

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
(Geschäftsführender Ärztl. Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler)

**Einfluss von d-Amphetamin und Amphetamin-Derivaten auf die Aktivierung
intrazellulärer apoptotischer Signalwege in PC12-Zellen**

Richard Konrad

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel
2. Univ.-Prof. Dr. A. Konnerth

Die Dissertation wurde am 08.12.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 27.09.2006 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen und Zeichenerklärung.....	5
2. Einleitung.....	7
2.1 Problemstellung.....	7
2.2.1 Serotonin- und Dopaminstoffwechsel.....	7
2.2.2 Allgemeine Pharmakologie der Amphetamine.....	8
2.2.3 Pharmakologie des d-Amphetamin.....	9
2.2.4 Pharmakologie des Methyldioxyamphetamin.....	9
2.2.5 Pharmakologie des Methyldioxymethamphetamin.....	9
2.2.6 Pharmakologie des Methylphenidat.....	11
2.3 Neurotoxizität.....	11
2.3.1 Allgemeines.....	11
2.3.2 Neurotoxizität des d-Amphetamin.....	12
2.3.3 Neurotoxizität des Methyldioxyamphetamin.....	12
2.3.4 Neurotoxizität des Methyldioxymethamphetamin.....	12
2.3.5 Neurotoxizität des Methylphenidat.....	15
2.4 Intrazelluläre Signalwege und ihre Hemmstoffe.....	15
2.4.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinase/extrazelluläre Signal-regulierte Kinase.....	16
2.4.2 Stress-aktivierte Proteinkinase/ c-Jun NH ₂ -Terminale Kinase.....	17
2.4.3 p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase.....	18
2.4.4 Akt/Proteinkinase B.....	19
2.4.5 p70 S6 Kinase.....	20
2.4.6 Caspasesignalweg.....	22
2.4.7 Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase.....	23
2.5 Differenzierung von PC12-Zellen mit Nervenwachstumsfaktor.....	24
3. Zielsetzung der Arbeit.....	26
4. Material und Methodik.....	27
4.1 Materialien.....	27
4.1.1 Chemikalien und Geräte.....	27
4.1.2 Zelllinien.....	28
4.1.3 Puffer und Lösungen.....	28
4.1.4 Nervenwachstumsfaktor (<i>Nerve Growth Factor</i> [NGF]).....	29
4.1.5 Amphetamine.....	29
4.1.6 Antikörper.....	29
4.2 Methoden.....	31
4.2.1 Zellkultur.....	31
4.2.2 Behandlung der Zellen.....	31
4.2.2.1 Behandlung der Zellen für Zytotoxizitätsassay.....	31
4.2.2.2 Behandlung der Zellen für Proteinextraktion.....	31
4.2.2.2.1 Serumentzug.....	32
4.2.2.2.2 Amphetaminbehandlung.....	32
4.2.3 Aufarbeitung der Proteine.....	33
4.2.3.1 Proteinextraktion.....	33
4.2.3.2 Proteinquantifizierung nach Bradford.....	33
4.2.3.3 Gelelektrophorese.....	33
4.2.3.4 Western Blot-Analyse.....	33
4.2.4 Zytotoxizitätsassay.....	34
4.3 Statistik.....	35
5. Ergebnisse.....	36
5.1 Ergebnisse: undifferenzierte PC12-Zellen.....	38

5.1.1 Zytotoxizitätsassays	38
5.1.2 Zytotoxizitätsassays unter Zusatz von Rapamycin	39
5.1.3 Zytotoxizitätsassays unter Zusatz von PD 98059	40
5.1.4 Zytotoxizitätsassays unter Zusatz von LY 294002	41
5.1.5 Western Blot-Analysen von undifferenzierten PC12-Zellen	42
5.1.5.1 Western Blot-Analysen von undifferenzierten PC12-Zellen nach Serumentzug	42
5.1.5.2 Western Blot-Analysen von undifferenzierten PC12-Zellen nach Amphetaminbehandlung ohne Signaltransduktionshemmstoffe	43
5.1.5.2.1 Stress-aktivierte Proteinkinase	43
5.1.5.2.2 p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase	44
5.1.5.2.3 p44/42 mitogen-aktivierte Proteinkinase	45
5.1.5.2.4 Akt	46
5.1.5.2.5 Caspase-3 aktiviert	47
5.1.5.2.6 Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase aktiviert	48
5.1.5.3 Western Blot-Analysen von undifferenzierten PC12-Zellen nach Serumentzug mit Signaltransduktionshemmstoffen	48
5.1.5.4 Western Blot-Analysen von undifferenzierten PC12-Zellen nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen	50
5.1.5.4.1 Stress-aktivierte Proteinkinase	50
5.1.5.4.2 p70 S6 Kinase	52
5.1.5.4.3 p44/42 mitogen-aktivierte Proteinkinase	54
5.1.5.4.4 Akt	56
5.2 Ergebnisse: differenzierte PC12-Zellen	58
5.2.1 Zytotoxizitätsassays	58
5.2.2 Zytotoxizitätsassays mit Rapamycin	59
5.2.3 Zytotoxizitätsassays mit PD 98059	60
5.2.4 Zytotoxizitätsassays mit LY 294002	61
5.2.5 Western Blot-Analysen von differenzierten PC12-Zellen	62
5.2.5.1 Western Blot-Analysen von differenzierten PC12-Zellen nach Serumentzug ohne Signaltransduktionshemmstoffe	62
5.2.5.2 Western Blot-Analysen von differenzierten PC12-Zellen nach Amphetaminbehandlung ohne Signaltransduktionshemmstoffe	63
5.2.5.2.1 Stress-aktivierte Proteinkinase	63
5.2.5.2.2 p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase	64
5.2.5.2.3 p44/42 mitogen-aktivierte Proteinkinase	65
5.2.5.2.4 Akt	66
5.2.5.2.5 Caspase-3 aktiviert	67
5.2.5.2.6 Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase aktiviert	68
5.2.5.3 Western Blot-Analysen von differenzierten PC12-Zellen nach Serumentzug mit Signaltransduktionshemmstoffen	68
5.2.5.4 Western Blot-Analysen von differenzierten PC12-Zellen nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen	70
5.2.5.4.1 Stress-aktivierte Proteinkinase	70
5.2.5.4.2 p70 S6 Kinase	72
5.2.5.4.3 p44/42 mitogen-aktivierte Proteinkinase	74
5.2.5.4.4 Akt	76
6. Diskussion	78
6.1 Zusammenfassung der eigenen Ergebnisse	78
6.2 Zellbiologische Untersuchungsmethoden zu Amphetaminwirkungen	80
6.3 Amphetaminwirkung auf PC12-Zellen	81

6.3.1 Undifferenzierte PC12-Zellen	81
6.3.2 Differenzierte PC12-Zellen	84
6.4 Mechanismus der Neurotoxizität von Amphetaminen	85
7. Zusammenfassung/Abstract	89
8. Literaturverzeichnis	92
9. Abbildungsverzeichnis	98
10. Danksagung	98

1. Abkürzungen und Zeichenerklärung

5-HAT	5-Hydroxitryptamin (=Serotonin)
6-OH MDMA	6-Hydroxy-Methylendioxy-N-Ethylamphetamin
ADHD	<i>Attention Deficit / Hyperactivity Disorder</i> , (Aufmerksamkeitsdefizitsyndrom)
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CYP2D6	Zytochromperoxidase 2D6
DA	d-Amphetamin
EGF	<i>endothelial growth factor</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
Extinkt.	Extinktion
FKBP12	<i>FK506-binding protein</i>
FKHRL1	<i>forkhead transcription factor</i>
GPCR	G-Proteingekoppelter Rezeptor
GSK-3	Glykogensynthasekinase-3
GTP	Guanosintriphosphat
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
JNK	c-Jun NH ₂ -Terminale Kinase
LY	LY 2940009 (<i>nur in Abbildungen</i>)
MA	Methamphetamin
MAO-A	Monoaminoxidase-A
MAO-B	Monoaminoxidase-B
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDA	Methylendioxyamphetamin
MDEA	Methylendioxy-N-Ethylamphetamin
MDMA	Methylendioxymethamphetamin
MEK	MAPK Kinase
MEKK	MAPK Kinase Kinase
MKK	MAPK Kinase
MKKK	MAPK Kinase Kinase
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>

NGF	nerve growth factor (Nervenwachstumsfaktor)
PACAP	<i>pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide</i>
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PD	PD 98059 (<i>nur in Abbildungen</i>)
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PDK	<i>phospholipid-dependent kinase</i>
PI(3,4)P ₂	Phosphatidylinositol-3,4-Diphosphat
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase C- γ
RM	Rapamycin (<i>nur in Abbildungen</i>)
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
s.c.	subkutan
SAPK	stress-aktivierte Proteinkinase
SSRI	selektive Serotoninrückaufnahmeinhibitoren
STABW	Standardabweichung
THMA	Trihydroxymethamphetamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TPH	Tryptophanhydroxylase
TrkA	Tyrosinkinaserzeptor
WB	Western Blot
→	Aktivierung
⊣	Hemmung

2. Einleitung

2.1 Problemstellung

Amphetaminderivate haben in den letzten Jahren immer mehr an Beachtung gewonnen. Das trifft sowohl für die Behandlung des ADHD (Schubert et al., 2001), als auch für den Missbrauch als Partydroge zu. Amphetamin und amphetaminartige Substanzen unterliegen in Deutschland dem Betäubungsmittelgesetz. Sie weisen überwiegend ein hohes Suchtpotential auf. Ferner haben sie eine halluzinogene, gefühlsverstärkende und stimulierende Wirkung (Thomasius und Kraus, 1999). Als indirekte Sympathomimetika verhindern sie die Rückaufnahme von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt in die präsynaptische Nervenendigung sowie die Einlagerung in die Speichervesikel (Schmoltdt, 1999). Seit längerem gibt es jedoch schon Hinweise darauf, dass Amphetamine eine neurotoxische Wirkung besitzen (Schmidt und Kehne, 1990), und dass diese Wirkung über die Entstehung freier Radikale induziert wird (Davidson et al. 2001). Die Neurotoxizität scheint dabei über die Stimulierung intrazellulärer apoptotischer Signalwege vermittelt zu werden (Deng et al., 2002; Simantov und Tauber, 1997; Cadet et al., 1997; Cadet et al., 2003; Davidson et al., 2001). In der eigenen Forschungsgruppe konnten Stumm et. al. bereits 1999 die Aktivierung apoptotischer Signalwege sowie Unterschiede in der Toxizität zwischen methylierten und nicht-methylierten Amphetaminen nachweisen. Die Induktion apoptotischer Signalwege, sowie die unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften bei der Aktivierung intrazellulärer Signalwege verschiedener Amphetamine sollten in der nun vorliegenden Arbeit weiter untersucht werden. Dabei kamen folgende Amphetamin-Derivate zum Einsatz: Das d-Amphetamin (DA), als die potentere Form der Grundsubstanz; das Methylenedioxyamphetamin (MDA), das sowohl Bestandteil von *Ecstasy*-Pillen, als auch ein Stoffwechselprodukt des als *Ecstasy* bezeichneten Methylenedioxymethamphetamin (MDMA) ist (de la Torre et al., 2000). MDMA wurde ebenfalls in der Arbeit untersucht, ebenso wie Methylphenidat, das Anwendung bei der Behandlung des ADHD findet. Auf die Substanzen wird im Folgenden noch genauer eingegangen. Anschließend wird versucht, den Einfluss dieser Amphetamin-Derivate auf die Aktivierung intrazellulärer Signalwege in phänotypisch differenzierten, als auch nativen PC12-Zellen nachzuweisen, sowie Unterschiede in der toxischen Wirkung herauszuarbeiten.

2.2.1 Serotonin- und Dopaminstoffwechsel

Serotonin kommt im Körper in den enterochromaffinen Zellen des Darmes, in Thrombozyten und in serotonergen Zellen des ZNS und des Darmes vor. Im Gehirn findet sich ein erhöhter Serotoningehalt v. a. im Hypothalamus, Mittelhirn, Nucleus caudatus und im Boden des 4.

Ventrikels (Lüllmann et al., 1999). Als Neurotransmitter spielt es dabei eine Rolle in der Regulation der Stimmung, des Schlafes und des Appetites, sowie bei kognitiven Funktionen. Niedrige Serotoninspiegel werden mit Depressionen in Verbindung gebracht (Curran, 2000). Serotonerge Neuronen besitzen zwei Serotonintransporter, die seriell geschaltet sind. Der erste befördert Serotonin aus dem synaptischen Spalt wieder zurück in die Nervenendigung. Der zweite befördert das Serotonin wieder in die Speichervesikel. Dieser besteht aus einer ATP-getriebenen H^+ -Pumpe, die im Vesikel ein saures Milieu schafft (Rudnick und Wall, 1992).

Dopamin ist eine Durchgangsstufe bei der Noradrenalin synthese. Es spielt eine wichtige physiologische Rolle als Überträgersubstanz im extrapyramidalen System. Aus hypothalamischen Neuronen freigesetztes Dopamin hemmt die hypophysäre Prolaktinsekretion. Außerdem spielt es eine Rolle bei der Übertragung chemisch ausgelöster Reize aus der Area postrema in die zugehörigen Zentren, wie z. B. am Brechzentrum. Im oberen Abschnitt des Magen-Darm-Traktes schwächt Dopamin die Propulsivbewegungen ab. Die genannten Wirkungen beruhen auf der Erregung von Dopaminrezeptoren (Lüllmann et al., 1999).

Dopamintransporter werden an Dendriten, Axonen und am Zellkörper gefunden, nicht jedoch in der aktiven Zone der Synapse. Die Signalübertragung durch Dopamin geschieht durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Die Transporter modulieren durch Aufnahme des extrazellulären Dopamin die Stärke und Dauer des Signals an dopaminergen Synapsen (Mortensen und Amara, 2003).

2.2.2 Allgemeine Pharmakologie der Amphetamine

Amphetamine und Amphetaminderivate sind, wie Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin, Derivate des Phentanylamins. Sie sind relativ lipophil und können als schwache bis mäßig starke Basen die Blut-Hirn-Schranke penetrieren. Bei den Amphetaminen und Methamphetaminen, sind die (S)-(+)-Enantiomere etwa drei- bis viermal stärker zentral wirksam als die linksdrehenden (R)-(-)-Enantiomere (Göthert et al., 2001). Sie sind starke Psychostimulantien. Zu ihren Wirkungen zählen psychische Erregung, erhöhter Wachheitsgrad, Euphorie, vermindertes Schlafbedürfnis und gesteigerte motorische Aktivität (Julien 1997). Diese Wirkungen lassen sich auf ihre dopaminergen, serotonergen (Poethke-Müller, 1999) und sympathomimetischen Effekte zurückführen (Julien, 1997). Sie besitzen als Partydrogen ein hohes Missbrauchspotential, die rasch zur psychischen Abhängigkeit führen kann und mit einer schnell entstehenden Toleranzentwicklung einhergeht (Julien, 1997). Bei der Behandlung des ADHD mit Methylphenidat (Ritalin ®) wurde noch keine Abhängigkeit

beobachtet (Tölle, 1999). Auf die Besonderheiten der in der Arbeit verwendeten Amphetamine soll nun im Folgenden noch genauer eingegangen werden.

2.2.3 Pharmakologie des d-Amphetamin

DA, das (S)-(+)-Enantiomer des Amphetamin, ist bei der Behandlung von Patienten mit ADHD genauso effektiv wie Methylphenidat (Markowitz und Patrick, 2001). Des Weiteren besitzt das DA aber auch eine euphorisierende und antriebssteigernde Wirkung (Schmoltdt, 1999). Dank seiner guten Lipidlöslichkeit wird oral eingenommenes DA nahezu vollständig von der Dünndarmmukosa resorbiert (Göthert et al., 2001). Rund ein Drittel wird unverändert wieder mit dem Harn ausgeschieden (Markowitz und Patrick, 2001). Die restliche im Körper verbleibende Menge wird nach Hydroxilierung und Konjugation mit Glukuronsäure ebenfalls über die Nieren ausgeschieden (Göthert et al., 2001).

Die psychostimulierende Wirkung von DA wird durch die Freisetzung von Dopamin in den synaptischen Spalt bewirkt (Markowitz und Patrick, 2001). DA ist ein Substrat der Monoamintransporter dopaminerger, noradrenerger und adrenerger Neurone und in der Membran der Speichervesikel (Göthert et al., 2001). Crespi et al. (1997) konnten eine deutliche Affinität von DA zu den Dopamintransportern nachweisen. Es besitzt jedoch keine Affinität zu den Adreno- oder Dopaminrezeptoren. An den Membrantransportproteinen konkurriert es mit den Monoaminen um die Aufnahme in die Nervenendigungen und Vesikel (Göthert et al., 2001). Die Transmitterfreisetzung ist unabhängig von der Erregung der Neurone. Als weitere sekundäre DA-Wirkungen, sind noch die Hemmung der Katecholaminaufnahme sowie die Hemmung der Monoaminoxidase zu nennen (Markowitz und Patrick, 2001).

2.2.4 Pharmakologie des Methylenedioxyamphetamin

MDA wirkt sowohl psychomotorisch stimulierend, hat aber auch halluzinogene Eigenschaften. Dies beruht vermutlich auf der chemischen Struktur, die sowohl den stimulierenden Amphetaminen als auch dem Meskalin, einem bekannten Halluzinogen, ähnelt (Ricaurte et al., 1985). Es ist neben MDMA und MDEA häufig in sog. *Ecstasy*-Pillen enthalten. Da es ähnliche chemische als auch biologische Eigenschaften besitzt wie MDMA (Kalant, 2001), werden diese beiden Substanzen gemeinsam im Kapitel 2.2.5 beschrieben.

2.2.5 Pharmakologie des Methylenioxymethamphetamin

Die als Partydrogen missbrauchten Substanzen MDA und MDMA haben sowohl einen euphorisierenden als auch einen antriebssteigernden Effekt (Kalant, 2001). Sie zeichnen sich v. a. durch eine schwache halluzinogene Wirkung, eine deutliche Antriebssteigerung und eine

gefühlverstärkende, bzw. gefühlserzeugende entaktogene Hauptwirkung aus. Die antriebssteigernde und entaktogene Wirkung steht bei MDA im Hintergrund, dafür ist die halluzinogene Wirkung ausgeprägter als bei MDMA (Poethke-Müller, 1999). MDMA wird im Intestinaltrakt vollständig resorbiert (Kalant, 2001). In der Leber wird MDMA hauptsächlich durch das Enzym CYP2D6 metabolisiert. Einige weitere am Abbau beteiligte Enzyme sind bereits bei relativ niedrigen Konzentrationen gesättigt, so dass es zu einem raschen Anstieg an Gewebe- und Plasmakonzentration kommen kann und somit bei steigender Dosis die Toxizitätsgefahr zunimmt. MDA ist der erste Metabolit von MDMA (Kalant, 2001), und entsteht durch Demethylierung. Aus beiden Substanzen entsteht durch Demethylierung 3,4-Dihydroxymethamphetamin und 3,4-Dihydroxyamphetamin. Durch erneute Methylierung entsteht daraus 4-Hydroxy-3-Methoxy-Methamphetamin und 4-Hydroxy-3-Methoxy-Amphetamin. Diese vier Stoffwechselprodukte, v. a. 4-Hydroxy-3-Methoxy-Methamphetamin und 4-Hydroxy-3-Methoxy-Amphetamin, werden im Urin als konjugierte Glukuronide oder Sulfate ausgeschieden (de la Torre et al., 2000).

MDMA und MDA verursachen eine Freisetzung von Serotonin, Noradrenalin und in geringerem Ausmaß auch von Dopamin (Kalant, 2001), wobei hauptsächlich die serotonerge Wirkkomponente von Bedeutung ist (Schmoltdt, 1999). Die Dopaminfreisetzung kommt zum einen durch die direkte MDMA-Wirkung am Dopamintransporter und zum anderen indirekt als Ergebnis der Serotoninfreisetzung zustande (O'Shea et al., 2001). Die Erhöhung der Serotoninkonzentration im synaptischen Spalt erfolgt durch drei Mechanismen:

1. Durch die Freisetzung von Serotonin aus der präsynaptischen Nervenendigung,
2. durch die Hemmung der Rückaufnahme und
3. durch Hemmung der für den Serotoninabbau verantwortlichen MAO-A (Gu und Azmitia, 1993).

Der Serotoninefflux aus der Nervenendigung erfolgt durch direkte Interaktion mit dem Na⁺-abhängigen Serotonintransporter (Rudnick und Wall, 1992). Es kommt dabei zu einem Austausch von MDMA und Serotonin am Serotonintransporter, der sich durch SSRI blockieren lässt (Schuldiner et al., 1993).

Die Serotoninfreisetzung aus den Speichervesikeln ist wesentlich komplexer, da MDMA neben seiner direkten Wirkung auf den Serotonintransporter zusätzlich den pH-Gradienten aufhebt. Die Fähigkeit von MDMA, den pH-Gradienten aufzuheben, zeigt, dass es permeabel ist. Extrazelluläres MDMA gelangt somit via des Serotonintransporters oder passiv ins Zytoplasma. In die synaptischen Vesikel gelangt es anschließend über einen intravesikulären, H⁺-verbrauchenden Prozess (Rudnick und Wall, 1992). Des Weiteren ist MDMA ein

spezifischer Inhibitor der MAO-A im Gehirn. Da dadurch der Serotoninabbau gehemmt wird, kommt es somit indirekt zu einer Erhöhung des Neurotransmitters im synaptischen Spalt (Gu und Azmitia, 1993).

2.2.6 Pharmakologie des Methylphenidat

Methylphenidat ist das am häufigsten verabreichte Medikament zur Behandlung von ADHD. Die therapeutische Wirkung kommt dabei durch das (+)-Enantiomer zustande. Methylphenidat wird durch Esterasen vorwiegend zur inaktiven Ritalinsäure abgebaut. Die Ausscheidung erfolgt renal (Markowitz und Patrick, 2001).

Neuropharmakologisch wirkt Methylphenidat als Dopaminrückaufnahmehemmer. Beide Substanzen konkurrieren dabei um die Bindungsstellen am Dopamintransporter. Anders als die bereits beschriebenen Amphetamine und Methamphetamine ist die pharmakologische Wirkung von Methylphenidat von der Erregung des Axons abhängig. Der Wirkmechanismus beruht auf einer verlängerten prä- und postsynaptischen Dopamininteraktion. Bisher gibt es noch keine Befunde darüber, dass Methylphenidat mittels Transportproteine ins Zytoplasma gelangt. Deshalb spielt bei dieser Substanz die präsynaptische Transmitterfreisetzung nur eine untergeordnete Rolle (Markowitz und Patrick, 2001).

