NT-3 konnte nach 24 Stunden beobachtet werden. Selbst nach 72 Stunden war die Transkriptionsrate noch nicht auf den Ausgangswert zurückgekehrt und noch signifikant erhöht. Interessanterweise lässt dieser Befund auf einen möglichen kompensatorischen neuroprotektiven Mechanismus schließen. Die Expression körpereigener Neurotrophine wie BDNF und NT-3 wurden nach der MDMA-Applikation hochreguliert. Somit könnte über diese Faktoren ein Ungleichgewicht in der apoptotischen Kaskade entstehen, das über das neuronale Überleben entscheidet.

Abschließend wurden Versuche mit BDNF Knockout Mäusen (+/- BDNF) durchgeführt, um eine mögliche antagonistische Wirkung des Neurotrophins gegenüber des Neurotoxins MDMA aufzudecken. So wurde gezeigt, dass der neurodegenerative Schaden durch MDMA bei den BDNF Knockout Tieren annähernd um das 3-fache größer ist, als bei den Kontrollen des Wildtyps, die ebenfalls MDMA bekamen. Unter den Knockout Mäusen hatten diejenigen, die MDMA appliziert bekamen einen signifikant größeren Schaden gegenüber den Knockout Mäusen, die Natriumchloridlösung erhielten. Demzufolge konnte nachgewiesen werden, dass BDNF tatsächlich eine neuroprotektive Funktion im Zusammenhang mit dem Missbrauch von MDMA hat. Die Hochregulation der Expression von BDNF wirkt letztlich der schädigenden Wirkung von MDMA an den Neuronen entgegen. Zusätzlich war bei allen Tieren, die eine Exposition mit MDMA erfahren hatten, eine signifikante Abnahme des Körpergewichtes oder zumindest aber eine verringerte Gewichtszunahme im Vergleich zu den Kontrollen festzustellen.

Etliche Risiken, wie drohende Frühgeburt, Wachstumsretardierung, Fehlbildungen von Organen, kognitive und motorische Unterentwicklung gegenüber Altersgenossen, die mit einer pränatalen Exposition von MDMA und seinen Metaboliten einhergehen können, sind bereits beschrieben worden [33, 69, 86]. Erstmals konnte mit den hier vorliegenden Ergebnissen eindeutig gezeigt werden, dass ein Konsum von MDMA während einer Schwangerschaft schädigende Wirkung im Hinblick auf die Hirnentwicklung des ungeborenen Kindes hat.

# Literaturverzeichnis

- [1] L. J. Abernethy, M. Palaniappan, and R. W. I. Cook. Quantitative magnetic resonance imaging in the brain in survivors of very low birth weight. *Arch Dis Child*, 87(4):279–283, 2002.
- [2] N. Aguirre, M. Barrionuevo, B. Lasheras, and J. D. Rio. The role of dopaminergic systems in the perinatal sensitivity to 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity in rats). *Pharmacol Exp Ther*, 286:1159–1165, 1998.
- [3] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. Programmed cell death (apoptosis). *Mol Biol Cell*, 4:1010–1025, 2002.
- [4] F. Angelucci, S. H. Gruber, A. E. Khoury, P. A. Tonali, and A. A. Mathé. Chronic amphetamine treatment reduces NGF and BDNF in the rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol*, 17(12):756–762, 2007.
- [5] P. A. Barker and R. A. Murphy. The nerve growth factor receptor: a multicomponent system that mediates the actions of the neurotrophin family of proteins. *Mol Cell Biochem*, 110(1):1–15, 1992.
- [6] G. Battaglia, S. Y. Yeh, E. O’Hearn, M. E. Molliver, M. J. Kuhar, and E. B. de Souza. 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) and 3,4 -methylenedioxymethamphetamine destroy serotonin terminals in rat brain: quantification of neurodegeneration by measurement of [3H]paroxetine-labeled serotonin uptake sites. *J Pharmacol Exp Ther*, 242:911–916, 1987.
- [7] M. H. Baumann, X. Wang, and R. B. Rothman. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) neurotoxicity in rats: reappraisal of past and present findings. *Psychopharmacol*, 189:407–424, 2007.
- [8] P. Bittigau, M. Sifringer, K. Genz, E. Reith, D. Pospischil, S. Govindarajalu, M. Dzikko, S. Pesditschek, I. Mai, K. Dikranian, J. W. Olney, and C. Ikonomidou. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(23):15089–15094, 2002.