2.3 Neurotoxizität

2.3.1 Allgemeines

Als Komplikationen nach missbräuchlicher Amphetamineinnahme können u. a. Hyperthermie, Rhabdomyolyse und disseminierte intravasale Koagulopathien mit letalem Ausgang auftreten. Während die internistischen Komplikationen dosisunabhängig zu sein scheinen, gibt es Hinweise darauf, dass bei *Ecstasy*-Konsumenten auftretende Psychosen von der Gesamtdosis abhängen (Poethke-Müller, 1999). Die psychiatrischen Störungen werden vermutlich durch den Untergang serotonerger Neurone verursacht und halten Monate bis Jahre nach der letzten Amphetamineinnahme an (Kalant, 2001). Die Neurotoxizität vieler Amphetamine konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen werden (Ricaurte et al., 1985; Ricaurte et al., 2000), ist jedoch am Menschen nicht sicher belegt (McCann et al., 2000; Curran, 2000). Die in Tierversuchen beobachteten Effekte ereigneten sich bei Dosen, die nahe an den von *Ecstasy*-Konsumenten liegen (Burgess et al., 2000). Mehrere Befunde weisen mittlerweile daraufhin, dass der Zelltod nach Amphetamineinnahme apoptotisch vermittelt wird (Deng et al., 2002; Simantov und Tauber, 1997; Stumm et al., 1999; Cadet et al., 1997; Cadet et al., 2003; Davidson et al., 2001), und dass diese Wirkung über die Entstehung freier Radikale induziert wird (Davidson et al., 2001).

Tabelle 2.3.1 gibt einen Überblick über das neurotoxische Spektrum, der in der Arbeit verwendeten Amphetamine:

	Dopaminneurotoxin	5-HT-Neurotoxin	nichttoxisch
Amphetamin	DA	MDA/MDMA	Methylphenidat
Transmitter-Freisetzung	Dopamin>>5-HT	5-HT>>Dopamin	Dopamin

Tabelle 2.3.1 Neurotoxisches Spektrum der Amphetamine und ihre Korrelation mit Monoaminfreisetzung (nach Schmidt und Kehne, 1990, modifiziert nach Yuan et al., 1997)

2.3.2 Neurotoxizität des d-Amphetamin

DA ist an dopaminergen Neuronen toxisch (Schmidt und Kehne, 1990), andere Autoren beschreiben aber auch eine Neurotoxizität an serotonergen Neuronen (McKenna und Peroutka, 1990). Die Zerstörung dopaminerger Nervenendigungen geht mit einer lang anhaltenden Reduzierung der Dopaminkonzentration sowie seiner Metaboliten im Striatum einher. Ferner findet sich eine verringerte Dichte der Dopamintransporter und eine verringerte Aktivität des für die Dopaminsynthese zuständigen Enzyms Tyrosinhydroxylase (Wan et al., 2000).

Wie die neurotoxische Wirkung zustande kommt, ist noch nicht geklärt. Miller und O'Callaghan (Miller und O'Callaghan, 1996), die zwei verschiedene Mäusestämme mit DA behandelten, vermuten einen Zusammenhang mit dem Anstieg der Körpertemperatur. Nach Vorbehandlung mit *restraint*, das eine Abnahme der Körpertemperatur bewirkt, konnten sie keine Reduktion des striatalen Dopamins und der Tyrosinhydroxylase mehr nachweisen, die normalerweise mit der DA-Toxizität assoziiert wird. Lin et al. (1999) gehen davon aus, dass oxidativer Stress in der Neurotoxizität von DA eine entscheidende Rolle spielt. Bei intrastriataler DA-Administration mittels Mikrodialyse bei Ratten, konnte ebenfalls eine Zunahme von Hydroxylradikalen, nicht jedoch eine Erhöhung der Temperatur festgestellt werden (Wan et al., 2000).

2.3.3 Neurotoxizität des Methyldioxyamphetamin

Ricaurte et al. (1985) konnten nachweisen, dass MDA selektiv serotonerge Nervenendigungen in Rattenhirnen zerstört. Da MDA sich ähnlich verhält wie MDMA (Kalant, 2001), wird es nun im Folgenden mit dieser Substanz beschrieben.

2.3.4 Neurotoxizität des Methyldioxymethamphetamin

Die neurotoxische Wirkung von MDA und MDMA ist mittlerweile belegt (Schmidt und Kehne, 1990; Yuan et al., 1997). Kleven und Seiden (1992) haben vier Kriterien für die Neurotoxizität der Amphetamin-Analoga zusammengefasst:

- (a) lang anhaltender Verbrauch von Serotonin oder Dopamin,
- (b) Abnahme der Serotonin- oder Dopaminrezeptoren,
- (c) Abnahme der Aktivität der für die Serotonin- oder Dopaminsynthese zuständigen Enzyme und
- (d) Änderungen der neuronalen Morphologie.

MDMA wird metabolisiert zu MDA, DHMA und 6-OH MDMA die ihrerseits wiederum neurotoxische Wirkung besitzen. Untersuchungen mit 6-OH MDMA nach systemischer als auch nach intrazerebraler Verabreichung zeigten jedoch, dass es selbst zu keinem Serotoninverbrauch führt – ein Hinweis darauf, dass es auch selbst nicht direkt neurotoxisch wirkt. Es unterliegt jedoch im Organismus einer Metabolisierung zu THMA, das analog dem bekannten Neurotoxin 6-Hydroxydopamin ist. Zusätzlich konnte nach direkter intrastriärer Injektion ein Serotonin- und Dopaminverbrauch beobachtet werden (Walker et al., 1999).

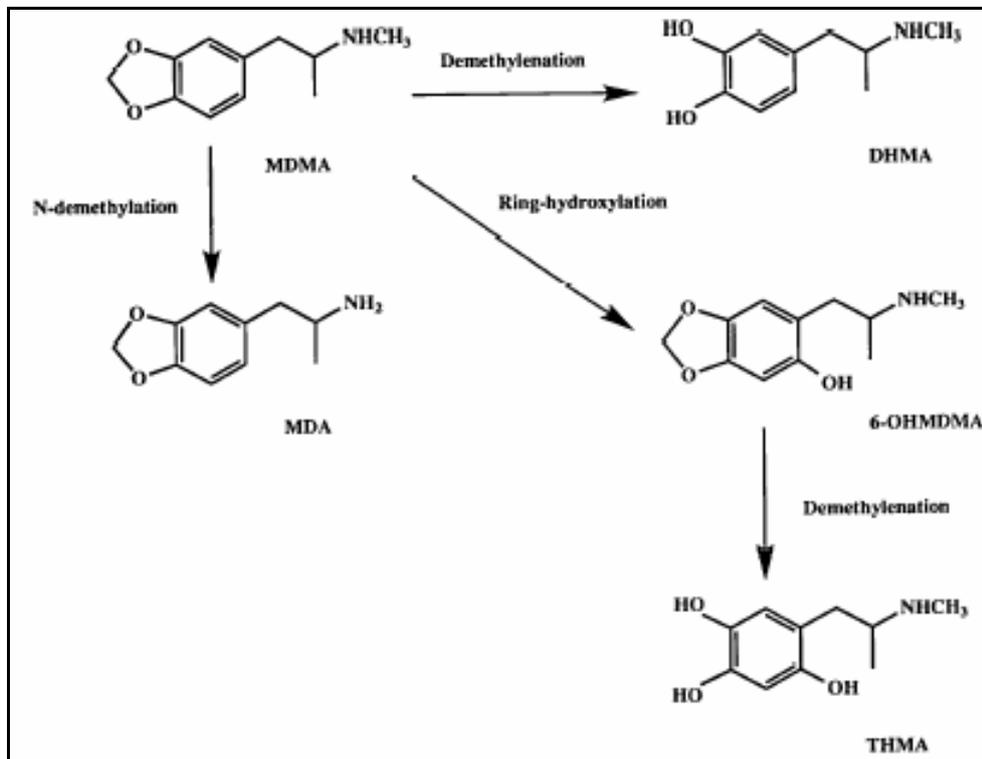


Abb. 2.3.1 MDMA und seine neurotoxischen Metaboliten (aus Chu et al., 1996)

Eine dosisabhängige Abnahme des für die Serotoninsynthese wichtigen Enzyms TPH wurde ebenso nach MDA- und MDMA-Gabe beschrieben, wie auch morphologische Veränderungen mit charakteristischer Abnahme der Anzahl immunreaktiver serotonerger Axone, geschwollener Zellvarikositäten am proximalen Ende der Axone sowie einer Fragmentierung der feinen axonalen Fasern (Hegadoren et al., 1999). Obwohl es den meisten Forschern nicht gelungen ist zu zeigen, dass die Zellkörper ebenfalls davon betroffen sind, konnten Simantov

und Tauber (1997) zeigen, dass MDMA eine apoptotische Reaktion durch Induzierung von DNA-Fragmentation hervorruft.

Der Grad der Erholung und die dafür benötigte Zeit scheinen abhängig zu sein von der Dosis, der Verabreichungsform (oral, s.c., i.v., i.p.), den spezifischen untersuchten biologischen Markern und den untersuchten Hirnregionen, der Spezies sowie den verwendeten Amphetaminanaloga (Hegadoren et al., 1999).

Obwohl die serotonerge Neurotoxizität von MDA und MDMA mittlerweile belegt ist, ist der zu Grunde liegende Mechanismus noch nicht geklärt. Neuere Untersuchungen sprechen für die Entstehung freier Radikale, die sich in zellulären Veränderungen, wie z. B. der Peroxidation von Lipiden und Nitrierung von Proteinen zeigt (Shankaran et al., 1999 [a]). An transgenen Mäusen, die eine Überexprimierung der humanen Kupfer/Zink-Superoxiddismutase zeigten, konnte eine Attenuierung des oxidativen Stresses nach MDMA-Behandlung und somit eine deutliche Abschwächung der Neurotoxizität nachgewiesen werden (Jayanthi et al., 1999). Die Entstehung von toxischen Hydroxylradikalen kann sowohl durch den Abbau von Dopamin als auch von MDMA selbst zustande kommen (Shankaran et al., 1999 [b]). Colado und Mitarbeiter (Colado et al., 1997) führen die Entstehung von freien Radikalen auf oxidative Metaboliten von MDMA selbst zurück, die innerhalb der serotonergen Nervenendigung entstehen. Sprague et al. (1998) spekulieren, dass das von MDMA freigesetzte Dopamin durch einen aktivierten Serotonintransporter in die serotonerge Nervenendigung gelangt. Dort wird es durch die MAO-B oxidiert und es entstehen dabei freie Radikale. Begünstigt wird die Entstehung von freien Radikalen durch die von MDMA ausgelöste Hyperthermie. In ihrer Arbeit konnten Colado et al. (1999) nachweisen, dass der neuroprotektive Effekt von Haloperidol durch die Aufhebung der akuten MDMA-induzierten Hyperthermie zustande kommt.

Der Serotonintransporter scheint bei der Vermittlung der Neurotoxizität eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Behandlung von Ratten mit Fluoxetin schützt vor einem durch MDMA ausgelösten Verbrauch von Serotonin im Striatum. Durch den Einsatz von Fluoxetin konnte eine reduzierte Bildung von Hydroxylradikalen nach MDMA-Behandlung beobachtet werden. Ein potentieller Mechanismus, wie Fluoxetin die Bildung von Hydroxylradikalen abschwächt, wäre die Verhinderung des Eintritts von reaktiven Substanzen in die serotonergen Nervenendigungen, die zur Entstehung von freien Radikalen führen (Shankaran et al., 1999 [a]).

2.3.5 Neurotoxizität des Methylphenidat

Über die Neurotoxizität von Methylphenidat gibt es bisher wenige Untersuchungen. In zwei Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass es im Tierversuch nach Methylphenidatbehandlung zu keinen lang andauernden Änderungen von Katecholaminaxonmarkern im Gehirn kommt (Wagner et al., 1980; Zaczek et al., 1989). Yuan und Mitarbeiter (Yuan et al., 1997) zeigten an Swiss-Webster-Mäusen, die auf MA-Behandlung besonders empfindlich reagieren, dass Methylphenidat zu einer kurzfristigen Reduzierung von Dopaminaxonmarkern führt. Sie folgerten daraus, dass Methylphenidat kein dopaminerges neurotoxisches Potential besitzt.

2.4 Intrazelluläre Signalwege und ihre Hemmstoffe

Die mitogen-aktivierten Proteinkinase sind Serin/Threoninkinase, die auf zellulärer Ebene u. a. an der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Überleben beteiligt sind. Aktiviert werden sie durch Phosphorylierung. Die Aktivierung von SAPK/JNK und p38 MAPK wird im Allgemeinen mit der Förderung von Apoptose in Verbindung gebracht, während die Aktivierung von p44/42 MAPK die Apoptose hemmt. Die Aktivierung von p44/42 MAPK erfolgt vornehmlich bei proliferativen Prozessen, wobei vermutet wird, dass ihre Fähigkeit zur Hemmung der Apoptose eher zweitrangig ist (Cross et al., 2000). Viele extrazelluläre Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, mechanischer Stress, UV-Licht, osmotischer Stress und Hitzeschock führen zu einer Aktivierung der MAPK-Signalwege (Zheng et al., 2000). NGF-Entzug an differenzierten PC12-Zellen führt somit zu einer Aktivierung von SAPK/JNK und p38 MAPK, sowie zu einer Hemmung von p44/42 MAPK (Xia et al., 1995).

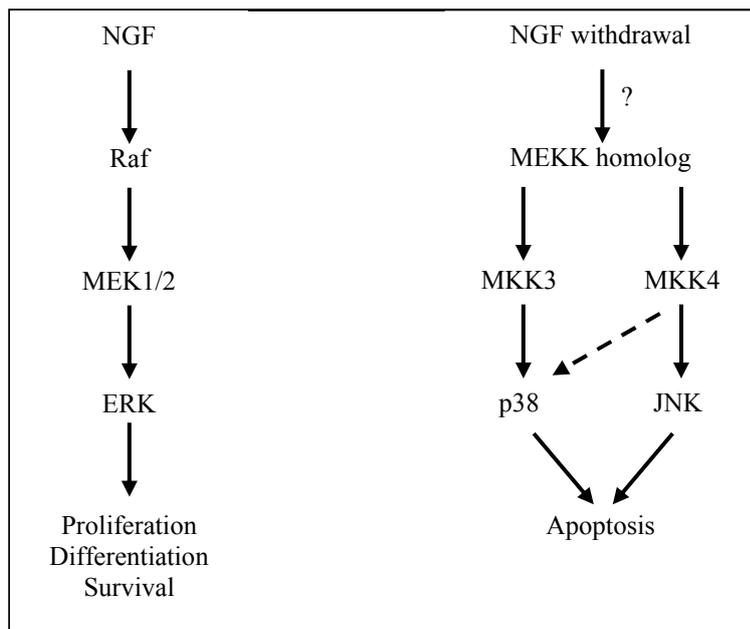


Abb. 2.4.1 Modell über die Rolle des ERK- und JNK-p38 Kinasepfades während der Apoptose (aus Xia et al., 1995, S. 1330, Fig. 6)

Die in der Arbeit untersuchten Signalwege MAPK/ERK, SAPK/JNK, p-38, Akt/PKB, p70 S6K sowie Caspase-3 und PARP sollen nun genauer erläutert werden.

2.4.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinase/extrazelluläre Signal-regulierte Kinase

Die p44/42 MAPK, auch ERK 1/2 genannt, wird durch Wachstumsfaktoren wie NGF und EGF aktiviert (Widmann et al., 1999). Daneben gibt es noch weitere Rezeptoren für die Aktivierung von p44/42, wie Zytokinrezeptoren und GPCR (Widmann et al., 1999; Vaudry et al., 2002). Nach Bindung von NGF an die TrkA wird Ras über Bindung an GTP aktiviert. So aktiviert, bindet und aktiviert Ras weitere nachgeschaltete Effektoren, wie z. B. die Serin/Threoninkinase Raf (Agell et al., 2002). Weitere nachgeordnete Kinasen sind MEK 1 und 2, die durch Raf aktiviert werden. Sie aktivieren p44/42 MAPK durch Phosphorylierung an Threonin/Tyrosinresiduen. Die aktivierte ERK 1/2 gelangt umgehend in den Zellkern, wo sie die Aktivität weitere Proteine, einschließlich Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Spezifische Phosphatasen inaktivieren ERK 1/2 durch Dephosphorylierung (Widmann et al., 1999). Die Aktivierung von p44/42 MAPK ermöglicht verschiedene zelluläre Prozesse (Agell et al., 2002). EGF, der eine Zellproliferation bewirkt, induziert eine schnelle und kurze Aktivierung von ERK, wohingegen eine Stimulierung von ERK durch NGF sowohl zu einer schnellen, als auch zu einer lang anhaltenden Aktivierung, und somit zu einem Wachstumsstopp und Aussprossen von Neuriten führt (Vaudry et al., 2002).

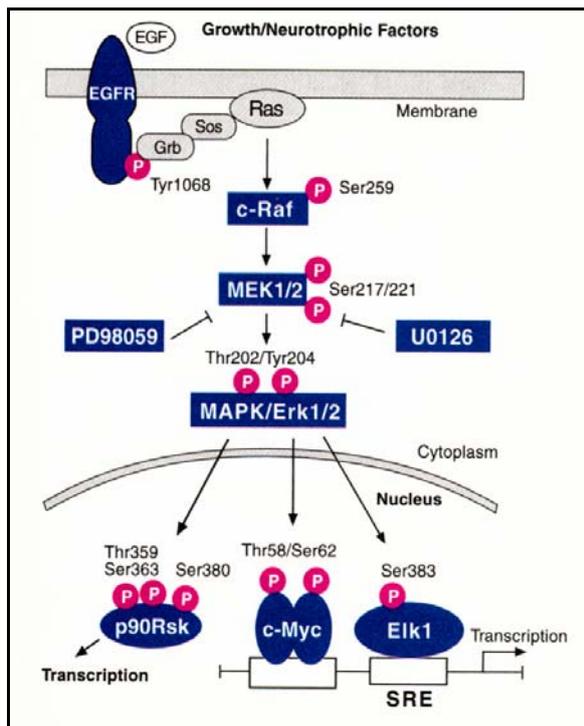


Abb. 2.4.2 MAPK/ERK: Signalwegkaskade (aus Cell Signaling Technology: "Catalog & Technology Reference," 2002, S. 49)

Ein selektiver pharmakologischer Hemmstoff der MEK 1/2, und somit konsekutiv der ERK 1/2 ist PD 98059 (Alessi et al., 1995; Pang et al., 1995)

2.4.2 Stress-aktivierte Proteinkinase/ c-Jun NH₂-Terminale Kinase

Die durch zellulären Stress aktivierte Kinase SAPK/JNK phosphoryliert und aktiviert c-Jun. Das im Menschen entdeckte Homolog wurde c-Jun NH₂-Terminale Kinase (JNK), das in der Ratte entdeckte Homolog stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) benannt. SAPK/JNK wird durch eine Vielzahl von Zellrezeptoren, wie TNF-Rezeptoren, GPCR, Tyrosinkinaserzeptoren und Zytokinrezeptoren aktiviert. Sie erfolgt nach Bindung an die spezifischen Kinasen MKK 4 und 7 durch Phosphorylierung von Threonin und Tyrosin. Diese können wiederum durch eine Vielzahl weiterer MEKKs phosphoryliert und aktiviert werden. Die Aktivität von SAPK/JNK kann wiederum von spezifischen Phosphatasen herunterreguliert werden. Bis heute sind als Substrate für SAPK/JNK ausschließlich Transkriptionsfaktoren bekannt (Widmann et al., 1999).

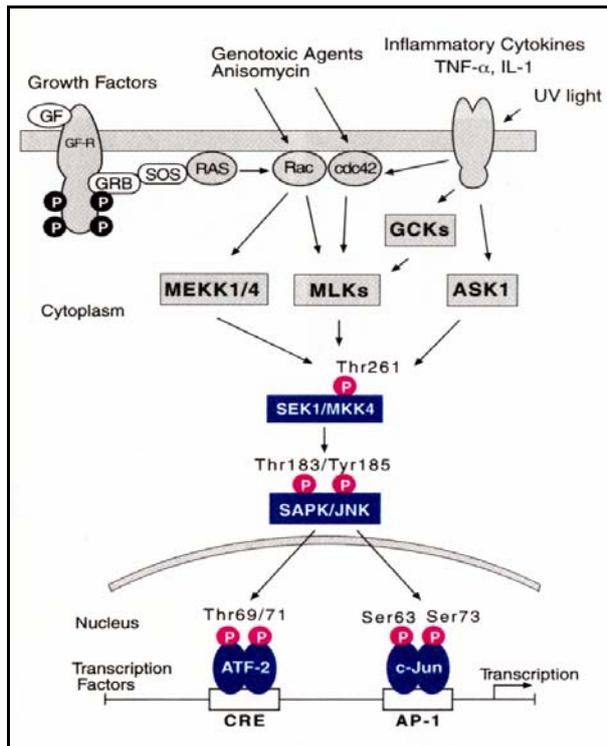


Abb. 2.4.3 SAPK/JNK: Signalwegkaskade (aus Cell Signaling Technology: "Catalog & Technology Reference," 2002, S. 63)

2.4.3 p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase

Die Aktivierung von p38 MAPK erfolgt durch zellulären Stress, verschiedene Zytokine wie z. B. Interleukin-1 und TNF- α , sowie durch GPCR. Ihr geht die Aktivierung von verschiedenen spezifischen Proteinkinasen voraus. Nach erfolgter Phosphorylierung verschiedener MKKKs werden MKK 3 und 6 phosphoryliert und somit aktiviert. Sie aktivieren wiederum p38 MAPK durch zweifache Phosphorylierung an Threonin und Tyrosin. Nach der Stimulierung der p38 MAPK-Aktivität werden verschiedene Substrate spezifisch phosphoryliert. Zu ihnen gehört die MAPK-aktivierte Proteinkinase 2 und 3, die nach erfolgter Phosphorylierung aktiviert ist und die wiederum kleine Hitzeschock Proteine phosphoryliert. Andere Substrate von p38 MAPK sind Transkriptionsfaktoren. p38 MAPK wird negativ reguliert durch verschiedene spezifische Phosphatasen. Ein spezifischer Hemmstoff von p38 MAPK ist SB 203580 (Widmann et al., 1999).

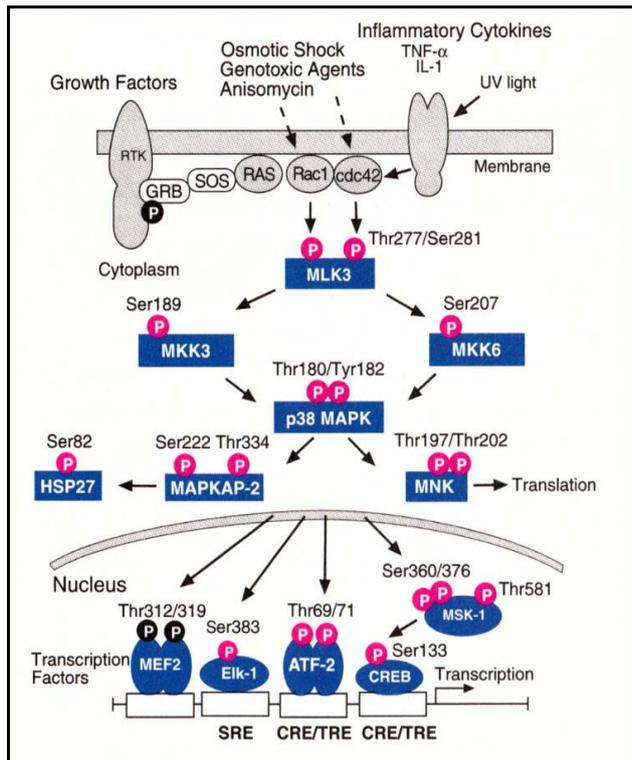


Abb. 2.4.4 p38 MAPK: Signalwegkaskade (aus Cell Signaling Technology: "Catalog & Technology Reference," 2002, S. 68)

2.4.4 Akt/Proteinkinase B

Ebenso wie die MAP-Kinasen ist Akt/PKB ebenfalls eine Serin/Threoninkinase. Sie wird überwiegend mit der Apoptoseinhibierung in Zusammenhang gebracht. Die Aktivierung von Akt/PKB erfolgt durch die PI3K, die wiederum durch eine Vielzahl von Rezeptoren, unter ihnen auch Wachstumsrezeptoren, aktiviert wird. Der Aktivierung der PI3K folgt eine Aktivierung der PIP₃ und PI(3,4)P₂. Durch die PIP₃ und PI(3,4)P₂ wird anschließend die PDK 1 und 2 aktiviert, die wiederum durch Phosphorylierung an Threonin- und Serinresiduen die PKB/Akt aktiviert. Durch Phosphorylierung einer Vielzahl von Substraten nimmt somit PKB/Akt direkten Einfluss auf apoptotische Signalwege. So inhibiert es die proapoptotische Funktion von Bad. Durch Phosphorylierung wird Bad, ein Mitglied der bcl-2-Familie an das Protein 14-3-3 gebunden und somit seine proapoptotische Funktion aufgehoben. Ebenfalls wird durch Phosphorylierung die Proteaseaktivität der Caspase-9 reduziert. Nach Hemmung des Transkriptionsfaktors FKHL1 wird die Synthese proapoptotischer Proteine, wie z.B. des Fas-Liganden inhibiert (Cross et al., 2000). Auch andere Enzyme, wie die GSK-3 werden durch PKB/Akt phosphoryliert und dadurch inaktiviert. Obwohl die spezifische Funktion der GSK-3 noch nicht ganz verstanden wird, konnte in Studien gezeigt werden, dass sie an der Apoptosehemmung durch Wachstums- und Überlebensfaktoren beteiligt ist (Duronio et al.,

1998). Durch die Caspase-3 wird PKB/Akt frühzeitig während des apoptotischen Programms gespalten und dadurch inaktiviert (Cross et al., 2000).

Ein spezifischer Hemmstoff der PI3K ist LY294002 (Vlahos et al., 1994). Im mikromolaren Bereich konkurriert es dabei reversibel um ATP-Bindungsstellen. Dadurch wird die Phosphorylierung des antiapoptotischen Akt-Signalweges vollständig blockiert (Llorens et al., 2002). Yao und Cooper (1995) erhielten durch die spezifische Hemmung der PI3K einen Hinweis darauf, dass die Verhinderung der Apoptose eine wichtige Funktion dieses Signalweges ist. Spear et al. (1997) und Shimoke und Chiba (2001) berichten, dass sie nach Zugabe von Peroxynitrat, bzw. MPTP zu PC12-Zellen, den protektiven Effekt von NGF durch den Zusatz von LY294002 eliminieren konnten.

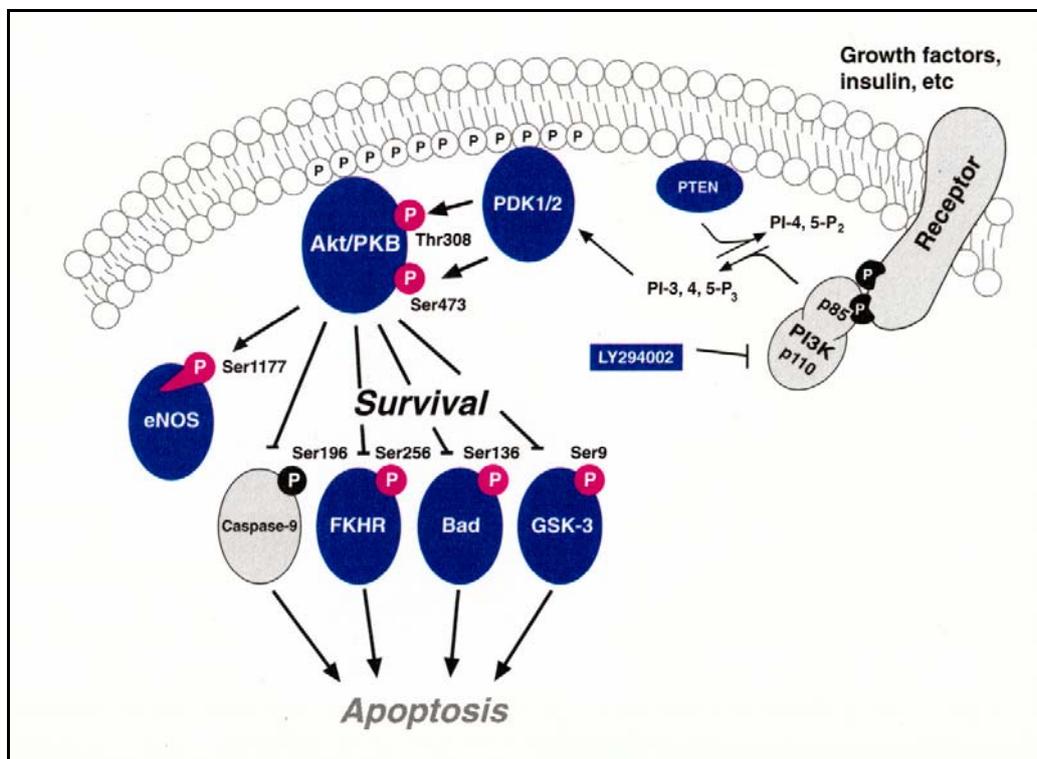


Abb. 2.4.5 Akt/PKB: Signalwegkaskade (aus Cell Signaling Technology: "Catalog & Technology Reference," 2002, S. 108)

2.4.5 p70 S6 Kinase

Die gemeinsame Hochregulierung von Transkription und Translation wird von Zellen nach einem mitogenen Stimulus für Wachstum und Zellteilung benötigt. Dabei wird eine Zunahme der Phosphorylierung und somit Aktivierung des ribosomalen Proteins S6 beobachtet. Diese Aktivierung wird durch die zwei Proteinkinasen p70 S6K und p85 S6K reguliert. Beide Isoformen sind auf demselben Gen kodiert. Über die Funktion der p85 S6K ist bisher wenig bekannt, wohingegen p70 S6K die Aktivität der intranukleosomalen Form von S6 reguliert (Dennis et al., 1998). Ebenso wie PKB/Akt wird auch die p70 S6K durch die PI3K aktiviert

(Duronio et al., 1998). Die Aktivierung erfolgt über die PDK1 durch Phosphorylierung an Threonin 229 (Dennis et al., 1998). Die Hemmung der p70 S6K erfolgt durch Dephosphorylierung durch Rapamycin und Wortmannin (Duronio et al., 1998). Rapamycin ist ein potenter Inhibitor von Zellwachstum und Proliferation. Als Komplex mit seinem zellulären Rezeptor FKBP12 bindet und hemmt Rapamycin mTOR. mTOR reguliert in Abhängigkeit vom Angebot an Aminosäuren translationelle Prozesse und andere zelluläre Funktionen (Chen und Fang, 2002).

Des weitern konnten Parker et al. (2000) beobachten, dass in Gegenwart von NGF unter Rapamycin das Aussprossen von Neuriten bei PC12-Zellen zunahm. Diesen Effekt führten sie auf die Fähigkeit von Rapamycin zurück, den Zellzyklus zu hemmen.

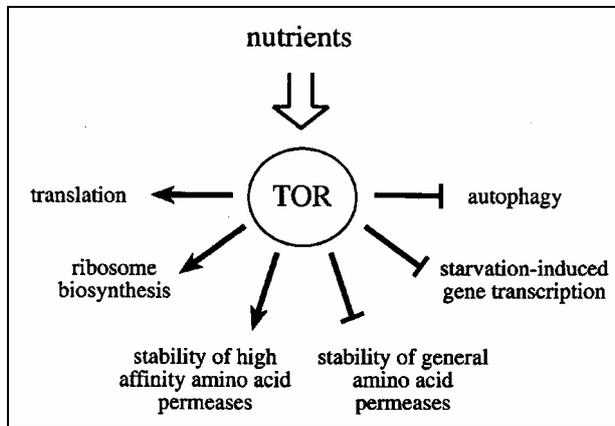


Abb. 2.4.6 Die TOR-Proteine regulieren die Balance zwischen der Proteinsynthese und Proteinabbau. (aus Raught et al., 2001, S. 7038, Fig. 1)

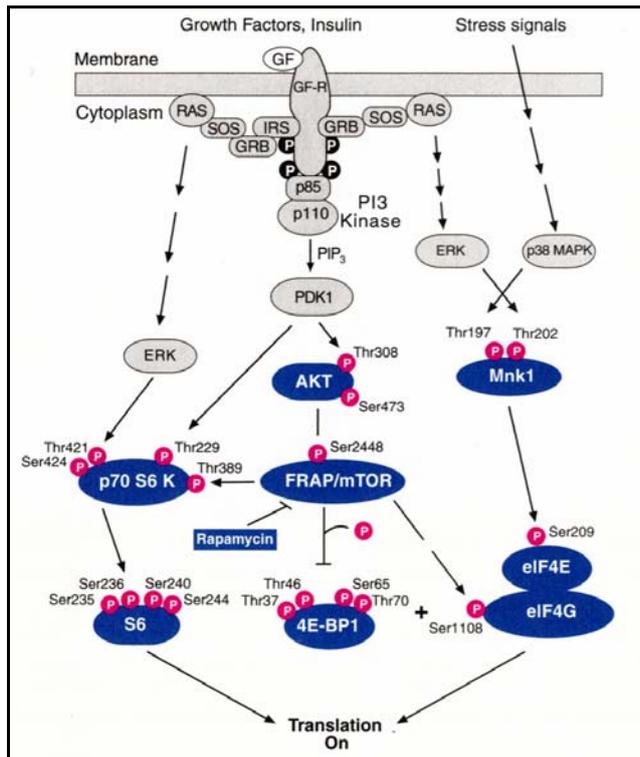


Abb. 2.4.7 Angriffspunkt von Rapamycin (aus Cell Signaling Technology: "Catalog & Technology Reference," 2002, S. 122)

2.4.6 Caspasesignalweg

Die Regulierung der Caspasenaktivität ist ein Schlüsselereignis während des apoptotischen Prozesses. Ihre Aktivierung ist verantwortlich für eine Vielzahl von morphologischen Veränderungen, einschließlich mitochondrialer Schädigung, Zusammenbruch der Zellkernmembran, DNA-Fragmentierung, Chromatinkondensation und der Entstehung von apoptotischen Körperchen.

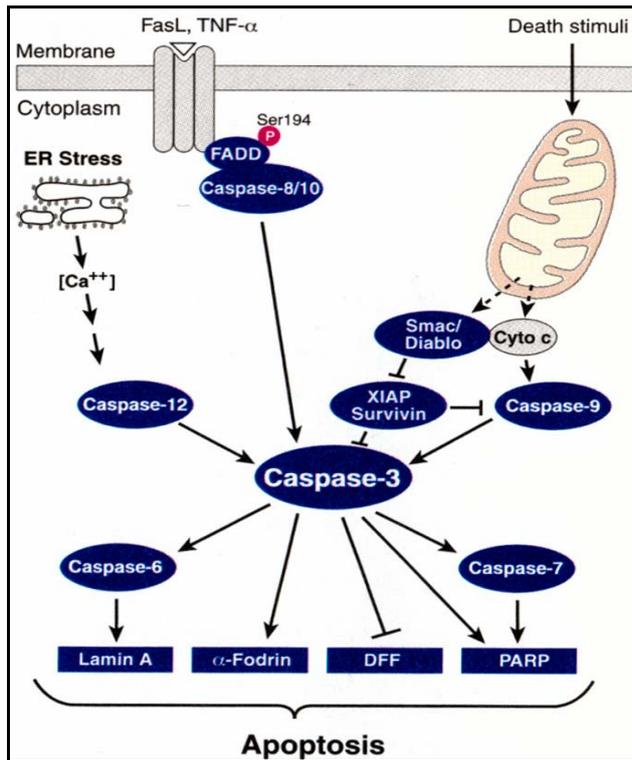


Abb. 2.4.8 Caspasesignalsweg (aus Cell Signaling Technology: "Catalog & Technology Reference," 2002, S. 80)

Bisher wurden mehr als 14 Caspasen beschrieben. Die Caspase-1 und Caspase-11 nehmen hauptsächlich an der Signalverarbeitung nach Stimulation mit Zytokinen teil. Dahingegen sind die Caspasen 2, 3, 6, 7, 8, 9 und 10 an der Regulierung und Ausführung der Apoptose beteiligt. Sie sind Cysteinproteasen. Sie liegen inaktiv als Procaspasen vor und erhalten ihre proteolytische Fähigkeit durch peptidische Spaltung. Gegenwärtig sind zwei Kaskaden bekannt, die die Caspasen während des apoptotischen Prozesses aktivieren: Eine geht von einem Todesrezeptorsignal an der Zelloberfläche aus, die andere von Störungen an der Mitochondrienmembran. Kommt es zur Freisetzung von Zytochrom C aus Mitochondrien, entstehen Apaf-1/Zytochrom C-Komplexe, die die Procaspase-9 durch Spaltung aktivieren. Die Caspase-9 wiederum aktiviert die nachgeschalteten Caspasen 3, 6 und 7. Nach Aktivierung von sog. Todesrezeptoren wird zunächst die Procaspase-8 aktiviert. Diese aktiviert wiederum weitere Caspasen entweder direkt durch Spaltung, oder indirekt durch Spaltung von Bid und damit Freisetzung von Zytochrom C aus den Mitochondrien (Budihardjo et al., 1999).

2.4.7 Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase

PARP ist ein Enzym, das DNA-Strangbrüche erkennt. Es katalysiert die Synthese der Poly (ADP-Ribose) (Decker und Muller, 2002). Es ist ein multifunktionales Protein, das an der Genomreparatur, DNA-Replikation und der Regulation der Transkription teilnimmt (Yu et al.,

2003). Als ein Ergebnis konvertiert PARP DNA-Brüche in intrazelluläre Signale, die entweder Reparaturprogramme oder den Zelltod nach sich ziehen. Eine Vielzahl an Studien hat auch gezeigt, dass PARP sowohl an nekrotischen Prozessen mit nachfolgender entzündlicher Reaktion, als auch an apoptotischen Vorgängen beteiligt ist.

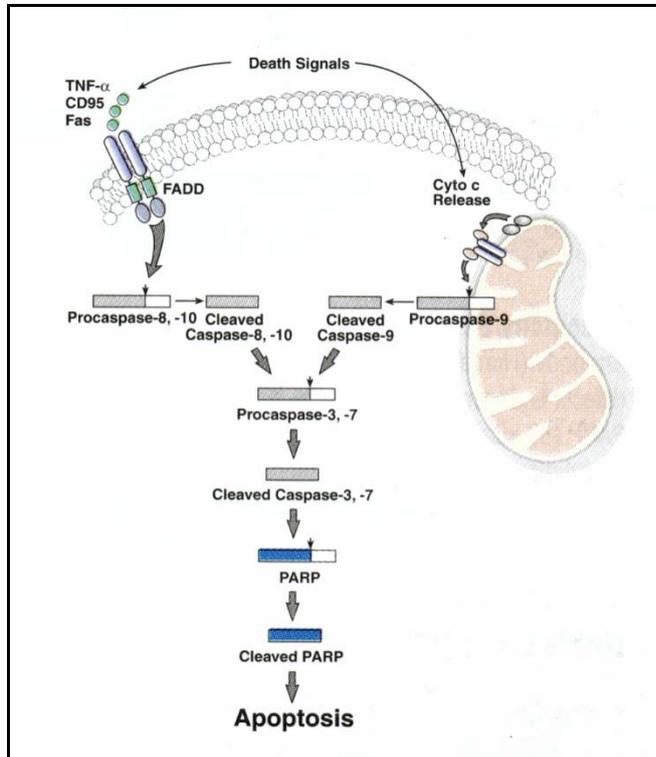


Abb. 2.4.9 PARP-Signalwegkaskade (aus Cell Signaling Technology: "Catalog & Technology Reference," 2002, S. 91)

Während der Apoptose ist PARP in einem intermediären Stadium aktiviert und wird in einem späteren Stadium durch Caspase-3 und Caspase-7 gespalten und inaktiviert. Dadurch wird der Übergang von der Apoptose in die Nekrose und folglich auch die entzündliche Begleitreaktion vermieden (Decker und Muller, 2002). Die Spaltung von PARP während der Apoptose könnte das Aufbrauchen der ATP-Reserven verhindern und somit die Energiespeicher, die für den apoptotischen Prozess notwendig sind erhalten (Yu et al., 2003).

2.5 Differenzierung von PC12-Zellen mit Nervenwachstumsfaktor

Das Aussprossen von Neuriten ist ein komplexer Prozess, der mindestens drei Stadien umfasst: Die Initiierung (i), die Aufrechterhaltung und Verlängerung (ii) und die Bildung von Netzwerken (iii) (Xiao und Liu, 2003). NGF ist die am besten untersuchte Substanz zur Differenzierung von PC12-Zellen. Ebenfalls zur Differenzierung führt die PACAP (Vaudry et al., 2002). Nach Behandlung von PC12-Zellen mit NGF stoppen diese die Proliferation, bilden Neuriten aus und werden elektrisch erregbar (Das et al., 2004).

Nach NGF-Stimulation werden die MAPK-Signalwege aktiviert, die wiederum zur Aktivierung von ERK, JNK und p38 führen. Dabei wird die Differenzierung von einer anhaltenden Aktivierung von JNK begleitet. Über den Rac-JNK-Signalweg kommt es konsekutiv durch die Aktivierung der PI3K und nachfolgend von Akt zum Aussprossen von Neuriten (Xiao und Liu, 2003). Zusätzlich wird durch NGF der PLC γ /PKC-Signalweg aktiviert (Das et al., 2004).

3. Zielsetzung der Arbeit

Seit längerem ist bekannt, dass Amphetamine neurotoxisch sind und sowohl serotonerge als auch dopaminerge Neuriten zerstören. (Schmidt und Kehne, 1990) In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es dabei zum apoptotisch vermittelten Zelltod kommt (Simantov und Tauber 1997; Stumm et al., 1999). Dieser scheint zeit- und konzentrationsabhängig zu sein (Simantov und Tauber, 1997). Ebenso scheint die Toxizität abhängig von der Methylierung der untersuchten Amphetamine zu sein. Neben der Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (Stumm et al., 1999) konnte von verschiedenen Forschergruppen auch die Spaltung und somit Aktivierung von Caspasen als Endstrecke des apoptotischen Signalweges nachgewiesen werden (Deng et al., 2002; Oliveira et al., 2003).

Zielsetzung der Arbeit war es deshalb in einem experimentellen System die Wirkung von DA, MDA, MDMA und Methylphenidat sowohl an phänotypisch differenzierten als auch an undifferenzierten PC12-Zellen auf die Induktion intrazellulärer apoptotischer Signalwege weiter zu untersuchen.

Folgende Fragestellungen sollten dabei beantwortet werden:

1. Gibt es konzentrationsabhängige Unterschiede der untersuchten Amphetamine in ihrer zytotoxischen Wirkung?
2. Welche pro- bzw. antiapoptotischen intrazellulären Signalwege werden während der Amphetaminexposition aktiviert?
3. Welchen Einfluss hat die Hemmung der intrazellulären Signaltransduktion mit den spezifischen Hemmstoffen PD 98059, LY 294002 und Rapamycin auf die zytotoxische Wirkung während der Amphetaminexposition?

4. Material und Methodik

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien und Geräte

Die für die Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von der Fa. Roth, Karlsruhe und von E. Merck, Darmstadt bezogen. Chemikalien von anderen Firmen sind in Tab. 4.1.1 aufgeführt.

Die sterilen Plastikartikel für die Zellkultur stammten von Falcon, New Jersey, NJ, USA. Die kollagenisierten Platten für die Zellkultur mit sechs, bzw. 24 Vertiefungen stammen von Biocoat Cell Environments, Fa. Becton Dickinson Labware, Bedford, MA, USA.

Die Röntgenfilme *Kodak X-OMAT MA* und *Kodak X-OMAT AR* stammten von Eastman Kodak, Rochester, USA.

Die Polyvinylidene difluoride (PVDF) Membranen *Immobilion-P* wurden von der Fa. Milipore, Bedford, MA, USA bezogen.

Chemikalien	Firma
RPMI-Medium für die Zellkultur	Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland
fetales Kälberserum, Pferdeserum für die Zellkultur	
Trypsin/EDTA	
Streptomycin, Glutamin, Penicillin	
Proteinassay nach Bradford	BioRad, München, Deutschland
Rapamycin	Biomol Research Laboratories, Hamburg, Deutschland
LY 294002	
PD 98059	
<i>ECL Western blotting detection reagents</i>	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

Tab. 4.1.1 In der Arbeit verwendete Chemikalien und Bezugsquellen

Folgende Geräte kamen zum Einsatz:

Geräte	Firma
Sterikult 200 Inkubator: Heraeus cytoperm 2 incubator	Kendro, Hanau, Deutschland
Proteingelelektrophoresekammer: Mini-Protean II cell chamber	BioRad, Hercules, CA, USA
Blotkammer: Semi-Dry Transfer Cell	
Spannungsquelle: Power Pac 300	
Photometer für Bradford-Assay: Spektralfotometer DU530	Beckmann, Fullerton, CA, USA
Photometer für Zytotoxizitätsassay: Digiscan	Mikrotech, Hohenlinden, Deutschland
Sterilbank: Hera safe	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge: centrifuge 5417 R	Eppendorf, Köln, Deutschland

Tab. 4.1.2 In der Arbeit verwendete Geräte und Hersteller

4.1.2 Zelllinien

Für die Arbeit wurden ausschließlich PC12-Zellen (DSMZ-Nr. ACC159), eine Rattenphäochromozytomzelllinie verwendet. Sie wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig bezogen.

4.1.3 Puffer und Lösungen

Folgende Standardpuffer (modifiziert nach Sambrook (Sambrook und Gething, 1989)) wurden eingesetzt:

- TBS Puffer (pH 7,5): 20 mM Tris, 138 mM NaCl
- TTBS Puffer: 20 mM Tris, 138 mM NaCl, 0,1 % Tween 20 (ICI Americas Inc.)
- SDS Ladepuffer: 62,5 mM Tris-Cl (pH 6,8), 2 % SDS, 10 % Glycerol, 50 mM DTT, 0,1 % Bromphenolblau
- Zelllysepuffer: 20 mM Tris-Cl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 2,5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM β -Glycerolphosphat, 1 mM Na_3VO_4 , 1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 1 mM PMSF
- PBS Puffer: 138 mM NaCl, 4,3 mM Na_2PO_4 , 1,4 mM KH_2PO_4 , pH 7,4

- SDS Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
- Bradford Reagenz: 0,01 % Coomassie Brilliant Blau G-250, 4,7 % Ethanol, 8,5 % Phosphorsäure, H₂O ad 1 Liter
- Fixationslösung: 4 % Formaldehyd in PBS
- Waschpuffer: 0,1 % Triton X-100 (ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio,USA) in PBS
- Färbelösung: 0,04 % Kristallviolett in 4 % Ethanol (v/v)

4.1.4 Nervenwachstumsfaktor (*Nerve Growth Factor* [NGF])

Der NGF wurde von der Fa. Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA bezogen. Ausdifferenziert wurden die PC12-Zellen mit 50 µg NGF/ml Nährmedium.