- [9] P. Bittigau, M. Sifringer, D. Pohl, D. Stadthaus, M. Ishimaru, H. Shimizu, M. Ikeda, D. Lang, A. Speer, J. W. Olney, and C. Ikonomidou. Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain. *Ann Neurol*, 45(6):724–735, 1999.
- [10] R. M. Boustany and Y. Hannun. Apoptosis in Neurobiology: Concepts and Methods. *CRC Press*, 4, 1999.
- [11] H. W. Broening, J. F. Bowyer, and W. J. Slikker. Age-dependent sensitivity of rats to the long-term effects of the serotonergic neurotoxicant (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) correlates with the magnitude of the MDMA-induced thermal response. *J Pharmacol Exp Ther*, 275(1):325–333, 1995.
- [12] H. W. Broening, L. L. Morford, S. L. Inman-Wood, M. Fukumura, and C. V. Vorhees. 3,4-methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy)-induced learning and memory impairments depend on the age of exposure during early development. *J Neurosci*, 21(9):3228–3235, 2001.
- [13] M. J. Burek and R. W. Oppenheim. Programmed Cell Death in the developing nervous system. *Brain Pathol*, 6(4):427–446, 1996.
- [14] W. N. Burnette. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112:195–203, 1981.
- [15] J. L. Cadet, I. N. Krasnova, S. Jayanthi, and J. Lyles. Neurotoxicity of substituted amphetamines: molecular and cellular mechanisms. *Neurotox Res*, 11(3-4):183–202, 2007.
- [16] N. G. Campbell, J. B. Koprach, N. M. Kanaan, and J. W. Lipton. MDMA administration to pregnant Sprague-Dawley rats results in its passage to the fetal compartment. *Neurotoxicol Teratol*, 28:459–465, 2006.
- [17] J. P. Capela, E. Fernandes, F. Remiao, M. L. Bastos, A. Meisel, and F. Carvalho. Ecstasy induces apoptosis via 5-HT-2A-receptor stimulation in cortical neurons. *Neurotoxicology*, 28:868–875, 2007.
- [18] J. P. Capela, K. Ruscher, M. Lautenschlager, D. Freyer, U. Dirnagl, A. R. Gaio, M. L. Bastos, A. Meisel, and F. Carvalho. Ecstasy-induced cell death in cortical neuronal cultures is serotonin 2A-receptor-dependent and potentiated under hyperthermia. *Neuroscience*, 139(3):1069–1081, 2006.
- [19] E. Climent, M. Pascual, J. Renau-Piqueras, and C. Guerri. Ethanol exposure enhances cell death in the developing cerebral cortex: role of brain-derived neurotrophic factor and its signaling pathways. *J Neurosci Res*, 68(2):213–225, 2002.