4.1.5 Amphetamine

Folgende Amphetamine wurden in der Arbeit verwandt:

Amphetamine	Firma
d-Amphetaminsulfat	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
(±)-3,4-Methylenedioxyamphetamin	
(±)-3,4-Methylenedioxymethamphetamin	
Methylphenidat	

Tab. 4.1.4 In der Arbeit verwendete Amphetamine

4.1.6 Antikörper

Die Antikörper wurden von Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA bezogen. Durch Phosphorylierung an den in der Tabelle aufgeführten Aminosäuren, werden die Kinasen aktiviert. Durch Verwendung der Antikörper gegen Phospho-Akt, Phospho-SAPK/JNK, Phospho-p38, Phospho-p44/42 und Phospho-p70 S6K lässt sich somit der aktivierte Zustand der Kinasen nachweisen. Der Antikörper gegen Akt, SAPK/JNK, p38, p44/42 und p70 S6K bindet unabhängig von der Phosphorylierung an das Antigen und dient somit der Expressionskontrollanalyse.

Die verwendeten Antikörper gegen Caspase-3 und PARP dienen dem Nachweis, der durch proteolytische Spaltung aktivierten Form der Enzyme.

Folgende Antikörper kamen für den Proteinnachweis zum Einsatz:

Antikörper	Antigen	Masse in kDa	Verdünnung in TTBS	Quelle
Phospho-Akt	Ser473	60	1:1000	Polyklonales Kaninchen-IgG
Akt	Humanes Akt	60	1:1000	Polyklonales Kaninchen-IgG
Phospho-p44/42 MAPK	Thr202/Thr204	42/44	1:1000	Polyklonales Kaninchen-IgG
p44/42 MAPK	Humane p44/42 MAPK	42/44	1:1000	Polyklonales Kaninchen-IgG
Phospho- SAPK/JNK	Thr183/Tyr185	46/54	1:1000	Polyklonales Kaninchen-IgG
SAPK/JNK	Humane SAPK/JNK	46/54	1:1000	Polyklonales Kaninchen-IgG
Phospho-p38 MAPK	Thr180/Tyr182	38	1:1000	Polyklonales Kaninchen-IgG
p38 MAPK	Humanes p38	38	1:1000	Polyklonales Kaninchen-IgG
Phospho-p70 S6 Kinase	Thr389	70/85	1:1500	Polyklonales Kaninchen-IgG
p70 S6 Kinase	Humane p70 S6 Kinase	70	1:500	Polyklonales Kaninchen-IgG
PARP aktiviert	Humanes aktiviertes PARP	89	1:2000	Polyklonales Kaninchen-IgG
Caspase-3 aktiviert	Humane Caspase-3	17/19	1:1000	Polyklonales Kaninchen-IgG
HRP-konj.-Anti- Rabbit	Sekundär- antikörper		1:2000	Polyklonales Ziegen-IgG

Tab. 4.1.3 In der Arbeit verwendete Antikörper

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

Die PC12-Zellen wurden in 250 ml Flaschen kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Bei einer Dichte von etwa 80 % wurden sie gesplittet oder für die Versuche ausplattiert. Die Temperatur im Brutschrank betrug 37°C, der CO₂-Gehalt 5 % und die Luftfeuchtigkeit 92 %.

Als Medium erhielten sie RPMI 1640 welches mit 10 % Pferde-Serum, 5 % fetalem Kälber-Serum, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt wurde.

Ausdifferenziert wurden die PC12-Zellen auf mit Rattenschwanzkollagen beschichteten 6-well- bzw. 24-well-Kulturplatten unter Zusatz von NGF, welches ebenfalls alle zwei Tage erneuert wurde. Die Beurteilung des Phänotyps erfolgte mikroskopisch.

4.2.2 Behandlung der Zellen

4.2.2.1 Behandlung der Zellen für Zytotoxizitätsassay

Der Zytotoxizitätsassay dient der Erfassung des akuten Zelltodes. Über eine chronische Schädigung lässt sich damit keine Aussage treffen. Für diesen Versuch wurden die PC12-Zellen zunächst ungefähr zehn Tage auf 24-Loch-Platten ausdifferenziert. Die undifferenzierten PC12-Zellen wurden 24 Stunden unter normalen Kulturbedingungen auf 24-Loch-Platten kultiviert. Anschließend erfolgte bei beiden Phänotypen die Behandlung mit 0, 250, 500, 1000, 1500 und 2000 µM DA, MDA, MDMA bzw. Methylphenidat. Ein Mediumwechsel mit erneuter Behandlung wurde nach 48 Stunden vorgenommen. Nach einer Behandlungszeit von insgesamt 72 Stunden erfolgte die Auswertung (s. u.). Bei den differenzierten Zellen erfolgte die Behandlung grundsätzlich mit NGF-haltigem Medium.

Bei den Versuchen mit den Signaltransduktionshemmstoffen LY 294002, PD 98059 und Rapamycin wurden diese sechs Stunden vor der Amphetaminbehandlung dem Medium zugesetzt. Folgende Konzentrationen wurden dafür verwendet: 20 µM LY 294002, 50 µM PD 98059 bzw. 100 nM Rapamycin. Anschließend wurde die Amphetaminbehandlung wieder wie oben beschrieben durchgeführt.

4.2.2.2 Behandlung der Zellen für Proteinextraktion

Vor der Proteinextraktion (s. u.) wurden die PC12-Zellen etwa zehn Tage auf 6-Loch-Platten ausdifferenziert. Zur Proteinextraktion von phänotypisch undifferenzierten PC12-Zellen wurden die Zellen 24 Stunden unter normalen Bedingungen auf 6-Loch-Platten kultiviert. Um Nebeneffekte der im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren zu vermeiden, wurden beide Phänotypen, vor der Proteinextraktion, sechs Stunden in Serum-freiem Medium kultiviert.

Am Ende des Behandlungszeitraumes wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gespült um die Behandlung zu beenden und um die intrazellulären Apoptosesignalwege zu arretieren. Im Anschluss daran wurden die Zellen nach unten beschriebener Methode lysiert und das Proteinlysate gewonnen. Bei den differenzierten Zellen erfolgte die Behandlung grundsätzlich mit NGF-haltigem Medium.

4.2.2.2.1 Serumentzug

Da für die Western Blot-Analysen nach Amphetaminexposition geplant war, die Zellen zunächst sechs Stunden vor der Behandlung unter Serum-freien Bedingungen zu kultivieren, wurde ein Vorversuch durchgeführt, bei dem die Zellen zunächst ebenfalls für sechs Stunden in Medium ohne Rinder- und Pferdeserum kultiviert wurden. Dieser Vorversuch diente der Erkennung des Einflusses von Serum-freien Milieubedingungen auf die Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktion. Die Proteinisolierung erfolgte nach 6, 6 ½, 8, 10 und 30 Stunden. Nur bei differenzierten PC12-Zellen erfolgte die Detektion von Phospho-Akt und Akt bereits nach 0 sowie ½ Stunde.

Um den Einfluss der Signaltransduktionshemmstoffe auf die Signalwege unter Serum-freien Milieubedingungen zu untersuchen, wurde ein Vorversuch durchgeführt, bei dem keine Amphetaminbehandlung erfolgte. Bei den Versuchen mit den Inhibitoren PD 98059, LY 294002 und Rapamycin wurden die Zellen zunächst sechs Stunden in Serum-freiem, mit dem jeweiligen Hemmstoff versehenen Medium kultiviert, bevor für weitere vier Stunden die Amphetaminbehandlung erfolgte. Daraus resultiert eine Gesamtdauer von zehn Stunden, in denen die Zellen mit dem jeweiligen Signaltransduktionshemmstoff in Serum-freiem Medium kultiviert wurden. Um vergleichbare Ergebnisse zu produzieren, wurde deshalb für den Vorversuch ebenfalls ein Zeitrahmen von zehn Stunden gewählt.

4.2.2.2.2 Amphetaminbehandlung

Die Behandlung erfolgte mit 1500 µM, da bei dieser Konzentration bei allen getesteten Substanzen im Zytotoxizitätsassay ein eindeutiger Effekt nachweisbar war und somit die Ergebnisse der Western Blot-Analyse besser vergleichbar wurden. Nach 0, ½, 2, 4 und 24 Stunden wurde die Behandlung abgebrochen und Proteine aus den Zellen gewonnen.

Für die Proteinisolierung bei den Versuchen mit den Inhibitoren PD 98059, LY 294002 und Rapamycin wurden die Zellen zunächst in Serum-freiem Medium mit dem jeweiligen Signaltransduktionshemmstoff für sechs Stunden kultiviert. Danach erfolgte die Behandlung sowohl mit 500, als auch mit 1500 µM DA, MDA, MDMA bzw. Methylphenidat für weitere vier Stunden. Anschließend wurde aus den Zellen Protein isoliert.

4.2.3 Aufarbeitung der Proteine

4.2.3.1 Proteinextraktion

In Anlehnung an das Standardprotokoll nach Sambrook (Sambrook und Gething, 1989) wurden die Zellen nach Spülung mit eiskaltem PBS durch Inkubation mit Triton X-100-Lysis-Puffer (mit Leupeptin als Proteaseinhibitor) für 10 Minuten auf Eis lysiert. Das Lysat wurde mit einem Zellschaber abgekratzt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Der Zelldebris wurde bei 10.000 Umdrehungen pro Minute und 4°C 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand bei –20°C aufbewahrt.

Anschließend wurde die Proteinkonzentration im Überstand mittels der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) ermittelt.

4.2.3.2 Proteinquantifizierung nach Bradford

Das Bradfordassay beruht auf dem Prinzip, dass Proteine über basische und aromatische Aminosäuren an Coomassieblau binden und dabei dessen Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschieben. Die bei dieser Wellenlänge gemessene Absorption ist proportional zu der in der Probe vorhandenen Proteinmenge. Das Assay ist dabei v. a. geeignet für Proteine und Polypeptide mit einem Molekulargewicht, die größer sind als 3.000 bis 5.000 Da.

Die Proben wurden zunächst in PBS bzw. in PBS und 0,01 % Triton X-100 1:250 bzw. 1:500 verdünnt. Anschließend wurde das Bradfordreagenz (s. 4.1.3) hinzugegeben und mit den Proben gemischt, die dann gegen einen Leerwert aus 0,01 % Triton X-100 in PBS und Bradfordreagenz gemessen wurden. Abschließend wurde die Absorption gegen einen Proteinstandard mit bekannten Konzentrationen aufgetragen und daraus die Konzentration in der Ausgangsprobe ermittelt.

4.2.3.3 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden die Proteine in fünffach konzentriertem SDS-Ladepuffer aufgenommen und fünf Minuten bei 100°C denaturiert. Anschließend wurden sie kurz anzentrifugiert und auf 10 %ige denaturierende SDS-Polyacrylamidgele geladen. Für die aktivierten Formen der Caspase-3 und PARP wurden 12,5 %ige Gele verwendete, mit denen eine bessere Auftrennung erreicht wurde. Im Anschluss daran wurde die Elektrophorese in der vertikalen Miniproteinkammer von BioRad bei 100 – 120 Volt für 1,5 Stunden in SDS-Laufpuffer (s. 4.1.3) durchgeführt.

4.2.3.4 Western Blot-Analyse

Die SDS-Gele wurden nach Sambrook (Sambrook und Gething, 1989) in einem halbtrockenen (*semy-dry*) System mit drei Puffern (Anodenpuffer 1: 0,3 M Tris, 20 %

Methanol, Anodenpuffer 2: 25 mM Tris, 20 % Methanol, Kathodenpuffer: 25 mM Tris, 40 mM ϵ -Amino-n-Caprönsäure, 20 % Methanol) bei 150 mA für eine Stunde auf PVDV-Membranen (*Immobilion-P*) geblottet. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran eine Stunde in TTBS mit 5 % fettfreiem Magermilchpulver gewaschen um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran kurz mit TTBS gewaschen und für zwölf Stunden mit dem Primärantikörper (1:1000 verdünnt in 1xTBS und 0,1 % Tween-20) bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran wieder drei mal fünf Minuten mit TTBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (1:2000 verdünnt in 1xTBS, 0,1 % Tween-20 und 0,5 % Magermilchpulver) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Immunreaktion durch die Chemilumineszenzreaktion mit dem ECL-Reagenz von Amersham sichtbar gemacht. Die Reaktion basiert auf der Umsetzung des in dem Reagenz enthaltenen Substrats in einen fluoreszierenden Farbstoff durch die Meerrettichperoxidase des Sekundärantikörpers. Durch Exposition von Röntgenfilmen kann man diese Reaktion sichtbar machen. Die Western Blot-Analysen wurden visuell semiquantitativ ausgewertet und die Ergebnisse in Tabellen übertragen. Folgende Wertungen wurden vorgenommen:

- neg.: keine Proteinbande auf dem Röntgenfilm sichtbar,
- (+): fraglich positiv,
- +: schwach positiv,
- ++: positiv,
- +++: stark positiv.

Zur Expressionskontrollanalyse von SAPK, p38, MAPK und Akt/PKB wurden, nach der Detektion der Phosphoantikörper, die Membranen in 0,1 M Glycin pH 2,5 20 Minuten lang gewaschen. Dadurch konnten die Phosphoantikörper effektiv entfernt werden. Nachfolgend wurden die Membranen wieder in TTBS mit 5 % Magermilchpulver geblockt, anschließend drei mal fünf Minuten mit TTBS gewaschen und mit dem entsprechenden Primärantikörper für zwölf Stunden bei 4°C inkubiert. Danach drei mal fünf Minuten mit TTBS gewaschen und dann mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgend wurde drei mal fünf Minuten mit TTBS gewaschen und die Immunreaktion wie unter 4.2.6 beschrieben durch Chemilumineszenz und Exposition auf Röntgenfilme dargestellt.

4.2.4 Zytotoxizitätsassay

Zur Ermittlung der quantitativen Zellschädigung wurde ein Zytotoxizitätsassay nach Versteeg (Versteeg et al., 2000) durchgeführt. Für diesen Versuch wurde eine Zellsuspension mit

10.000 Zellen/ml hergestellt und 500 µl dieser Suspension auf kollagenisierte 24-well-Platten überführt, so dass in jeder Vertiefung 5.000 Zellen waren. Dort wurden sie 24 Stunden unter normalen Bedingungen kultiviert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und gleichzeitig die Inhibitoren dazugegeben. Sechs Stunden später erfolgte dann die eigentliche Behandlung mit den Amphetaminen mit 0, 250, 500, 1.000, 1.500 und 2000 µM für 72 Stunden im Brutschrank. Nach 48 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel mit erneuter Behandlung für weitere 24 Stunden. Nach einer Gesamtbehandlungsdauer von 72 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 4 % Formaldehyd in PBS für 20 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Vertiefungen dreimal mit 0,1 % Triton X-100 in PBS und danach zweimal mit *aqua dest.* gewaschen. Die Zellen wurden nun fünf Minuten an der Luft getrocknet. Danach wurde 500 µl 0,04 %ige Kristallviolettlösung (s. 4.1.3) in jede Vertiefung gegeben. Nach 30 Minuten wurden die Platten wieder dreimal mit *aqua dest.* gewaschen und 500 µl 1 %ige SDS-Lösung zur Zellyse zugegeben. Die Platten wurden eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert und anschließend auf 96-well-Platten überführt. Die Absorptionsmessung fand bei 595 nm statt.

Für die Auswertung wurden die Extinktionen in Prozentzahlen umgerechnet und in Excel-Tabellen graphisch dargestellt, wobei die Konzentration 0 µM mit 100 Prozent gleich gesetzt wurde.

4.3 Statistik

Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen wurde mit dem parameterfreien Prüfverfahren nach Mann-Whitney (U-Test) ermittelt.

5. Ergebnisse

Zur Ermittlung der Ergebnisse wurden folgende Versuche an nativen und differenzierten PC12-Zellen mit DA, MDA, MDMA und Methylphenidat durchgeführt:

1. Zytotoxizitätsassay

Einen Überblick über die durchgeführten Zytotoxizitätsassays gibt folgende Tabelle:

Zytotoxizitätsassay (Behandlungszeitraum: 72 Stunden)		
Versuch	Amphetaminkonzentration in μM	Inhibitoren
A) ohne Inhibitoren	0, 250, 500, 1000, 1500, 2000	Ø
B) mit Inhibitoren	0, 250, 500, 1000, 1500, 2000	Rapamycin, PD 98059, LY 294002

Tab. 5.1 : Überblick über die in der Arbeit durchgeführten Zytotoxizitätsassays

2. Western Blot-Analyse

2.1 Western Blot-Analyse nach Serumentzug

Einen Überblick über die durchgeführten Western Blot-Analyse nach Serumentzug gibt folgende Tabelle:

Western Blot-Analysen				
Versuch	Amphetamin-konz. in μM	Behandlungszeit (Stunden)	Inhibitoren	Antikörper*
A) Zeit-kinetik	Ø	0**, ½**, 6, 6 ½, 8, 10 und 30	Ø	SAPK/JNK, p38, p44/42, Akt, Caspase-3 aktiviert, PARP aktiviert
B) mit Inhibitor	Ø	10	Rapamycin, PD 98059, LY 294002	SAPK/JNK, p70 S6K, p44/42, Akt

Tab. 5.2 : Überblick über die in der Arbeit durchgeführten Western Blot-Analysen nach Serumentzug

*Anmerkung: Es wurden sowohl phosphospezifische, als auch nicht-phosphospezifische Antikörper eingesetzt.

**Anmerkung: nur Akt und phospho-Akt bei differenzierten PC12-Zellen

2.2 Western Blot-Analyse nach Amphetaminbehandlung

Einen Überblick über die durchgeführten Western Blot-Analyse nach Amphetaminbehandlung gibt folgende Tabelle:

Western Blot-Analysen				
Versuch	Amphetamin-konz. in μM	Behandlungszeit (Stunden)	Inhibitoren	Antikörper*
A) Zeit-kinetik	1500	0, 1/2, 2, 4, 24	Ø	SAPK/JNK, p38, p44/42, Akt, Caspase-3 aktiviert, PARP aktiviert
B) mit Inhibitor	500 / 1500	4	Rapamycin, PD 98059, LY 294002	SAPK/JNK, p70 S6K, p44/42, Akt

Tab. 5.3 : Überblick über die in der Arbeit durchgeführten Western Blot-Analysen nach Amphetaminbehandlung

*Anmerkung: Es wurden sowohl phosphospezifische, als auch nicht-phosphospezifische Antikörper eingesetzt.

5.1 Ergebnisse: undifferenzierte PC12-Zellen

5.1.1 Zytotoxizitätsassays

Bei den undifferenzierten Zellen zeigte sich eine deutliche Extinktionsabnahme bei steigender Amphetaminkonzentration. Am stärksten ausgeprägt war diese bei DA, gefolgt von MDA und MDMA. Fast keine Extinktionsänderung ließ sich bei Methylphenidat nachweisen.

Auswertung:

A)

Amphetamin-konz. in μM	DA		MDA		MDMA		Methylphenidat	
	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW
0	0,088	0,007	0,069	0,009	0,071	0,007	0,070	0,008
250	0,082	0,006	0,068	0,009	0,086	0,009	0,066	0,010
500	0,068	0,007	0,056	0,011	0,083	0,006	0,060	0,009
1000	0,076	0,005	0,064	0,005	0,090	0,005	0,072	0,009
1500	0,049	0,006	0,034	0,010	0,062	0,009	0,073	0,007
2000	0,030	0,005	0,027	0,007	0,055	0,008	0,068	0,008

B)

Amphetamin-konz. in μM	Überlebende Zellen in Prozent			
	DA	MDA	MDMA	Methylphenidat
0	100	100	100	100
250	87,5	98,6	121,1	94,3
500	75	81,2	116,9	85,7
1000	86,4	92,8	126,8	102,9
1500	55,7	49,3	87,3	104,3
2000	31,8	39,1	78,6	97,1

Tab. 5.1.1: A) Mittelwert der gemessenen Extinktionen und berechnete Standardabweichungen nach Amphetaminbehandlung über 72 Stunden. B) Maß der Schädigung in % (unbehandelte Kontrolle [$0 \mu\text{M}$] $\hat{=}$ 100 %)

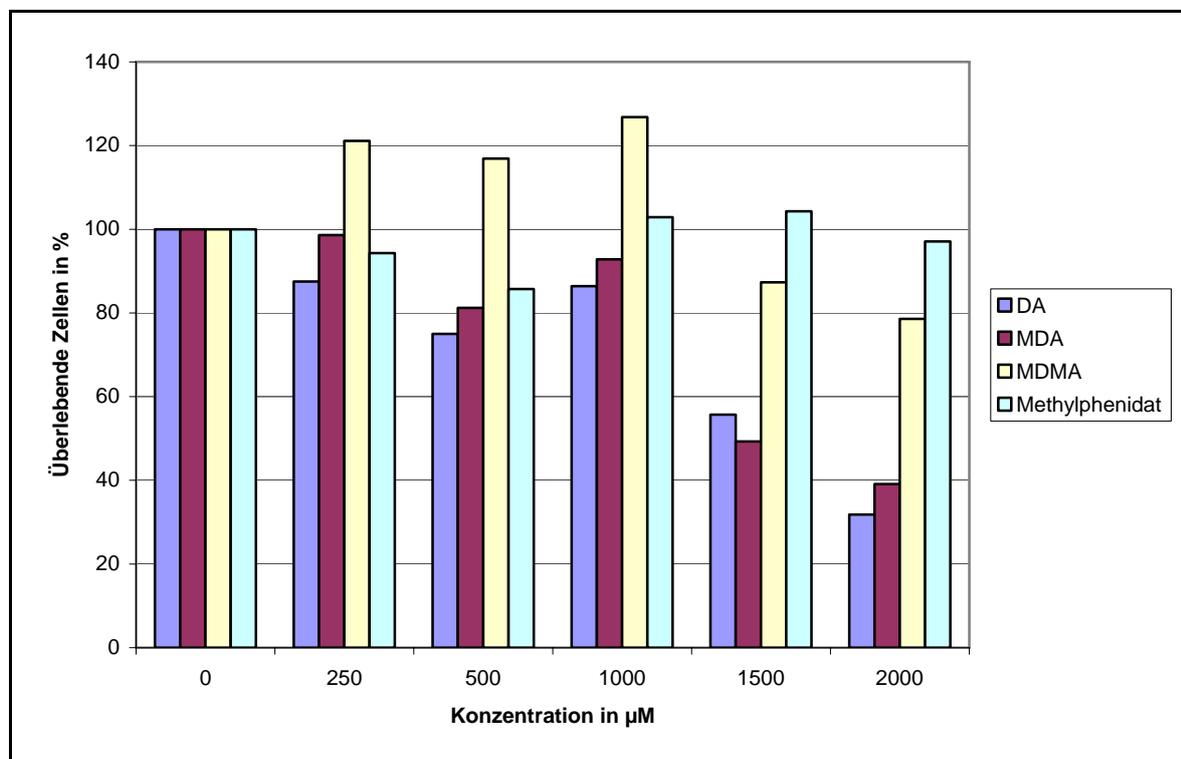


Abb. 5.1.1: Maß der Schädigung von undifferenzierten PC12-Zellen nach 72 Stunden Amphetaminbehandlung (unbehandelte Kontrolle [$0 \mu\text{M}$] $\hat{=}$ 100 %)