- [20] M. I. Colado, E. O'Shea, R. Granados, T. K. Murray, and A. R. Green. In vivo evidence for free radical involvement in the degeneration of rat brain 5-HT following administration of MDMA („ecstasy“) and p-chloroamphetamine but not the degeneration following fenfluramine. *Br J Pharmacol*, 121:889–900, 1997.
- [21] D. L. Commins, G. Vosmer, R. M. Virus, W. L. Woolwerth, C. R. Schuster, and L. S. Leiden. Biochemical and histological evidence that methylenedioxymethamphetamine (MDMA) is toxic to neurons in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 241:338–345, 1987.
- [22] T. J. Connor. Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, „Ecstasy“): a stressor on the immune system. *Immunology*, 111:35–367, 2004.
- [23] R. L. Cowan, I. K. Lyoo, S. M. Sung, K. H. Ahn, M. J. Kim, J. Hwang, E. Haga, R. L. Vimal, S. E. Lukas, and P. F. Renshaw. Reduced cortical gray matter density in human MDMA (Ecstasy) users: a voxel-based morphometry study. *Drug Alcohol Depend*, 72:225–235, 2003.
- [24] R. de la Torre. Human Pharmacology of MDMA. *Ther Drug Monit*, 26(2):137–144, 2004.
- [25] R. de la Torre, M. Farré, P. N. Roset, C. H. López, M. Mas, J. Ortuño, E. Menoyo, N. Pizzaro, J. Segura, and J. Camí. Pharmacology of MDMA in Humans. *Ann N Y Acad Sci*, 914:225–237, 2000.
- [26] J. S. DeOlmos and W. R. Ingram. An improved cupric-silver method for impregnation of axonal and terminal degeneration. *Brain Res*, 33(2):523–529, 1971.
- [27] K. A. DeVille and L. M. Kopelman. Moral and social issues regarding pregnant women who use and abuse drugs. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 25(1):237–254, 1998.
- [28] K. Dikranian and M. J. Ishimaru. Apoptosis in the in vivo mammalian forebrain. *Neuroiol Dis*, 8(3):359–379, 2001.
- [29] J. Dobbing. The later growth of the brain and its vulnerability. *Pediatrics*, 53(1):2–6, 1974.
- [30] J. Dobbing and J. Sands. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev*, 3(1):79–83, 1979.
- [31] W. Duan, J. Lee, Z. Guo, and M. P. Mattson. Dietary restriction stimulates BDNF production in the brain and thereby protects neurons against excitotoxic injury. *J Mol Neurosci*, 16:1–12, 2001.
- [32] A. J. Eisch, L. C. Schmued, and J. F. Marshall. Characterizing cortical neuron injury with Fluoro-Jade labeling after a neurotoxic regimen of Metamphetamine. *Synapse*, 30:329–333, 1998.

- [33] P. R. M. Elhatton, D. N. Bateman, C. Evans, K. R. Pughe, and S. H. Thomas. Congenital anomalies after prenatal ecstasy exposure. *Lancet*, 354(9188):1441–1442, 1999.
- [34] R. S. Falck, R. G. Carlson, J. Wang, and H. A. Siegal. Psychiatric disorders and their correlates among young adult MDMA users in Ohio. *J Psychoactive Drugs*, 38(1):19–29, 2006.
- [35] U. Felderhoff-Mueser, M. Sifringer, S. Pesditschek, H. Kuckuck, A. Moysich, P. Bittigau, and C. Ikonomidou. Pathways leading to apoptotic neurodegeneration following trauma to the developing rat brain. *Neurobiol Dis*, 11(2):231–245, 2002.
- [36] K. T. Finnegan, G. A. Ricaurte, L. D. Ritchie, I. Irwin, S. J. Peroutka, and J. W. Langston. Orally administered MDMA causes long-term depletion of serotonin in rat brain. *Brain Research*, 447:141–144, 1988.
- [37] H. S. Fischer, G. Zernig, D. S. Schatz, C. Humpel, and A. Saria. MDMA („ecstasy“) enhances basal acetylcholin release in brain slices of the rat striatum. *Eur J Neurosci*, 12:1385–1390, 2000.
- [38] A. E. Fleckenstein, D. G. Wilkins, J. W. Gibb, and G. R. Hanson. Interaction between hyperthermia and oxygen radical formation in the 5-hydroxytryptaminergic response to a single methamphetamine administration. *J Pharmacol Exp Ther*, 283:281–285, 1997.
- [39] Y. Gavrieli, Y. S. S, and A. Ben-Sasson. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119(3):493–501, 1992.
- [40] E. Gouzoulis-Mayfrank, J. Daumann, F. Tuchtenhagen, S. Pelz, S. B. S, H. J. Kunert, B. Fimm, and H. Sass. Impaired cognitive performance in drug free users of recreational ecstasy (MDMA). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 68:719–725, 2000.
- [41] B. Grasl-Kraupp, B. Ruttkay-Nedecky, H. Koudelka, K. Bukowska, W. Bursch, and R. Schulte-Hermann. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology*, 21(5):1465–1468, 1995.
- [42] H. J. Gundersen, T. F. Bendtsen, L. Korbo, N. Marcussen, A. Møller, K. Nielsen, J. R. Nyengaard, B. Pakkenberg, F. B. Sørensen, and A. Vesterby. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis*, 96(5):379–394, 1988.
- [43] M. O. Hengartner. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805):770–776, 2000.
- [44] J. A. Henry. Ecstasy and the dance of death. *BMJ*, 305:5–6, 1992.

- [45] S. W. Hetts. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *Jama*, 279(4):300–307, 1998.
- [46] E. Ho, L. Karimi-Tabesh, and G. Koren. Characteristic of pregnant women who use Ecstasy (3,4-methylenedioxyamphetamine). *Neurotoxicol Teratol*, 23(6):561–567, 2001.
- [47] C. Ikonomidou, P. Bittigau, M. J. Ishimaru, D. F. Wozniak, C. Koch, K. Genz, M. T. Price, V. Stefovskaja, F. Hörster, T. Tenkova, K. Dikranian, and J. W. Olney. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287(5455):1056–1060, 2000.
- [48] C. Ikonomidou, F. Bosch, M. Miksa, P. Bittigau, J. Vöckler, K. Dikranian, T. I. Tenkova, V. Stefovskaja, L. Turski, and J. W. Olney. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283(5398):70–74, 1999.
- [49] C. Ikonomidou, J. L. Mosinger, K. S. Salles, J. Labruyere, and J. W. Olney. Sensitivity of the developing rat brain to hypobaric/ischemic damage parallels sensitivity to N-methylaspartate neurotoxicity. *J Neurosci*, 9(8):2809–2818, 1989.
- [50] M. J. Ishimaru, C. Ikonomidou, T. I. Tenkova, T. C. Der, K. Dikranian, M. A. Sesma, and J. W. Olney. Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *J Comp Neurol*, 408(4):461–476, 1999.
- [51] M. D. Jacobson, M. Weil, and M. C. Raff. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88(3):347–354, 1997.
- [52] K. F. Jensen, J. Olin, N. Haykal-Coates, J. O’Callaghan, D. B. Miller, and J. S. deOlmos. Mapping toxicant-induced nervous system damage with a cupric silver stain: a quantitative analysis of neural degeneration induced by 3,4-methylenedioxyamphetamine. *NIDA Res Monogr*, 136:133–149, 1993.
- [53] V. Jevtovic-Todorovic, R. E. Hartman, Y. Izumi, N. D. Benshoff, K. Dikranian, C. F. Zorumski, J. W. Olney, and D. F. Wozniak. Early exposure to common anaesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci*, 23:876–882, 2003.
- [54] A. Jiménez, E. G. Jorda, E. Verdaguer, D. Pubill, F. X. Sureda, A. M. Canudas, E. Escubedo, J. Camarasa, A. Camins, and M. Pallàs. Neurotoxicity of amphetamine derivatives is mediated by caspase pathway activation in rat cerebellar granule cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 196:223–234, 2004.
- [55] H. Kalant. The pharmacology and toxicology of ‘ecstasy’ (MDMA) and related drugs. *CMAJ*, 165(7):917–928, 2001.