5.1.2 Zytotoxizitätsassays unter Zusatz von Rapamycin

Unter Zusatz von 100 nM Rapamycin konnte zunächst bei allen verwendeten Amphetaminderivaten eine Extinktionszunahme beobachtet werden. Bei Konzentrationen ab 1500 μM zeigte sich dann eine Extinktionsabnahme mit stärkster Ausprägung bei MDA, gefolgt von DA. MDMA und Methylphenidat zeigten in etwa ähnliche Wirkung ab einer Konzentration von 2000 μM . Auswertung:

A)

Amphetamin-konz. in μM	DA		MDA		MDMA		Methylphenidat	
	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW
0	0,085	0,003	0,089	0,003	0,081	0,004	0,084	0,003
250	0,104	0,005	0,102	0,003	0,098	0,004	0,090	0,004
500	0,096	0,003	0,101	0,006	0,010	0,004	0,088	0,003
1000	0,088	0,004	0,091	0,005	0,095	0,004	0,089	0,002
1500	0,079	0,003	0,068	0,004	0,089	0,004	0,081	0,003
2000	0,056	0,005	0,039	0,007	0,068	0,006	0,070	0,007

B)

Amphetamin-konz. in μM	Überlebende Zellen in Prozent			
	DA	MDA	MDMA	Methylphenidat
0	100	100	100	100
250	122,4	114,6	121	107,1
500	112,9	113,5	125,9	106
1000	103,5	102,2	117,3	106
1500	92,9	76,4	109,9	96,4
2000	65,9	43,8	84	83,3

Tab. 5.1.2: A) Mittelwert der gemessenen Extinktionen und berechnete Standardabweichungen nach Amphetamin- und Rapamycinbehandlung über 72 Stunden. B) Maß der Schädigung in % (unbehandelte Kontrolle [0 μM] $\hat{=}$ 100 %)

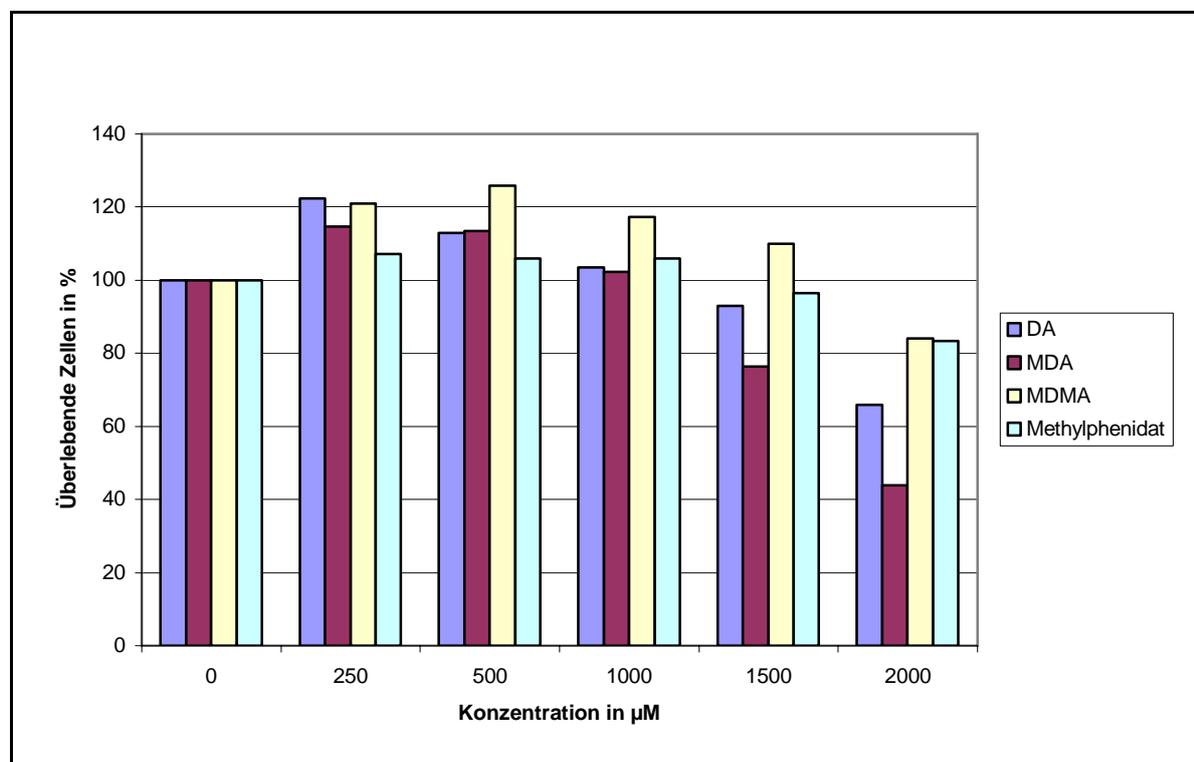


Abb. 5.1.2: Maß der Schädigung von undifferenzierten PC12-Zellen nach 72 Stunden Amphetaminbehandlung unter Zusatz von 100 nM Rapamycin (unbehandelte Kontrolle [0 μM] $\hat{=}$ 100 %)

5.1.3 Zytotoxizitätsassays unter Zusatz von PD 98059

Die stärkste Extinktionsabnahme unter Zusatz von 50 μM PD 98059 zeigte sich bei DA, gefolgt von MDA, MDMA und Methylphenidat. Auswertung:

A)

Amphetamin-konz. in μM	DA		MDA		MDMA		Methylphenidat	
	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW
0	0,092	0,005	0,062	0,006	0,092	0,004	0,076	0,006
250	0,069	0,006	0,062	0,007	0,078	0,007	0,063	0,005
500	0,049	0,006	0,047	0,010	0,074	0,006	0,059	0,007
1000	0,050	0,002	0,043	0,005	0,066	0,004	0,064	0,004
1500	0,042	0,003	0,027	0,004	0,055	0,003	0,058	0,002
2000	0,021	0,003	0,019	0,003	0,050	0,003	0,055	0,005

B)

Amphetamin-konz. in μM	Überlebende Zellen in Prozent			
	DA	MDA	MDMA	Methylphenidat
0	100	100	100	100
250	75,8	100	84,8	82,9
500	53,8	75,8	80,4	77,6
1000	54,9	69,4	71,7	84,2
1500	46,2	43,5	59,8	76,3
2000	23,1	30,6	54,3	72,4

Tab. 5.1.3: A) Mittelwert der gemessenen Extinktionen und berechnete Standardabweichungen nach Amphetamin- und PD 98059-Behandlung über 72 Stunden. B) Maß der Schädigung in % (unbehandelte Kontrolle [0 μM] $\hat{=}$ 100 %)

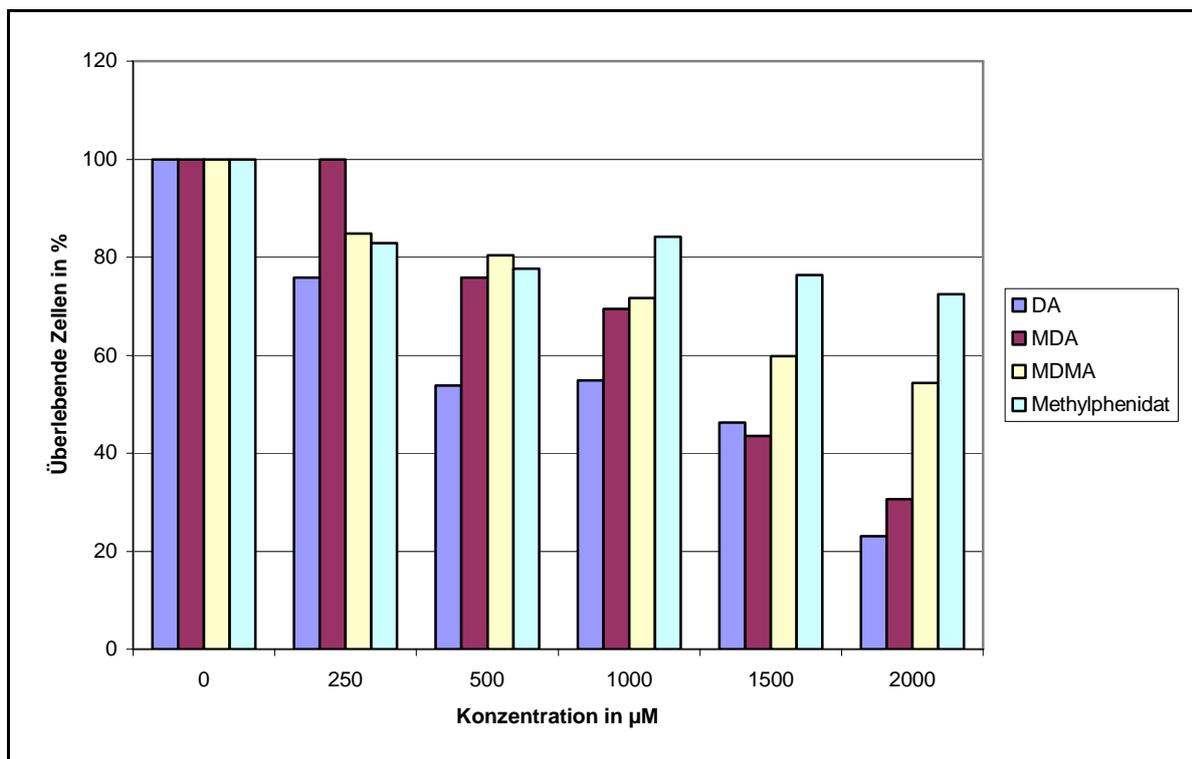


Abb. 5.1.3: Maß der Schädigung von undifferenzierten PC12-Zellen nach 72 Stunden Amphetaminbehandlung unter Zusatz von 50 μM PD 98059 (unbehandelte Kontrolle [0 μM] $\hat{=}$ 100 %)

5.1.4 Zytotoxizitätsassays unter Zusatz von LY 294002

Unter Zusatz von 20 μM LY 294002 zeigte sich bei allen vier Amphetaminen bis zu einer Konzentration von 500 μM eine Extinktionszunahme. Ab 1000 μM nahm die Extinktion ab.

Auswertung:

A)

Amphetamin-konz. in μM	DA		MDA		MDMA		Methylphenidat	
	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW
0	0,056	0,005	0,045	0,007	0,056	0,005	0,044	0,007
250	0,069	0,006	0,057	0,006	0,066	0,006	0,056	0,006
500	0,059	0,005	0,052	0,006	0,060	0,005	0,048	0,006
1000	0,046	0,006	0,038	0,007	0,047	0,008	0,043	0,006
1500	0,037	0,006	0,022	0,006	0,033	0,009	0,037	0,007
2000	0,009	0,009	0,011	0,002	0,011	0,010	0,018	0,009

B)

Amphetamin-konz. in μM	Überlebende Zellen in Prozent			
	DA	MDA	MDMA	Methylphenidat
0	100	100	100	100
250	123,2	126,7	117,9	127,3
500	105,4	115,6	107,1	109,1
1000	82,1	84,4	83,9	97,7
1500	66,1	48,9	58,9	84,1
2000	8,9	24,4	10,7	29,4

Tab. 5.1.4: A) Mittelwert der gemessenen Extinktionen und berechnete Standardabweichungen nach Amphetamin- und LY 294002-Behandlung über 72 Stunden. B) Maß der Schädigung in % (unbehandelte Kontrolle [0 μM] $\hat{=}$ 100 %)

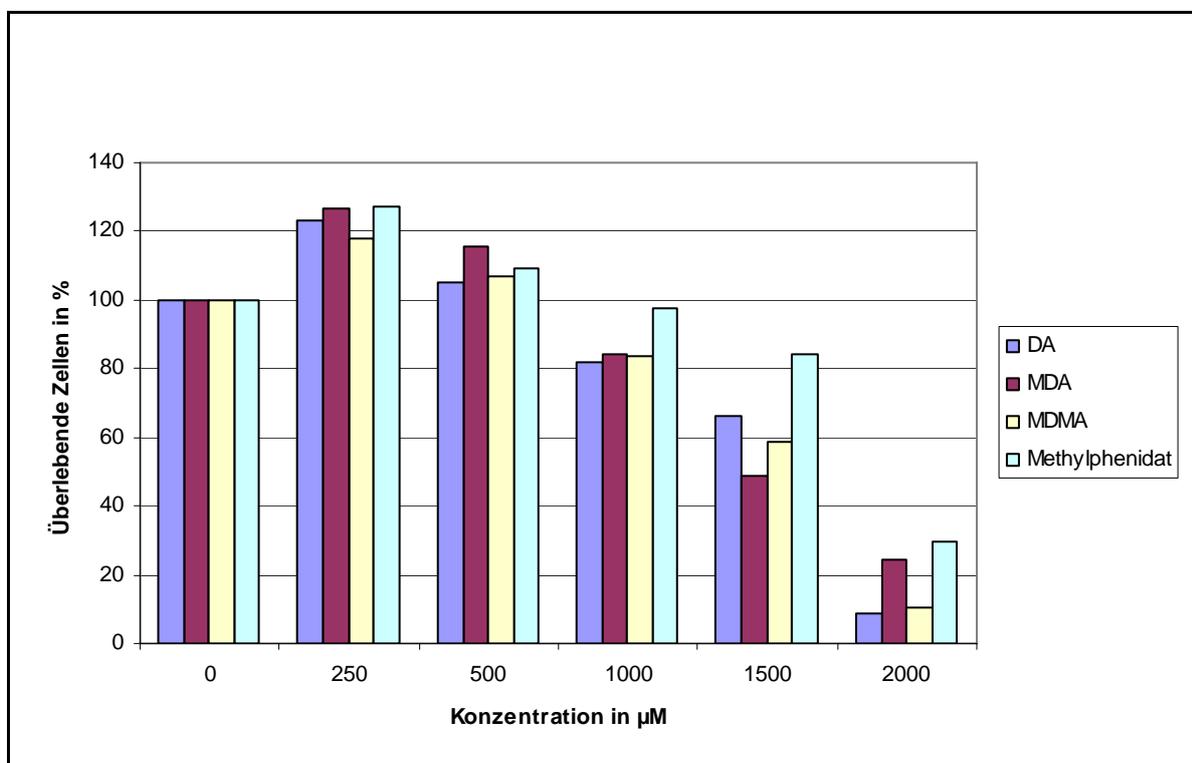


Abb. 5.1.4: Maß der Schädigung von undifferenzierten PC12-Zellen nach 72 Stunden Amphetaminbehandlung unter Zusatz von 20 μM LY 294002 (unbehandelte Kontrolle [0 μM] $\hat{=}$ 100 %)

5.1.5 Western Blot-Analysen von undifferenzierten PC12-Zellen

5.1.5.1 Western Blot-Analysen von undifferenzierten PC12-Zellen nach Serumentzug

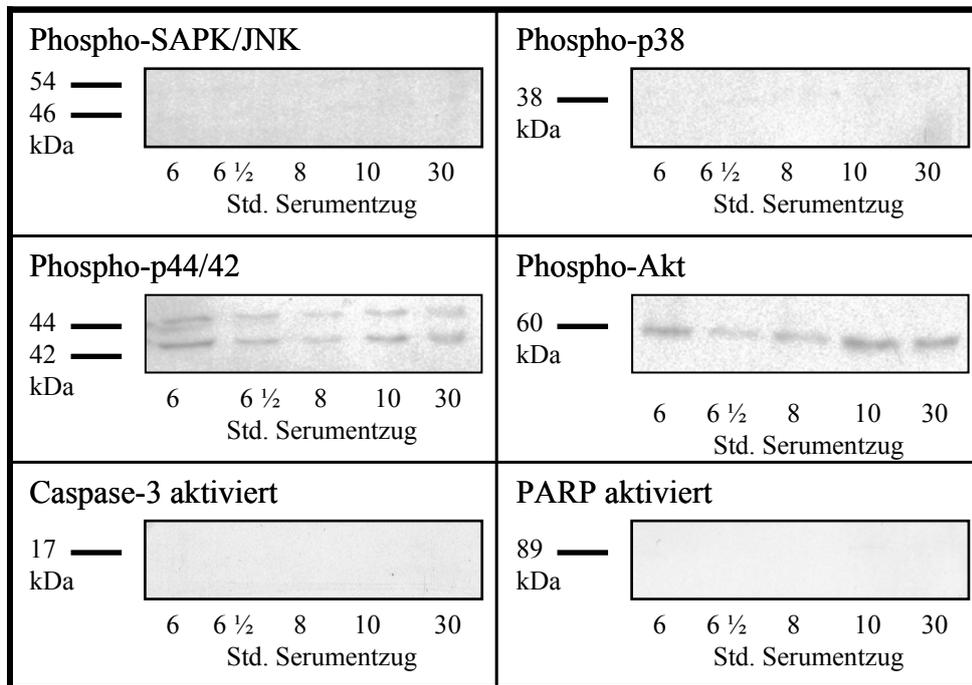


Abb. 5.1.5: WB-Analyse nach Serumentzug ohne Signaltransduktionshemmstoffe von undifferenzierten PC12-Zellen

Bei den Western Blot-Analysen nach Serumentzug konnten Phospho-SAPK/JNK und Phospho-p38 nicht nachgewiesen werden. Der Nachweis von Phospho-p44/42 und Phospho-Akt war dahingegen positiv. Die aktivierte Form von PARP und Caspase-3 ließ sich nach Serumentzug nicht nachweisen. Auswertung siehe Tabelle:

A)	Phospho-Akt	6 h	6 ½ h	8 h	10 h	30 h
	SAPK	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	p38	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	p44/42	++	+	+	+	+
	Akt	+	+	+	++	+

B)		6 h	6 ½ h	8 h	10 h	30 h
	PARP aktiviert	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	Caspase-3 aktiviert	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Tab. 5.1.5: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Serumentzug ohne Signaltransduktionshemmstoffe von undifferenzierten PC12-Zellen: A) Phospho-SAPK/JNK, Phospho-p38, Phospho-p44/42 und Phospho-Akt; B) PARP aktiviert und Caspase-3 aktiviert

Die Western Blot-Analyse zur Expressionskontrollanalyse ergab für alle untersuchten nicht-phosphospezifischen Antikörper ein positives Ergebnis (s. Abb. 5.1.6).

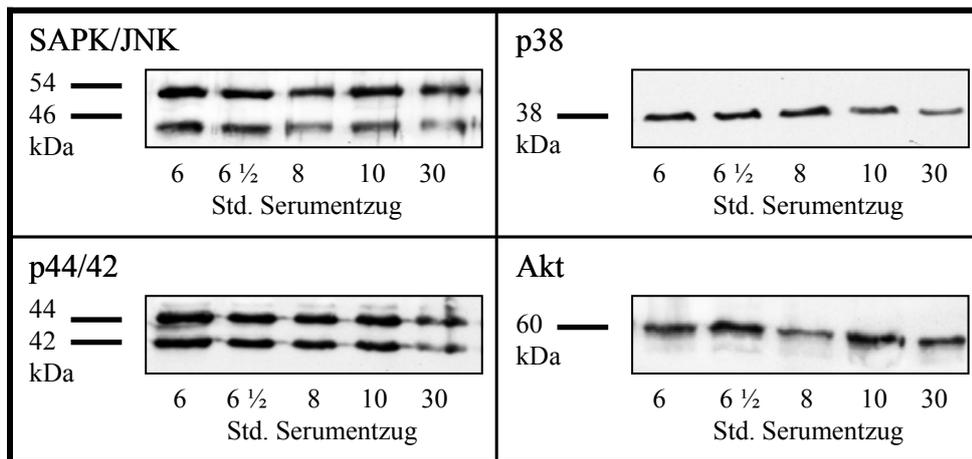


Abb. 5.1.6: WB-Analyse zur Expressionskontrolle nach Serumentzug von undifferenzierten PC12-Zellen: SAPK/JNK, p38, p44/42 und Akt

5.1.5.2 Western Blot-Analysen von undifferenzierten PC12-Zellen nach Amphetaminbehandlung ohne Signaltransduktionshemmstoffe

5.1.5.2.1 Stress-aktivierte Proteinkinase

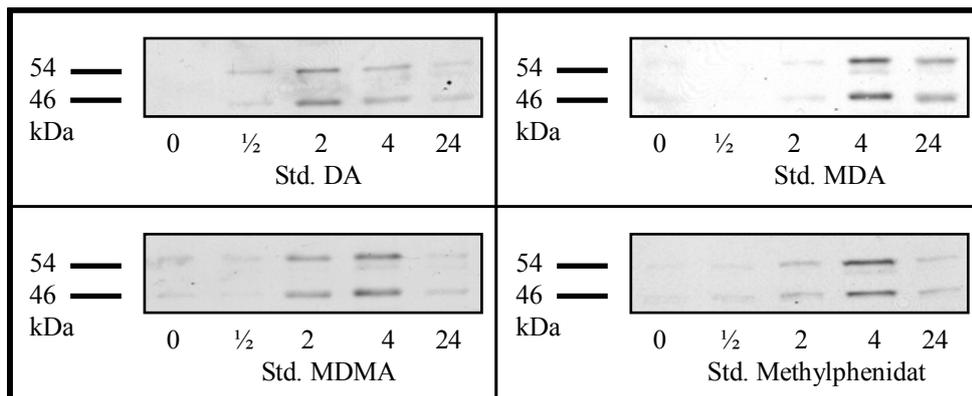


Abb. 5.1.7: WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von undifferenzierten PC12-Zellen: Phospho-SAPK/JNK

Phospho-SAPK/JNK konnte bei DA nach einer halben Stunde nachgewiesen werden, bei MDA, MDMA und Methylphenidat nach zwei Stunden. Bei allen untersuchten Amphetaminen blieb der Nachweis über 24 Stunden positiv. Auswertung siehe Tabelle:

Phospho-SAPK/JNK	0 h	1/2 h	2 h	4 h	24 h
DA	neg.	+	+++	++	+
MDA	neg.	neg.	+	+++	+
MDMA	neg.	neg.	++	+++	++
Methylphenidat	neg.	neg.	+	++	+

Tab. 5.1.6: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von undifferenzierten PC12-Zellen: Phospho-SAPK/JNK

Die Western Blot-Analyse zur Expressionskontrollanalyse ergab für alle untersuchten nicht-phosphospezifischen Antikörper ein positives Ergebnis (s. Abb. 5.1.8).