- [56] R. Kennare, A. Heard, and A. Chan. Substance use during pregnancy: risk factors and obstetric and perinatal outcomes in South Australia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 45:220–225, 2005.
- [57] J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26:239–257, 1972.
- [58] A. M. S. Kindlundh-Högberg, A. Blomqvist, R. Malki, and H. B. Schiöth. Extensive neuroadaptive changes in cortical gene-transcript expressions of the glutamate system in response to repeated intermittent mdma administration in adolescent rats. *BMC Neurosci*, 9:39, 2008.
- [59] M. S. Kleven, W. L. Woolverton, and L. S. Seiden. Evidence that both intragastric and subcutaneous administration of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) produce serotonin neurotoxicity in rhesus monkeys. *Brain Res*, 488:121–125, 1989.
- [60] J. B. Koprach, N. G. Campbell, and J. W. Lipton. Neonatal 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) alters dopamine and serotonin neurochemistry and increases brain-derived neurotrophic factor in the forebrain and brainstem of the rat. *Science*, 147(1-2):177–182, 2003.
- [61] H. I. Kornblum, R. Sankar, D. H. Shin, C. G. Wasterlain, and C. M. Gall. Induction of brain derived neurotrophic factor mRNA by seizures in neonatal and juvenile rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 44(2):219–228, 1997.
- [62] P. H. Krammer. Apoptose. *Deutsches Ärzteblatt*, 97(25):1752–1759, 2000.
- [63] K. Lauber, I. H. Engels, and S. Wesselborg. Apoptose. *Onkologe*, 10(1):58–61, 2004.
- [64] F. S. Lee, A. H. Kim, G. Khursigara, and M. V. Chao. The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Curr Opin Neurobiol*, 11:281–286, 2001.
- [65] R. Lee, P. Kermani, K. T. Teng, and B. L. Hempstead. Regulation of Cell Survival by Secreted Proneurotrophins. *Science*, 294:1945–1947, 2001.
- [66] R. Levi-Montalcini. The Nerve Growth Factor: thirty-five years later. *EMBO Jorunal*, 6(5):1145–1154, 1987.
- [67] X. Liu, H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 89(2):175–184, 1997.
- [68] J. Lohmann, H. Schickle, and T. C. Bosch. REN display, a rapid and efficient method for nonradioactive differential display and mRNA isolation. *Biotechniques*, 18:200–202, 1995.

- [69] J. P. Ludlow, S. F. Evans, and G. Hulse. Obstetric and perinatal outcomes in pregnancies associated with illicit substance abuse. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 44(4):302–306, 2004.
- [70] J. E. Malberg, K. E. Sabol, and L. S. Seiden. Co-administration of MDMA with drugs that protect against MDMA neurotoxicity produces different effects on body temperature in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 278:258–267, 1996.
- [71] L. A. Mamounas, M. E. Blue, J. A. Siuciak, and C. A. Altar. Brain-Derived Neurotrophic Factor Promotes the Survival and Sproutin of Serotonergic Axons in Rat Brain. *J Neurosci*, 15(12):7929–7939, 1995.
- [72] D. P. Martin, R. E. Schmidt, P. S. DiStefano, O. H. Lowrz, J. G. Carter, and E. M. Johnson. Inhibitors of Protein Synthesis and RNA Synthesis Prevent Neuronal Death Caused by Nerve Growth Factor Deprivation. *J Cell Biol*, 106:829–844, 1988.
- [73] R. Martínéz-Turrillas, S. Moyano, J. D. Río, and D. Frechilla. Differential effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, „ecstasy“) on BDNF mRNA expression in rat frontal cortex and hippocampus. *Neuroscience Letters*, 402:126–130, 2006.
- [74] U. D. McCann, M. Mertl, V. Eligulavili, and G. A. Ricaurte. Cognitive performance in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, „ecstasy“) users: a controlled study. *Psychopharmacol*, 943:417–425, 1999.
- [75] U. D. McCann, A. Ridenour, Y. Shaham, and G. A. Ricaurte. Serotonin neurotoxicity after (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; „Ecstasy“): a controlled study in humans. *Neuropsychopharmacol*, 10:129–138, 1994.
- [76] J. S. Meyer and S. F. Ali. Serotonergic Neurotoxicity of MDMA (Ecstasy) in the Developing Rat Brain. *Ann NY Acad Sci*, 965:373–380, 2002.
- [77] J. S. Meyer, M. Grande, K. Johnson, and S. F. Ali. Neurotoxic effects of MDMA (ecstasy) administration to neonatal rats. *Int J Devl Neuroscience*, 22:261–271, 2004.
- [78] C. Nosarti, M. H. Al-Asady, S. Frangou, A. L. Stewart, L. Rifkin, and R. M. Murray. Adolescents who were born very preterm have decreased brain volumes. *Brain*, 125(Pt 7):1616–1623, 2002.
- [79] NSHDA. Ecstasy use. *The NSHDA Report*, pages 1–3, 2003.
- [80] E. O’Hearn, G. Battaglia, , E. B. de Souza, M. J. Kuhar, and M. E. Molliver. Methylenedioxyamphetamine (MDA) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) cause selective ablation of serotonergic axon terminals in forebrain: immunocytochemical evidence for neurotoxicity. *J Neurosci*, 8:2788–2803, 1988.

- [81] E. O'Hearn, G. Battaglia, E. B. D. Souza, M. J. Kuhar, and M. E. Molliver. Methylenedioxyamphetamine (MDA) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) cause selective ablation of serotonergic axon terminals in forebrain: immunocytochemical evidence for neurotoxicity. *J Neurosci*, 8(8):2788–2803, 1988.
- [82] J. W. Olney, M. J. Ishimaru, P. Bittigau, and C. Ikonomidou. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Apoptosis* 2000, 5(6):515–521, 2000.
- [83] J. W. Olney, D. F. Wozniak, V. Jevtovic-Todorovic, N. B. Farber, P. Bittigau, and C. Ikonomidou. Drug-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Brain Pathol*, 12(4):488–498, 2002.
- [84] A. C. Parrott. Human research on MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) neurotoxicity: cognitive and behavioural indices of change. *Neuropsychobiol*, 42:17–24, 2000.
- [85] M. Pascual, E. Climent, and C. Guerri. Bdnf induces glutamate release in cerebrocortical nerve terminals and in cortical astrocytes. *Neuroreport*, 12(12):2673–2677, 2001.
- [86] M. A. Plessinger. Prenatal exposure to amphetamines. Risks and adverse outcomes in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 25(1):119–138, 1998.
- [87] D. Pohl, P. Bittigau, M. J. Ishimaru, D. Stadthaus, C. Hubner, J. W. Olney, L. Turski, and C. Ikonomidou. N-methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc Natl Acad Sci*, 96:2508–2513, 1999.
- [88] D. Purves, W. D. Snider, and J. T. Voyvodic. Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature*, 336(6195):123–128, 1988.
- [89] B. B. Quednow, F. Jessen, K. Kühn, W. Maier, I. Daum, and M. Wagner. Memory deficits in abstinent MDMA (ecstasy) users: neuropsychological evidence of frontal dysfunction. *Psychopharm*, 20(3):373–384, 2006.
- [90] M. S. Quinton and B. K. Yamamoto. Causes and Consequences of Methamphetamine and MDMA Toxicity. *AAPS Journal*, 8(2):Article 38, 2006.
- [91] J. Renart, J. Reiser, and G. R. Stark. Transfer proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci*, 76:3116–3120, 1979.
- [92] G. A. Ricaurte, L. E. DeLanney, I. Irwin, and J. W. Langston. Toxic effects of MDMA on central serotonergic neurons in the primate: importance of route and frequency of drug administration. *Brain Research*, 446:165–168, 1988.