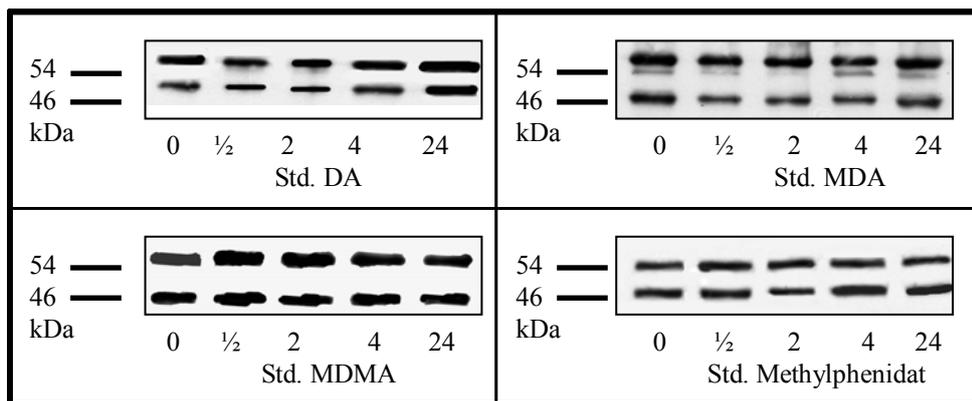


Abb. 5.1.8: WB-Analyse zur Expressionskontrolle nach Amphetaminbehandlung von undifferenzierten PC12-Zellen: SAPK/JNK

5.1.5.2.2 p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase

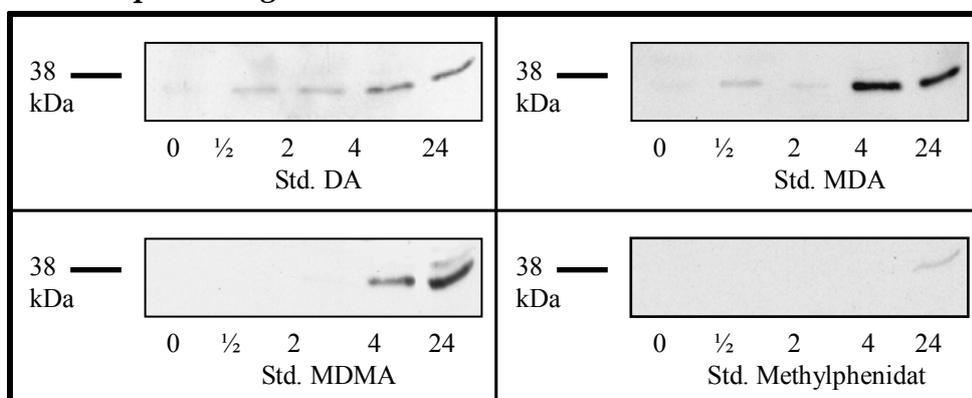


Abb. 5.1.9: WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von undifferenzierten PC12-Zellen: Phospho-p38

Der Nachweis von Phospho-p38 war bei DA und MDA nach einer halben Stunde positiv, bei MDMA nach vier Stunden. Nach 24 Stunden war Phospho-p38 bei diesen drei Amphetaminen noch nachweisbar. Bei Methylphenidat konnte Phospho-p38 nach 24 Stunden detektiert werden. Auswertung siehe Tabelle:

Phospho-p38	0 h	1/2 h	2 h	4 h	24 h
DA	neg.	+	+	++	++
MDA	neg.	+	+	++	++
MDMA	neg.	neg.	neg.	++	++
Methylphenidat	neg.	neg.	neg.	neg.	+

Tab. 5.1.7: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von undifferenzierten PC12-Zellen: Phospho-p38

Die Western Blot-Analyse zur Expressionskontrollanalyse ergab für alle untersuchten nicht-phosphospezifischen Antikörper ein positives Ergebnis (s. Abb. 5.1.10).

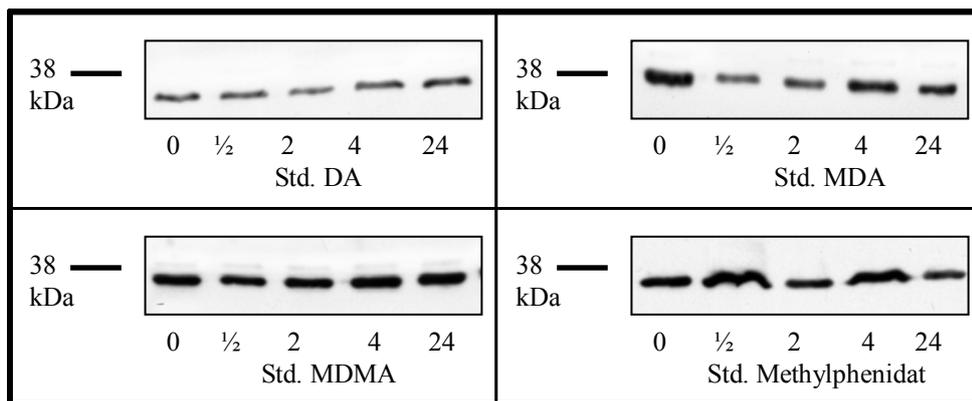


Abb. 5.1.10: WB-Analyse zur Expressionskontrolle nach Amphetaminbehandlung von undifferenzierten PC12-Zellen: p38

5.1.5.2.3 p44/42 mitogen-aktivierte Proteinkinase

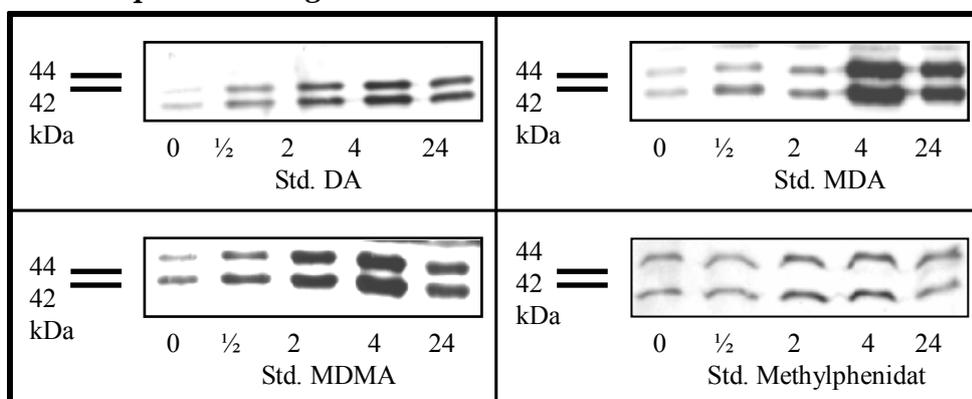


Abb. 5.1.11: WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von undifferenzierten PC12-Zellen: Phospho-p44/42

Bereits unbehandelt (Null-Stundenwert) konnte Phospho-p44/42 für alle vier untersuchten Amphetamine nachgewiesen werden. Bei allen blieb der Nachweis über 24 Stunden positiv.

Auswertung siehe Tabelle:

Phospho-p44/42	0 h	½ h	2 h	4 h	24 h
DA	+	++	+++	+++	+++
MDA	+	++	++	+++	+++
MDMA	+	++	+++	+++	+++
Methylphenidat	+	+	++	++	+

Tab. 5.1.8: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von undifferenzierten PC12-Zellen: Phospho-p44/42

Die Western Blot-Analyse zur Expressionskontrollanalyse ergab für alle untersuchten nicht-phosphospezifischen Antikörper ein positives Ergebnis (s. Abb. 5.1.12).

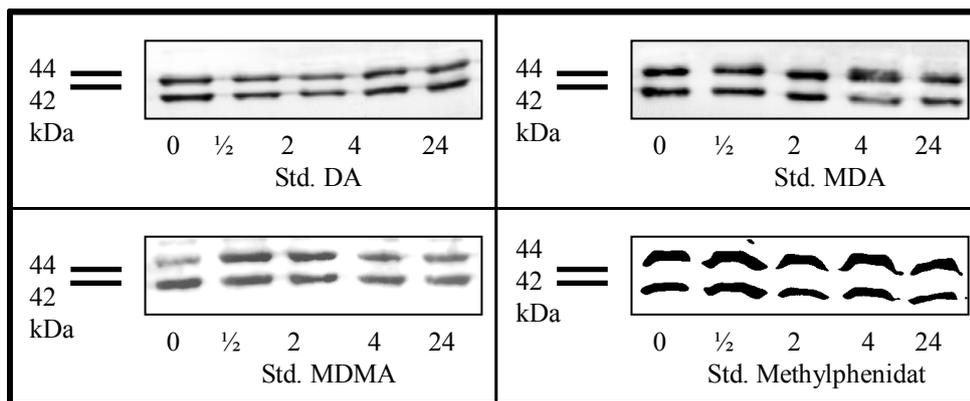


Abb. 5.1.12: WB-Analyse zur Expressionskontrolle nach Amphetaminbehandlung von undifferenzierten PC12-Zellen: p44/42

5.1.5.2.4 Akt

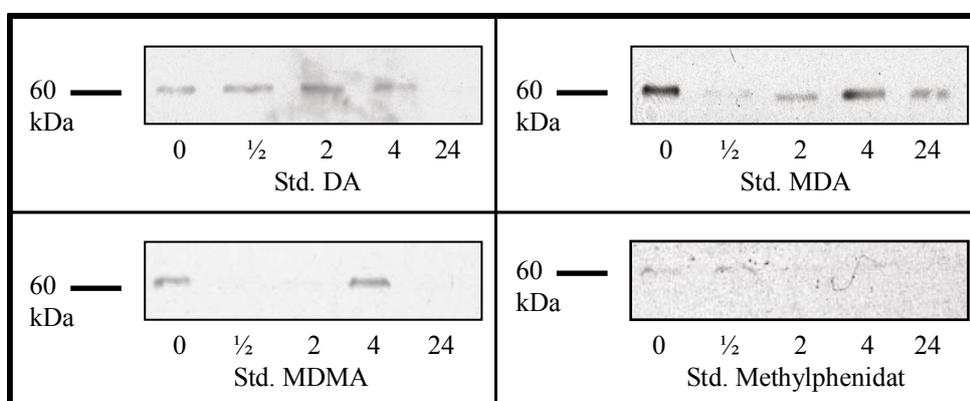


Abb. 5.1.13: WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von undifferenzierten PC12-Zellen: Phospho-Akt

Die phosphorylierte Form von Akt ließ sich für DA, MDA und MDMA bereits unbehandelt (Null-Stundenwert) nachweisen. DA war über einen Zeitraum von vier Stunden schwach positiv, MDA war über 24 Stunden positiv. Phospho-Akt ließ sich nach einer halben und zwei Stunden bei MDMA-Behandlung nicht detektieren, war nach vier Stunden wieder nachweisbar und wurde anschließend negativ. Bei Methylphenidat zeigte sich Phospho-Akt bei null Stunden schwach positiv, ansonsten negativ. Auswertung siehe Tabelle:

Phospho-Akt	0 h	½ h	2 h	4 h	24 h
DA	+	+	+	+	neg.
MDA	++	(+)	+	++	+
MDMA	+	neg.	neg.	++	neg.
Methylphenidat	+	neg.	neg.	neg.	neg.

Tab. 5.1.9: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von undifferenzierten PC12-Zellen: Phospho-Akt

Die Western Blot-Analyse zur Expressionskontrollanalyse ergab für alle untersuchten nicht-phosphospezifischen Antikörper ein positives Ergebnis (s. Abb. 5.1.14).

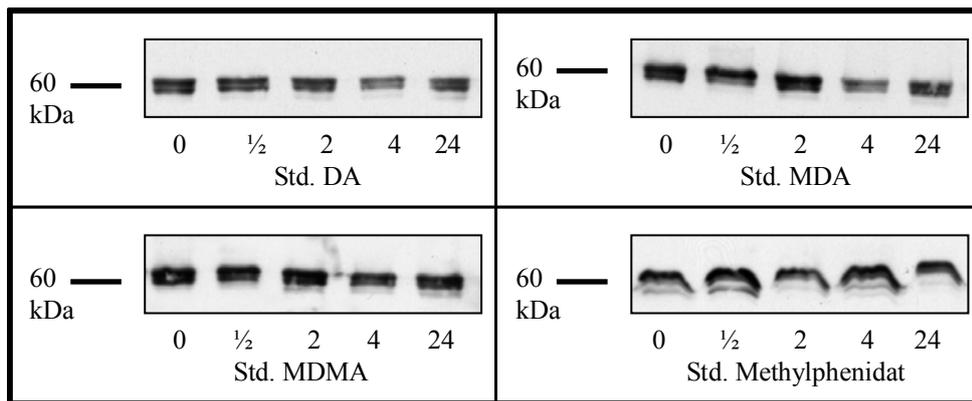


Abb. 5.1.14: WB-Analyse zur Expressionskontrolle nach Amphetaminbehandlung von undifferenzierten PC12-Zellen: Akt

5.1.5.2.5 Caspase-3 aktiviert

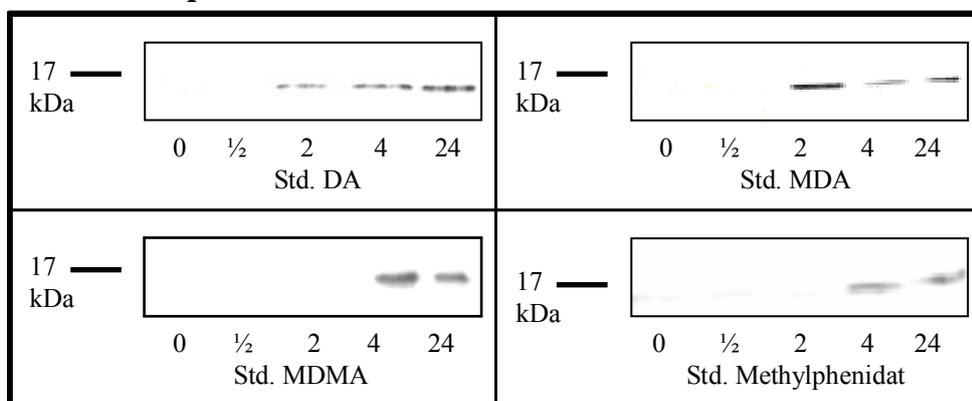


Abb. 5.1.15: WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von undifferenzierten PC12-Zellen: Caspase-3 aktiviert

Die aktivierte Caspase-3 ließ sich für DA und MDA nach zwei Stunden, für MDMA und Methylphenidat nach vier Stunden nachweisen. Der Nachweis blieb bei allen untersuchten Amphetaminen bis zum Ende des Behandlungszeitraumes positiv. Auswertung siehe Tabelle:

Caspase-3 aktiviert	0 h	½ h	2 h	4 h	24 h
DA	neg.	neg.	+	++	++
MDA	neg.	neg.	+	++	++
MDMA	neg.	neg.	neg.	++	++
Methylphenidat	neg.	neg.	neg.	++	++

Tab. 5.1.10: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von undifferenzierten PC12-Zellen: Caspase-3 aktiviert

5.1.5.2.6 Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase aktiviert

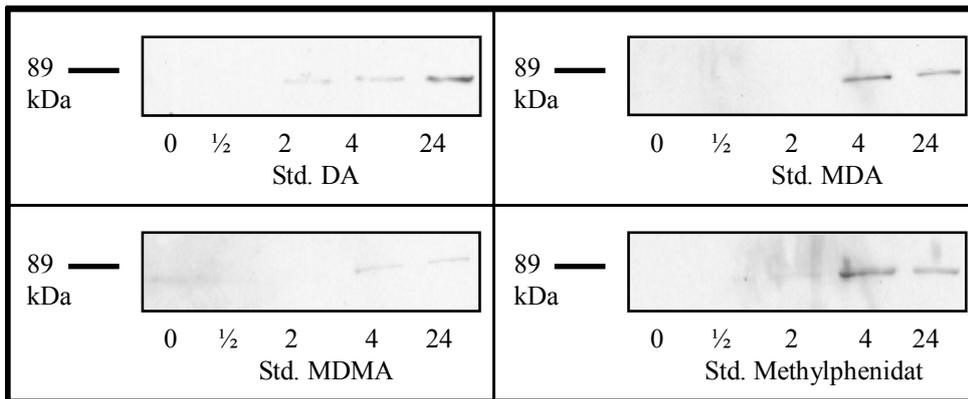


Abb. 5.1.16: WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von undifferenzierten PC12-Zellen: PARP aktiviert

Die aktivierte Form von PARP ließ sich bei allen vier in der Arbeit verwendeten Amphetaminen nach vier Stunden nachweisen. Auswertung siehe Tabelle:

PARP aktiviert	0 h	½ h	2 h	4 h	24 h
DA	neg.	neg.	(+)	+	+
MDA	neg.	neg.	neg.	+	+
MDMA	neg.	neg.	neg.	+	+
Methylphenidat	neg.	neg.	neg.	+	+

Tab. 5.1.11: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von undifferenzierten PC12-Zellen: PARP aktiviert

5.1.5.3 Western Blot-Analysen von undifferenzierten PC12-Zellen nach Serumentzug mit Signaltransduktionshemmstoffen

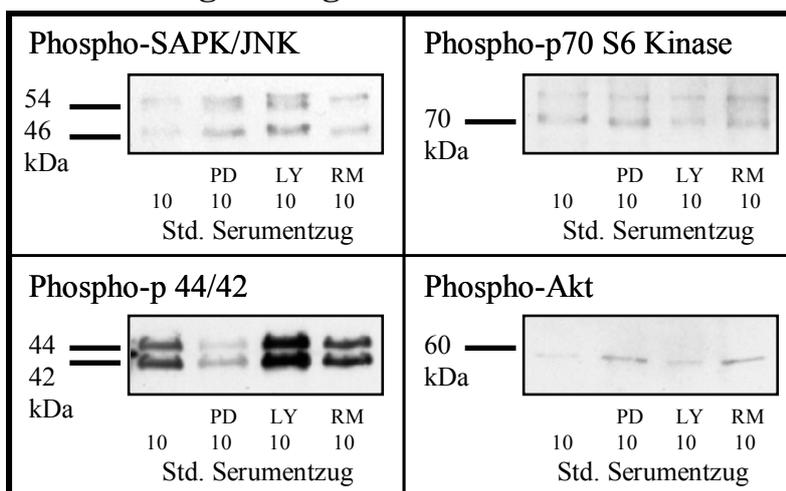


Abb. 5.1.17: WB-Analyse nach Serumentzug mit Signaltransduktionshemmstoffen von undifferenzierten PC12-Zellen

Nach zehn Stunden Serumentzug unter Zusatz von PD 98059, LY 294002 bzw. Rapamycin, sowie in der Kontrolle ohne Zusatz der Inhibitoren, waren die vier nachgewiesenen Antikörper Phospho-SAPK/JNK, Phospho-p70 S6K, Phospho-p44/42 und Phospho-Akt positiv.

Auswertung siehe Tabelle:

Phospho-Ak	PC12 undifferenziert			
	Kontrolle	PD98059	LY294009	Rapamycin
SAPK/JNK	+	++	+++	++
p70S6K	++	++	++	+++
p44/42	+++	+	+++	++
Akt	+	++	+	++

Tab. 5.1.12: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Serumentzug mit Signaltransduktionshemmstoffen von undifferenzierten PC12-Zellen: Phospho-SAPK/JNK, Phospho-p38, Phospho-p44/42 und Phospho-Akt

Die Western Blot-Analyse zur Expressionskontrollanalyse ergab für alle untersuchten nicht-phosphospezifischen Antikörper ein positives Ergebnis (s. Abb. 5.1.18).

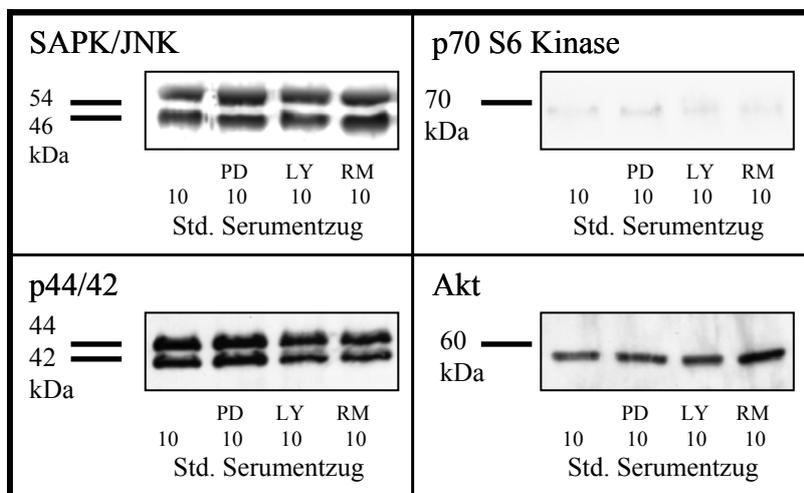


Abb. 5.1.18: WB-Analyse zur Expressionskontrollanalyse nach Serumentzug mit Signaltransduktionshemmstoffen von undifferenzierten PC12-Zellen

5.1.5.4 Western Blot-Analysen von undifferenzierten PC12-Zellen nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen

5.1.5.4.1 Stress-aktivierte Proteinkinase

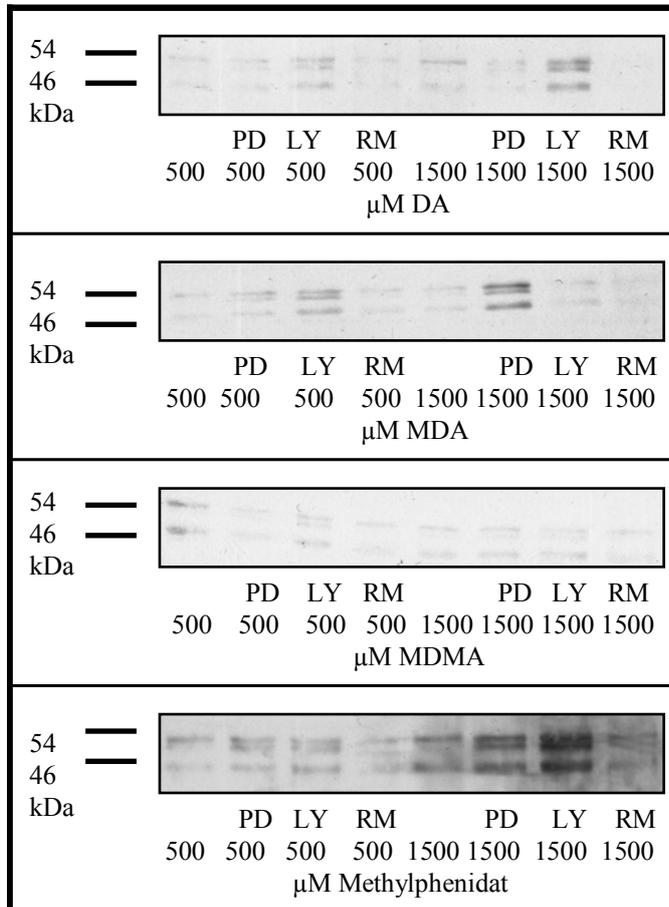


Abb. 5.1.19: WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von undifferenzierten PC12-Zellen: Phospho-SAPK/JNK

Phospho-SAPK/JNK ließ sich nach vier Stunden sowohl bei einer Amphetaminkonzentration von 500, als auch bei 1500 μM , bei allen verwendeten Signaltransduktionshemmstoffen nachweisen. Unter Rapamycin und 1500 μM DA bzw. MDA war der Nachweis von Phospho-SAPK/JNK negativ. Auswertung siehe Tabelle:

Phospho-SAPK/JNK	Amphetaminkonzentration: 500 μM				Amphetaminkonzentration: 1500 μM			
	Kontrolle	PD 98059	LY 294002	Rapamycin	Kontrolle	PD 98059	LY 294002	Rapamycin
DA	+	+	++	+	+	+	+++	neg.
MDA	+	+	++	+	+	+++	+	neg.
MDMA	++	+	+	+	+	+	+	+
Methylphenidat	+	+	+	+	++	++	+++	+

Tab. 5.1.13: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von undifferenzierten PC12-Zellen: Phospho-SAPK/JNK

Die Western Blot-Analyse zur Expressionskontrollanalyse ergab für alle untersuchten nicht-phosphospezifischen Antikörper ein positives Ergebnis (s. Abb. 5.1.20).

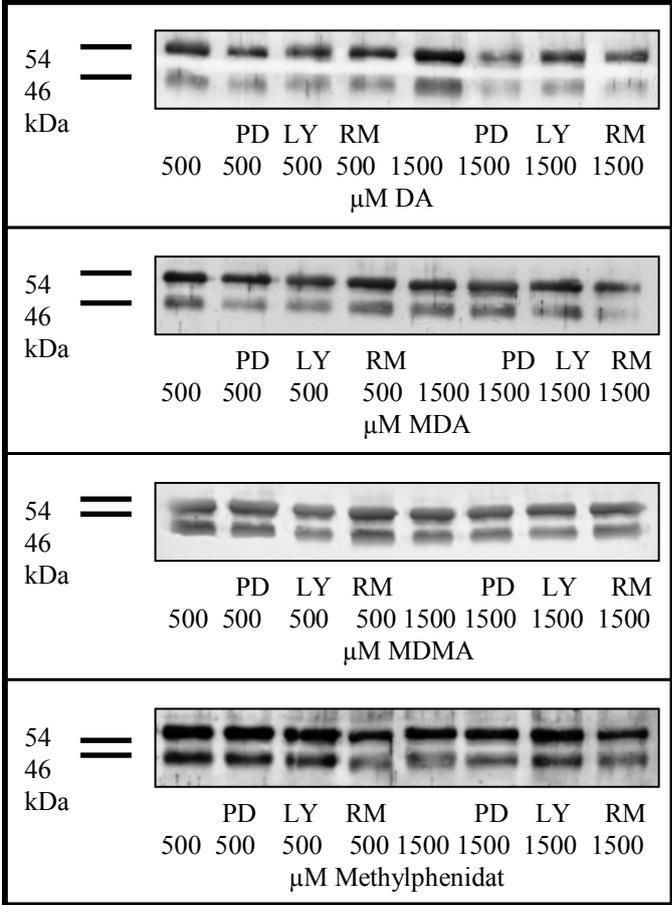


Abb. 5.1.20: WB-Analyse zur Expressionskontrollanalyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von undifferenzierten PC12-Zellen: SAPK/JNK

5.1.5.4.2 p70 S6 Kinase

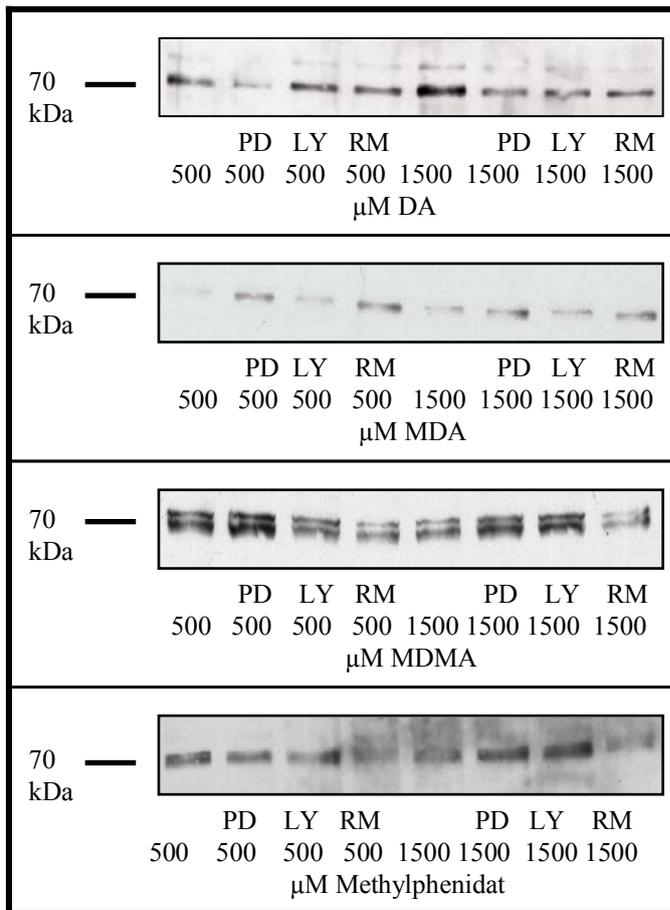


Abb. 5.1.21: WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von undifferenzierten PC12-Zellen: Phospho-p70 S6 Kinase

Phospho-p70 S6 Kinase war bei allen untersuchten Amphetaminen und Hemmstoffen nachweisbar. Auswertung siehe Tabelle:

Phospho-p70 S6 Kinase	Amphetaminkonzentration: 500 μM				Amphetaminkonzentration: 1500 μM			
	Kontrolle	PD 98059	LY 294002	Rapamycin	Kontrolle	PD 98059	LY 294002	Rapamycin
DA	++	+	++	++	++	++	++	++
MDA	+	++	+	++	+	++	+	++
MDMA	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	++
Methylphenidat	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++

Tab. 5.1.14: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von undifferenzierten PC12-Zellen: Phospho-p70 S6 Kinase

Die Western Blot-Analyse zur Expressionskontrollanalyse ergab für alle untersuchten nicht-phosphospezifischen Antikörper ein positives Ergebnis (s. Abb. 5.1.22).

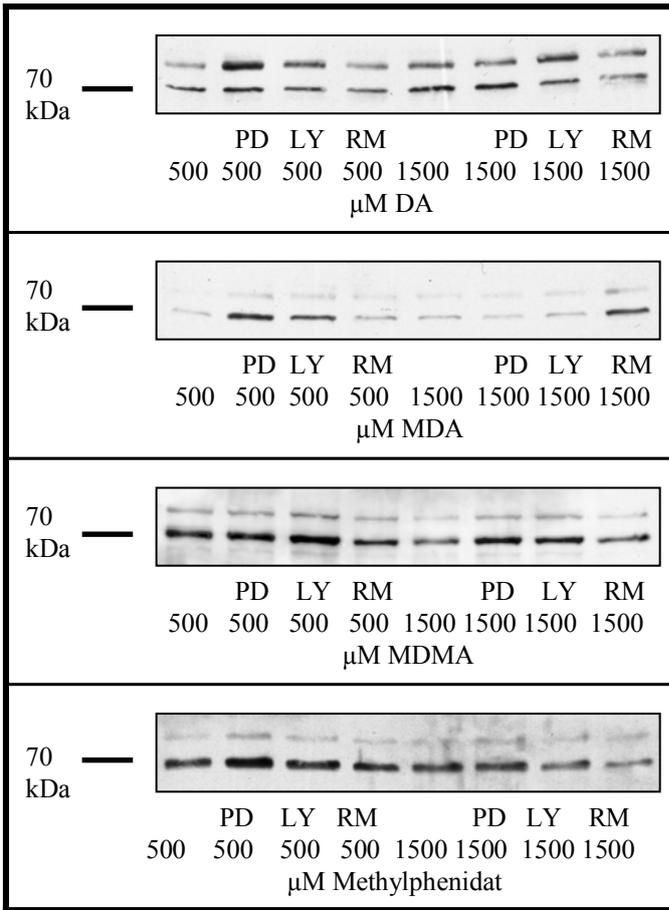


Abb. 5.1.22: WB-Analyse zur Expressionskontrollanalyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von undifferenzierten PC12-Zellen: p70 S6 Kinase

5.1.5.4.3 p44/42 mitogen-aktivierte Proteinkinase

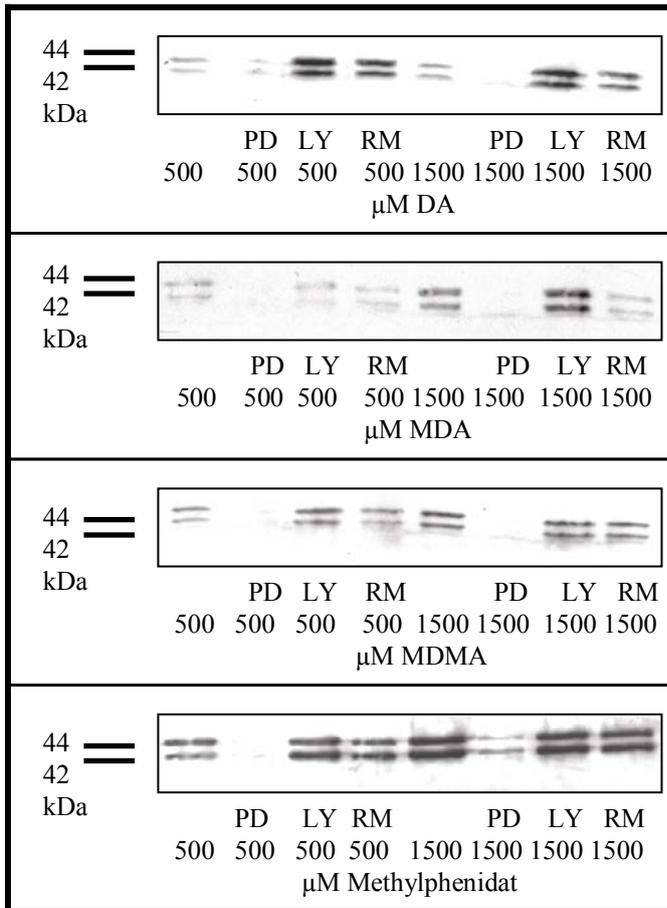


Abb. 5.1.23: WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von undifferenzierten PC12-Zellen: Phospho-p44/42

Ein Nachweis von phospho-p44/42 MAPK konnte unter 500 μM MDA-, MDMA- und Methylphenidatbehandlung, sowie unter 1500 μM DA-, MDA- und MDMA-Behandlung sowie Zusatz von PD 98059 nicht beobachtet werden. Bei allen anderen Amphetaminen und Inhibitoren konnte die phosphorylierte Form von p44/42 nachgewiesen werden. Auswertung siehe Tabelle:

Phospho-p44/42	Amphetaminkonzentration: 500 μM				Amphetaminkonzentration: 1500 μM			
	Kontrolle	PD 98059	LY 294002	Rapa-mycin	Kontrolle	PD 98059	LY 294002	Rapa-mycin
DA	++	+	+++	+++	++	neg.	+++	+++
MDA	++	neg.	++	++	+++	neg.	+++	++
MDMA	++	neg.	++	+++	+++	neg.	+++	+++
Methylphenidat	++	neg.	+++	+++	+++	+	+++	+++

Tab. 5.1.14: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von undifferenzierten PC12-Zellen: Phospho-p44/42

Die Western Blot-Analyse zur Expressionskontrollanalyse ergab für alle untersuchten nicht-phosphospezifischen Antikörper ein positives Ergebnis (s. Abb. 5.1.24).

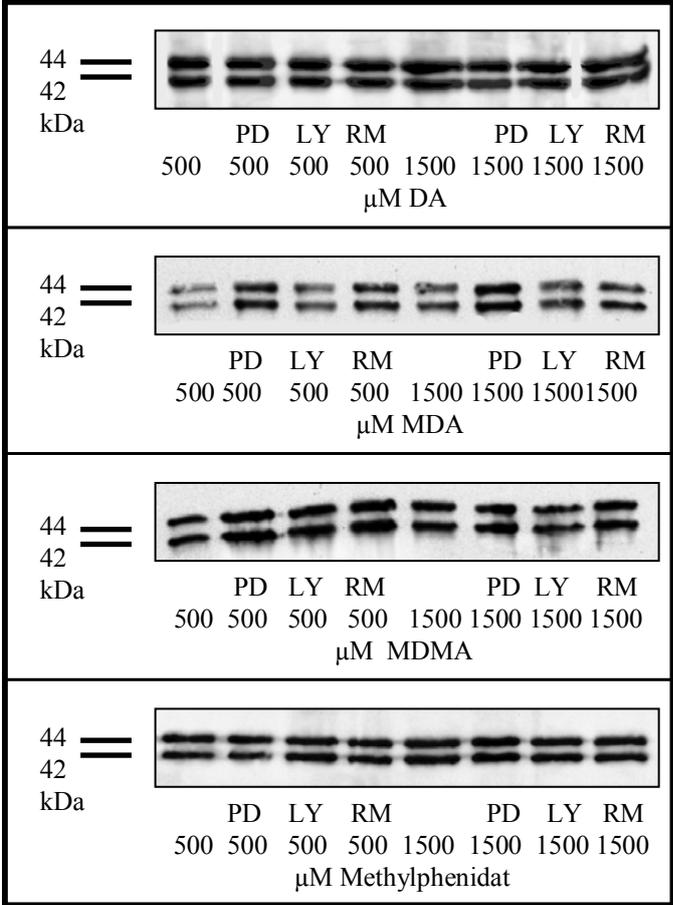


Abb. 5.1.24: WB-Analyse zur Expressionskontrollanalyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von undifferenzierten PC12-Zellen: p44/42

5.1.5.4.4 Akt

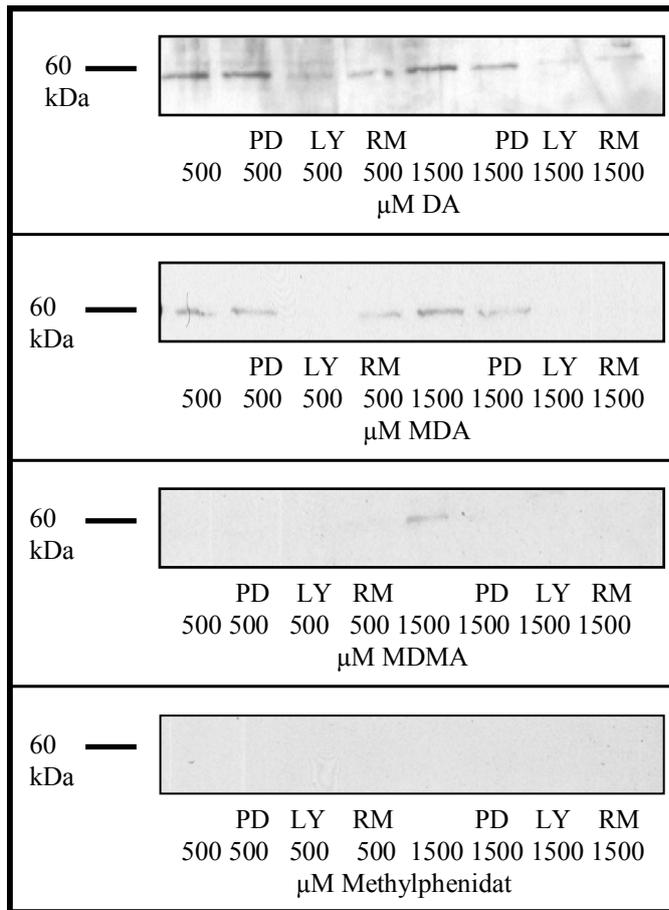


Abb. 5.1.25: WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von undifferenzierten PC12-Zellen: Phospho-Akt

Nach Behandlung der Zellen mit 500, bzw. 1500 $\mu\text{M DA}$ ließ sich bei allen Hemmstoffen Phospho-Akt nachweisen. Phospho-Akt konnte nach MDMA- und Methylphenidatbehandlung unter Zusatz von PD 98059, LY 294002 und Rapamycin nicht nachgewiesen werden; bei Behandlung mit 500 $\mu\text{M MDA}$ und Zusatz von LY 294002 war kein Phospho-Akt-Nachweis möglich, wie auch bei der Behandlung mit 1500 $\mu\text{M MDA}$ und Zusatz von LY 294002 und Rapamycin. Fraglich positiv war der Nachweis von Phospho-Akt nach 1500 $\mu\text{M MDMA}$ -Behandlung, negativ nach Methylphenidatbehandlung. Auswertung siehe Tabelle:

Phospho-Akt	Amphetaminkonzentration: 500 μM				Amphetaminkonzentration: 1500 μM			
	Kontrolle	PD 98059	LY 294002	Rapamycin	Kontrolle	PD 98059	LY 294002	Rapamycin
DA	++	++	+	+	++	++	+	+
MDA	+	+	neg.	+	+	+	neg.	neg.
MDMA	neg.	neg.	neg.	neg.	(+)	neg.	neg.	neg.
Methylphenidat	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Tab. 5.1.15: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von undifferenzierten PC12-Zellen: Phospho-Akt

Die Western Blot-Analyse zur Expressionskontrollanalyse ergab für alle untersuchten nicht-phosphospezifischen Antikörper ein positives Ergebnis (s. Abb. 5.1.26).

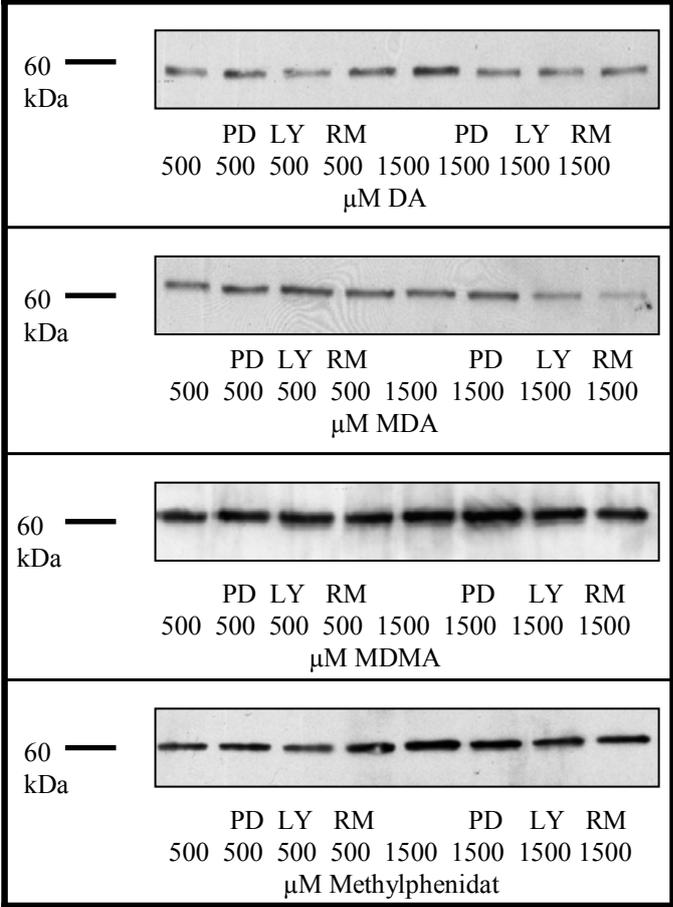


Abb. 5.1.26: WB-Analyse zur Expressionskontrollanalyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von undifferenzierten PC12-Zellen: Akt

5.2 Ergebnisse: differenzierte PC12-Zellen

5.2.1 Zytotoxizitätsassays

Bei den differenzierten Zellen zeigte sich eine deutliche Extinktionsabnahme bei steigender Amphetaminkonzentration. Am stärksten ausgeprägt war diese bei MDA, gefolgt von DA und MDMA. Nur eine geringe Extinktionsabnahme war bei den eingesetzten Konzentrationen bei Methylphenidat zu erzielen. Auswertung:

A)

Amphetamin-konz. in μM	DA		MDA		MDMA		Methylphenidat	
	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW
0	1,652	0,018	0,684	0,020	0,641	0,012	0,693	0,014
250	1,739	0,018	0,637	0,009	0,628	0,020	0,661	0,003
500	1,680	0,017	0,630	0,009	0,622	0,020	0,634	0,012
1000	0,995	0,012	0,350	0,006	0,588	0,016	0,662	0,007
1500	0,390	0,004	0,242	0,007	0,577	0,007	0,659	0,011
2000	0,481	0,008	0,131	0,010	0,500	0,019	0,647	0,012

B)

Amphetamin-konz. in μM	Überlebende Zellen in Prozent			
	DA	MDA	MDMA	Methylphenidat
0	100	100	100	100
250	105,3	93,1	98	95,4
500	101,7	92,1	97	91,5
1000	60,2	51,2	91,7	95,5
1500	23,6	35,4	90	95,1
2000	29,1	19,2	78	93,4

Tab. 5.2.1: A) Mittelwert der gemessenen Extinktionen und berechnete Standardabweichungen nach Amphetaminbehandlung über 72 Stunden. B) Maß der Schädigung in % (unbehandelte Kontrolle [$0 \mu\text{M}$] $\hat{=}$ 100 %)

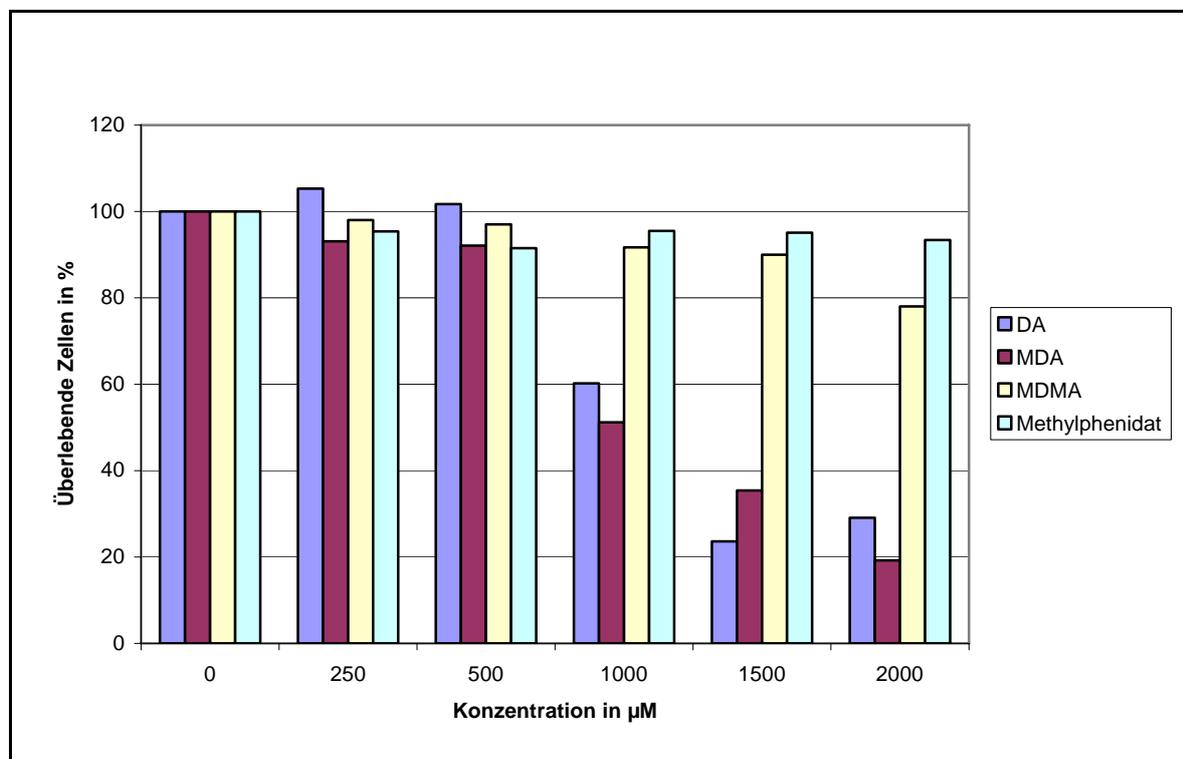


Abb. 5.2.1: Maß der Schädigung von differenzierten PC12-Zellen nach 72 Stunden Amphetaminbehandlung (unbehandelte Kontrolle [$0 \mu\text{M}$] $\hat{=}$ 100 %)