- [93] G. A. Ricaurte, J. Yuan, G. Hatzidimitriou, B. J. Cord, and U. D. McCann. Severe dopaminergic neurotoxicity in primates after a common recreational dose regimen of MDMA („ecstasy“). *Science*, 297(5590):2260–2263, 2002.
- [94] G. A. Ricaurte, J. Yuan, and U. D. McCann. (+/-)3,4-Methylenedioxyamphetamine (‘Ecstasy’)-induced serotonin neurotoxicity: studies in animals. *Neuropsychol*, 42(1):5–10, 2000.
- [95] D. Rice and S. Barone. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. *Environmental Health Perspectives*, 108(3):511–533, 2000.
- [96] R. Rojas, R. Riascos, D. Vargas, H. Cuellar, and J. Borne. Neuroimaging in Drug and Substance Abuse Part I. *Top Magn Reson Imaging*, 16(3):231–238, 2005.
- [97] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, B. Mullis, and H. A. Erlich. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239:487–491, 1988.
- [98] J. Salzmann, C. Canestrelli, F. Noble, and C. Marie-Claire. Analysis of transcriptional responses in the mouse dorsal striatum following acute 3,4-methylenedioxyamphetamine (ecstasy): identification of extracellular signal-regulated kinase-controlled genes. *Neurosci*, 137(2):473–482, 2006.
- [99] V. Sanchez, E. O’Shea, K. S. Saadat, J. M. Elliott, M. I. Colado, and A. R. Green. Effect of repeated („binge“) dosing of MDMA to rats housed at normal and high temperature on neurotoxic damage to cerebral 5-HT and dopamine neurones. *J Psychopharmacol*, 18(3):412–416, 2004.
- [100] T. Schierenbeck, D. Riemann, M. Berger, and M. Hornyak. Effect of illicit recreational drugs upon sleep: Cocaine, ecstasy and marijuana. *Sleep Med Rev*, ahead of print, 2008.
- [101] L. C. Schmued. Demonstration and localization of neuronal degeneration in the rat forebrain following a single exposure to MDMA. *Brain Res*, 974:127–133, 2003.
- [102] L. C. Schmued, C. Albertson, and W. J. Slikker. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res*, 751:37–46, 1997.
- [103] L. C. Schmued and K. J. Hopkins. Fluoro-Jade b: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res*, 874:123–130, 2000.
- [104] N. M. Sherwood and P. S. Timiras. *A stereotaxic atlas of the developing rat brain*. Berkeley: University of California Press, 1970.

- [105] A. T. Shulgin. The background and chemistry of MDMA. *Journal of Psychoactive Drugs*, 18(4):291–304, 1986.
- [106] R. Simantov and M. Tauber. The abused drug MDMA (Ecstasy) induces programmed death of human serotonergic cells. *FASEB J*, 11:141–146, 1997.
- [107] R. Soellner. Club drug use in germany. *Subst Use Misuse*, 40(9-10):1279–1293, 2005.
- [108] T. D. Steele, U. D. McCann, and G. A. Ricaurte. 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA, „Ecstasy“): pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction*, 89:539–551, 1994.
- [109] G. Stumm, J. Schlegel, T. Schäfer, C. Würz, H. D. Mennel, J. C. Krieg, and H. Vedder. Amphetamines induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons. *FASEB J*, 13:1065–1072, 1999.
- [110] L. W. Swanson. *Structure of the Rat Brain*. Elsevier, 1970.
- [111] R. Thomasius, editor. *Ecstasy - Wirkungen, Risiken, Interventionen (Ein Leitfaden für die Praxis)*. Stuttgart, 1999.
- [112] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci*, 76:4350–4354, 1979.
- [113] M. Wareing, J. E. Fisk, and P. N. Murphy. Working memory deficits in current and previous users of MDMA („ecstasy“). *Br J Psychol*, 91(Pt 2):181–188, 2000.
- [114] M. W. Warren, F. H. Kobeissy, M. C. Liu, R. L. H. M. S. Gold, and K. K. Wang. Ecstasy toxicity: a comparison to methamphetamine and traumatic brain injury. *J Addict Dis*, 25(4):115–123, 2006.
- [115] S. R. White, T. Obradovic, K. M. Imel, and M. J. Wheaton. The effects of methylenedioxyamphetamine (MDMA, „Ecstasy“) on monoaminergic neurotransmission in the central nervous system. *Prog Neurobiol*, 49(5):455–479, 1996.
- [116] T. Xie, L. Tong, M. W. McLane, G. Hatzifimitriou, J. Yuan, U. McCann, and G. Ricaurte. Loss of Serotonin Transporter Protein after MDMA and Other Ring-Substituted Amphetamines. *neuropsychopharmacol*, 31:2639–2651, 2006.

# A Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
$\Delta$	delta
5-HIAA	Hauptmetabolit von Serotonin
5-HT	Serotonin
ADH	Antidiuretisches Hormon
ACTH	Adreno-Corticotropes-Hormon
Akt	Proteinkinase B
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (engl. <i>bicinchoninic acid</i> )
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CA1-Region	CA = Cornu ammonis/Ammonshorn
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CT-Wert	<i>Threshold Cycle</i> = „Schwellenwert-Zyklus“
d	Tag/e
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Desoxynukleosidtriphosphate
dUTP	deoxy-Uridin-TriPhosphatase
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
et al.	et alii (lateinisch: „und andere“)
g	Gramm
g	Verhältnis zur mittleren Erdschwerebeschleunigung g, im Zusammenhang mit Zentrifugieren
h	Stunde/n
Hg	chemisches Symbol für Quecksilber
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
M	Molar

<b>Abkürzung</b>	<b>Erläuterung</b>
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
mA	Milliampere
MDMA	3,4-Methylendioxymethamphetamin (“Ecstasy“)
mg	Milligramm
min	Minute/n
ml	Milliliter
MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl, Menge
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NHSDA	<i>National Household Survey on Drug Abuse</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NIDA	national institute for/of drug abuse
O.D.-Wert	Wert der optischen Dichte (Absorptionsmaximum)
p75 <sup>NTR</sup>	p75-Neurotrophinrezeptor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatpuffer)
PCA	p-Cloroamphetamin
PCR	Polymerasekettenreaktion
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>
RNA	Ribonucleinsäure
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (=Natriumdodecylsulfat)
SEM	<i>standard error of the mean</i> = Standardfehler des Mittelwertes
sog.	sogenannt
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq-Polymerase	Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TdT-Enzym	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TrK	Tyrosinkinase
TUNEL	<i>terminal transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
U	Umdrehungen
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/w	<i>volume/weight</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

## **B Lebenslauf**

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



## C Danksagung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von Oktober 2004 bis Dezember 2005 in der Abteilung für Pädiatrie mit dem Schwerpunkt Neonatologie der Charité, Universitätsmedizin Berlin, unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Ursula Felderhoff-Müser durchgeführt.

Hiermit danke ich Frau Prof. Dr. Ursula Felderhoff-Müser für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, die fachlich Betreuung und Beratung. Der Dank gilt ferner meinem Betreuer Herrn Dr. Mark Dzietko, der mir jederzeit mit seinem Rat zur Seite stand. Für die Einführung und Hilfe bei der Einarbeitung in die Methodik möchte ich Dr. Mark Dzietko, Kerstin Genz und Jessica Fassbender meine Dankbarkeit aussprechen.

Außerdem danke ich Marco Sifringer, für die Anleitung und Unterstützung bei allen molekularbiologischen Untersuchungsmethoden.

Für das kritische Lesen der Manuskripte möchte ich Frau Dr. Rebecca Keller danken, die mit vielen guten Ideen zur Form und wissenschaftlich fundiertem Wissen eine große Hilfe war. Meiner Mutter möchte ich für die Unterstützung besonders in der Anfangszeit der schriftlichen Darlegung der Dissertation danken. Der Gedankenaustausch mit ihr war wichtig, um die ersten Zeilen zu schreiben.

Der größte Dank aber gebührt meinem Mann und Vater meiner Kinder Sebastian, der mich in der Zeit der experimentellen Laborarbeit und der schriftlichen Verfassung dieser hier vorliegenden Dissertation nach Kräften unterstützt und ausdauernd motiviert hat. Er hat meine Entscheidung mit getragen und mir oft den nötigen Freiraum geschaffen. Ausserdem sei seinen Eltern, ganz besonders seiner Mutter Jutta Fleischer für die liebevolle Betreuung unserer Kinder zu danken.

Meine Kinder sollen ebenfalls nicht unerwähnt bleiben. Ihnen möchte ich danken für die wunderbare Abwechslung und Entspannung in ihrer kindlichen Welt, die mir auch immer wieder Kraft gegeben haben, an dem Gelingen zu dieser Arbeit dranzubleiben.



## **D Erklärung an Eides Statt**

„Ich, Juliane Klaus, geboren am 23.02.1979, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Die neurotoxische Wirkung von MDMA auf das unreife Gehirn am Modell der neonatalen Ratte, 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, 04.02.2009

Juliane Klaus