5.2.2 Zytotoxizitätsassays mit Rapamycin

Eine Extinktionsabnahme bei differenzierten PC12-Zellen unter Zusatz von 100 nM Rapamycin fand sich bei DA-Behandlung bereits ab einer Konzentration von 250 μM . Eine Extinktionszunahme zeigte sich dagegen unter Methylphenidatbehandlung. MDA und MDMA zeigten ebenfalls eine Extinktionszunahme und ab einer Konzentration von 1000 μM eine Extinktionsabnahme. Auswertung:

A)

Amphetamin-konz. in μM	DA		MDA		MDMA		Methylphenidat	
	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW
0	1,483	0,023	0,632	0,021	0,640	0,021	0,629	0,014
250	1,558	0,010	0,716	0,012	0,708	0,013	0,752	0,020
500	0,814	0,011	0,690	0,018	0,701	0,017	0,740	0,019
1000	0,484	0,005	0,527	0,013	0,636	0,040	0,734	0,015
1500	0,888	0,018	0,395	0,009	0,563	0,020	0,756	0,018
2000	0,244	0,001	0,449	0,009	0,400	0,013	0,719	0,022

B)

Amphetamin-konz. in μM	Überlebende Zellen in Prozent			
	DA	MDA	MDMA	Methylphenidat
0	100	100	100	100
250	78,2	113,3	110,6	119,6
500	54,9	109,2	109,5	117,6
1000	59,9	83,4	99,4	116,7
1500	32,6	62,5	88	118,1
2000	16,5	71,0	62,5	114,3

Tab. 5.2.2: A) Mittelwert der gemessenen Extinktionen und berechnete Standardabweichungen nach Amphetamin- und Rapamycinbehandlung über 72 Stunden. B) Maß der Schädigung in % (unbehandelte Kontrolle [0 μM] $\hat{=}$ 100 %)

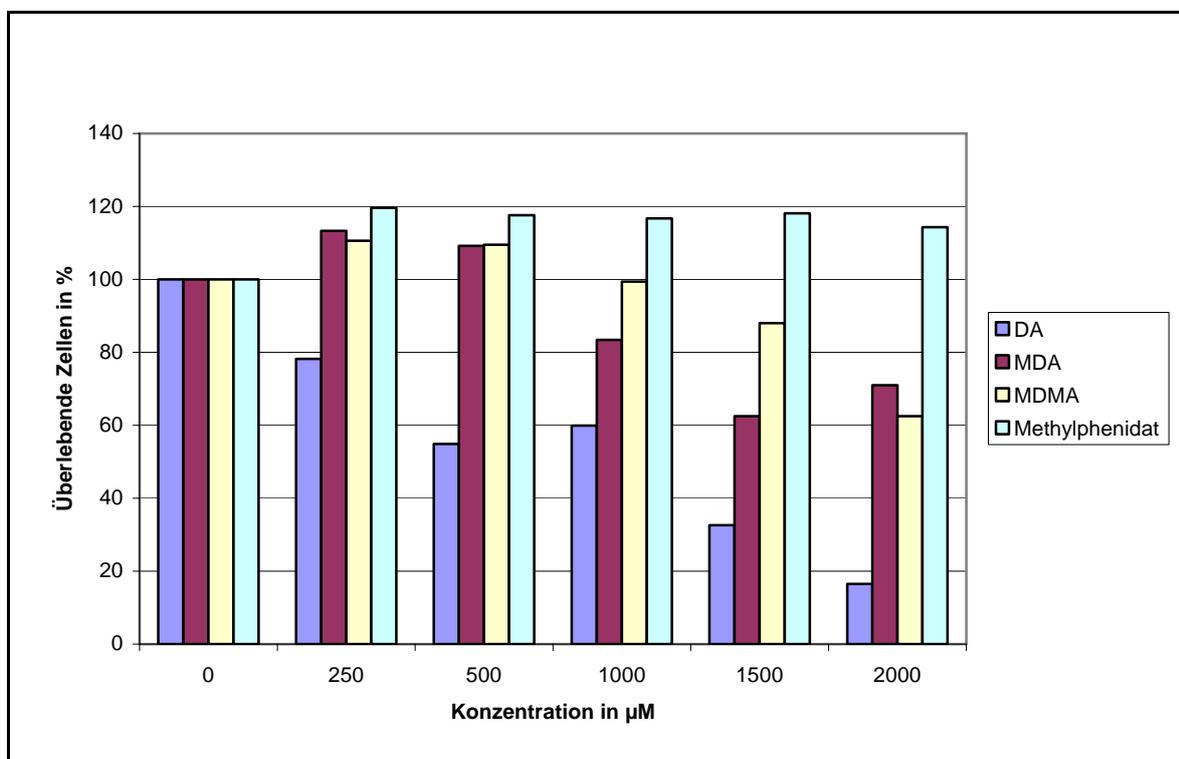


Abb. 5.2.2: Maß der Schädigung von differenzierten PC12-Zellen nach 72 Stunden Amphetaminbehandlung unter Zusatz von 100 nM Rapamycin (unbehandelte Kontrolle [0 μM] $\hat{=}$ 100 %)

5.2.3 Zytotoxizitätsassays mit PD 98059

Bei 250 μM ist die Extinktionsabnahme von differenzierten PC12-Zellen unter Zusatz von 50 μM PD 98059 bei DA etwa doppelt so groß wie bei MDA, ab 500 μM ist sie in etwa gleich groß. Weniger deutlich ausgeprägt ist die Extinktionsabnahme nach MDMA-Behandlung, gefolgt von Methylphenidat. Auswertung:

A)

Amphetamin-konz. in μM	DA		MDA		MDMA		Methylphenidat	
	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW
0	1,404	0,015	0,544	0,022	0,584	0,019	0,529	0,015
250	0,589	0,010	0,169	0,011	0,558	0,019	0,605	0,012
500	0,535	0,004	0,199	0,007	0,504	0,011	0,525	0,007
1000	0,205	0,002	0,045	0,005	0,359	0,008	0,494	0,006
1500	0,151	0,002	0,060	0,005	0,255	0,008	0,501	0,006
2000	0,115	0,002	0,015	0,017	0,259	0,010	0,387	0,013

B)

Amphetamin-konz. in μM	Überlebende Zellen in Prozent			
	DA	MDA	MDMA	Methylphenidat
0	100	100	100	100
250	42	86,2	95,5	114,4
500	38,1	36,6	86,3	99,2
1000	14,6	8,3	61,5	93,4
1500	10,8	11,0	43,7	94,7
2000	8,2	5,3	44,3	73,2

Tab. 5.2.3: A) Mittelwert der gemessenen Extinktionen und berechnete Standardabweichungen nach Amphetamin- und PD 98059-Behandlung über 72 Stunden. B) Maß der Schädigung in % (unbehandelte Kontrolle [0 μM] $\hat{=}$ 100 %)

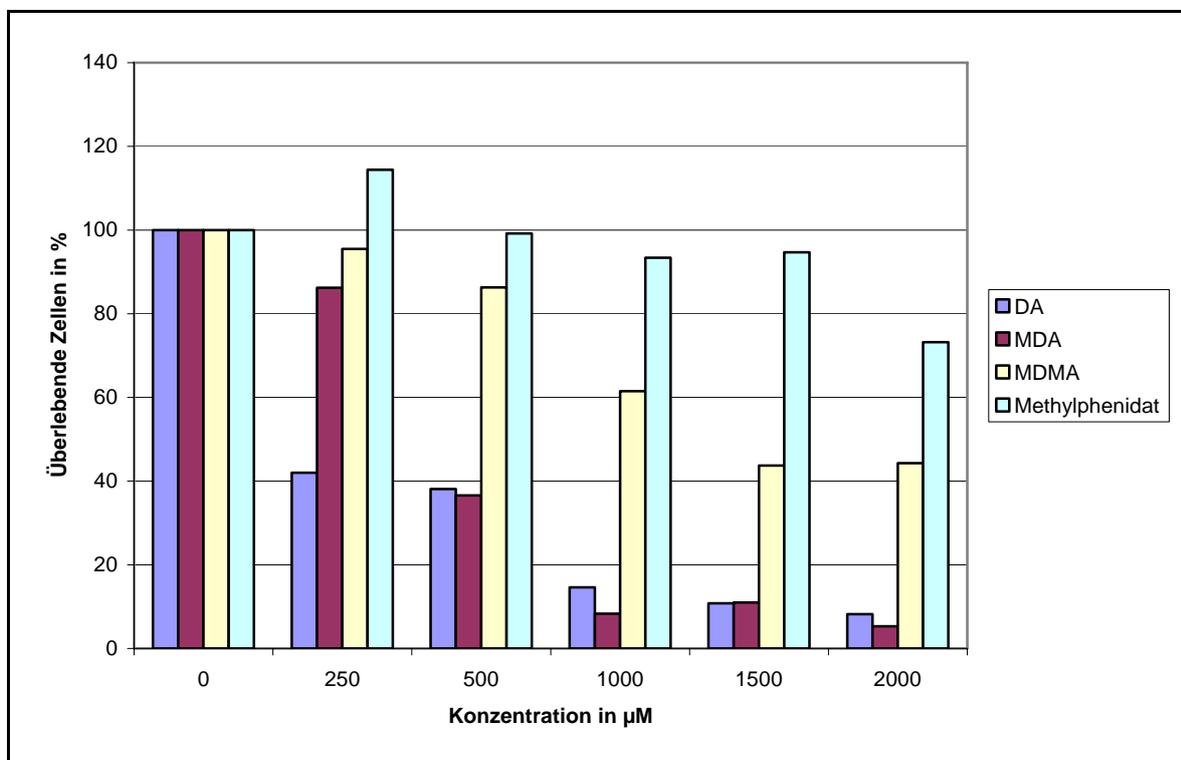


Abb. 5.2.3: Maß der Schädigung von differenzierten PC12-Zellen nach 72 Stunden Amphetaminbehandlung unter Zusatz von 50 μM PD 98059 (unbehandelte Kontrolle [0 μM] $\hat{=}$ 100 %)

5.2.4 Zytotoxizitätsassays mit LY 294002

Die differenzierten Zellen zeigten unter Zusatz von 20 μM LY 294002 eine deutliche Extinktionsabnahme mit steigender Amphetaminkonzentration. Am stärksten ausgeprägt war dieser Effekt bei DA, gefolgt von MDA und MDMA. Die schwächste Extinktionsabnahme zeigte Methylphenidat. Auswertung:

A)

Amphetamin-konz. in μM	DA		MDA		MDMA		Methylphenidat	
	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW	Extinkt.	STABW
0	0,961	0,008	0,626	0,008	0,685	0,021	0,641	0,015
250	0,503	0,012	0,162	0,002	0,621	0,020	0,667	0,021
500	0,300	0,005	0,337	0,007	0,591	0,022	0,648	0,017
1000	0,176	0,005	0,306	0,005	0,500	0,009	0,610	0,011
1500	0,124	0,005	0,278	0,002	0,428	0,006	0,590	0,014
2000	0,099	0,005	0,182	0,007	0,341	0,014	0,541	0,022

B)

Amphetamin-konz. in μM	Überlebende Zellen in Prozent			
	DA	MDA	MDMA	Methylphenidat
0	100	100	100	100
250	52,3	73,8	90,7	104,1
500	31,2	53,8	86,3	101,1
1000	18,3	48,9	73	95,2
1500	12,9	44,4	62,5	92,0
2000	10,3	29,1	49,9	83,4

Tab. 5.2.4: A) Mittelwert der gemessenen Extinktionen und berechnete Standardabweichungen nach Amphetamin- und LY 294002-Behandlung über 72 Stunden. B) Maß der Schädigung in % (unbehandelte Kontrolle [0 μM] $\hat{=}$ 100 %)

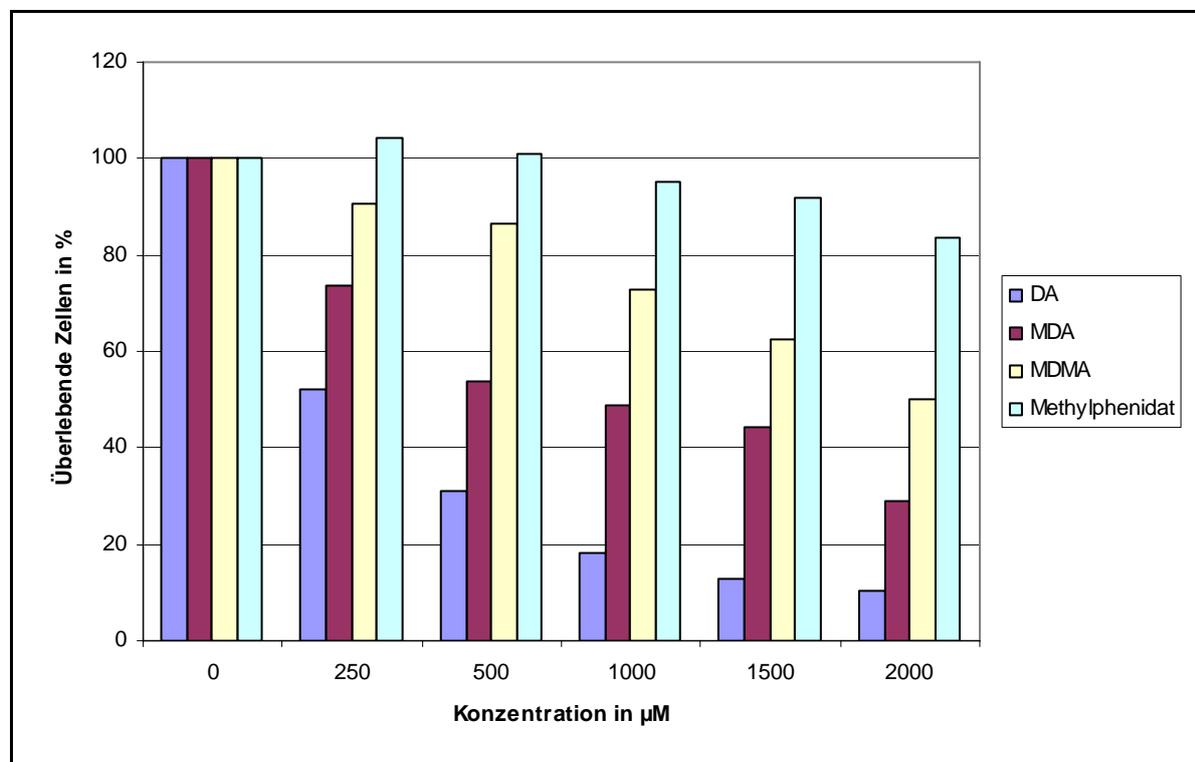


Abb. 5.2.4: Maß der Schädigung von differenzierten PC12-Zellen nach 72 Stunden Amphetaminbehandlung unter Zusatz von 20 μM LY 294002 (unbehandelte Kontrolle [0 μM] $\hat{=}$ 100 %)

5.2.5 Western Blot-Analysen von differenzierten PC12-Zellen

5.2.5.1 Western Blot-Analysen von differenzierten PC12-Zellen nach Serumentzug ohne Signaltransduktionshemmstoffe

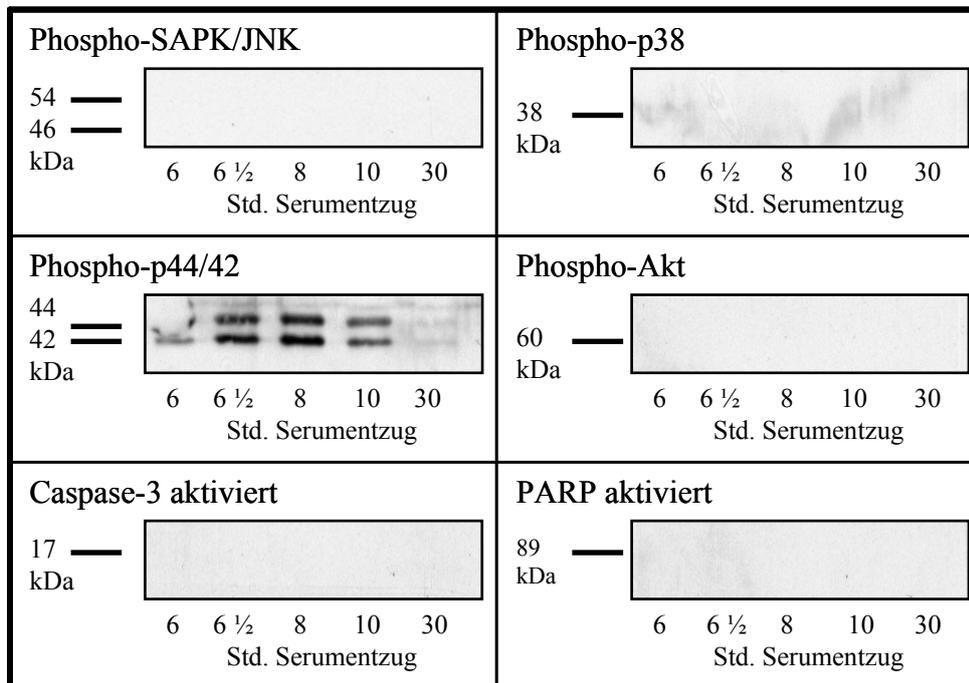


Abb. 5.2.5: WB-Analyse nach Serumentzug von differenzierten PC12-Zellen

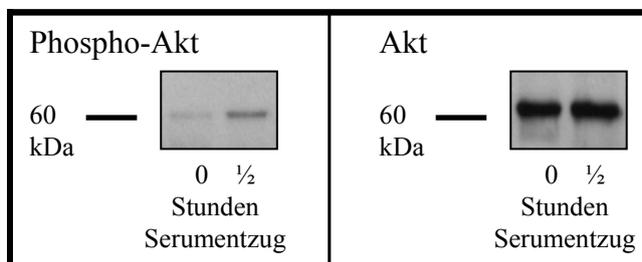


Abb. 5.2.6: WB-Analyse nach Serumentzug von differenzierten PC12-Zellen: Phospho-Akt und Expressionskontrollanalyse von Akt nach null Stunden und einer halben Stunde Serumentzug

Die Western Blot-Analyse der differenzierten PC12-Zellen nach Serumentzug war für Phospho-p44/42 positiv. Der Nachweis wurde nach vier Stunden Serumentzug negativ. Phospho-SAPK/JNK und Phospho-p38 waren durchgehend negativ. Phospho-Akt ließ sich zu Beginn des Serumentzugs noch nachweisen (Null-Stunden: +; ½-Stunde: ++ [nicht in Tabellen gelistet]). Nach 6 Stunden war Phospho-Akt ebenfalls negativ. Die aktivierte Form von PARP und Caspase-3 nach Serumentzug ließ sich nicht nachweisen. Auswertung siehe Tabelle:

A)	Phospho-Ak	6 h	6 ½ h	8 h	10 h	30 h
	SAPK	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	p38	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	p44/42	++	+++	+++	++	neg.
	Akt	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

B)		6 h	6 ½ h	8 h	10 h	30 h
	PARP aktiviert	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	Caspase-3 Aktiviert	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Tab. 5.2.5: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Serumentzug von differenzierten PC12-Zellen: A) Phospho-SAPK/JNK, Phospho-p38, Phospho-p44/42 und Phospho-Akt; B) PARP aktiviert und Caspase-3 aktiviert

Die Western Blot-Analyse zur Expressionskontrollanalyse war bei alle untersuchten nicht-phosphospezifischen Antikörper ein positiv (s. Abb. 5.2.7).

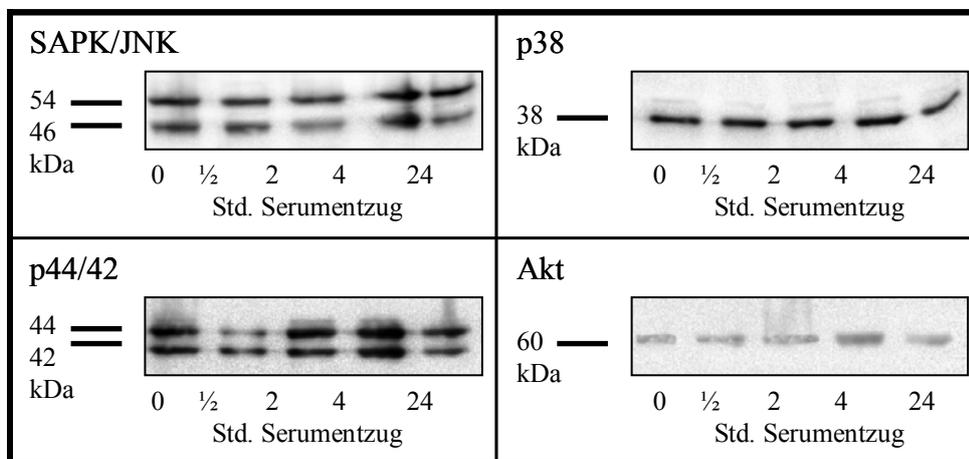


Abb. 5.2.7: WB-Analyse zur Expressionskontrolle nach Serumentzug von differenzierten PC12-Zellen: SAPK/JNK, p38, p44/42 und Akt

5.2.5.2 Western Blot-Analysen von differenzierten PC12-Zellen nach Amphetaminbehandlung ohne Signaltransduktionshemmstoffe

5.2.5.2.1 Stress-aktivierte Proteinkinase

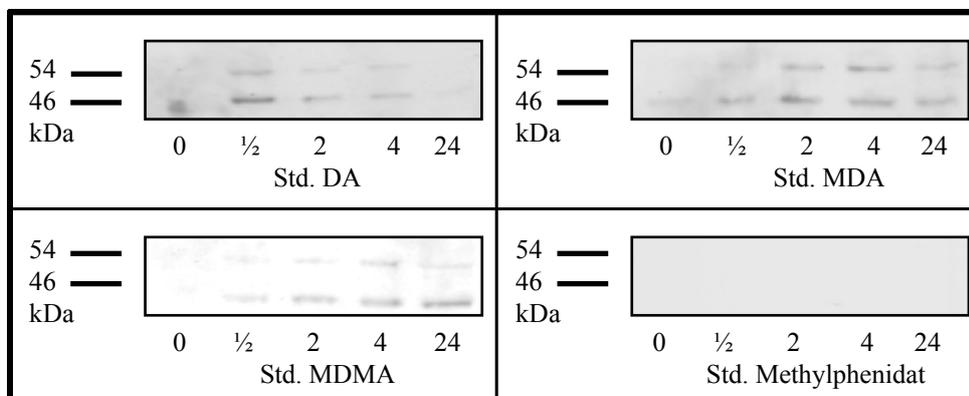


Abb. 5.2.8: WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von differenzierten PC12-Zellen: Phospho-SAPK/JNK

Phospho-SAPK/JNK wurde nach einer Stunde DA-, MDA- und MDMA-Behandlung positiv. Nach Methylphenidatbehandlung blieb Phospho-SAPK/JNK im untersuchten Zeitfenster durchgehend negativ. Auswertung siehe Tabelle:

Phospho-SAPK/JNK	0 h	½ h	2 h	4 h	24 h
DA	neg.	++	+	+	neg.
MDA	neg.	+	+	+	+
MDMA	neg.	+	+	+	+
Methylphenidat	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Tab. 5.2.6: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von differenzierten PC12-Zellen: Phospho-SAPK/JNK

Die Western Blot-Analyse zur Expressionskontrollanalyse ergab für alle untersuchten nicht-phosphospezifischen Antikörper ein positives Ergebnis (s. Abb. 5.2.9).

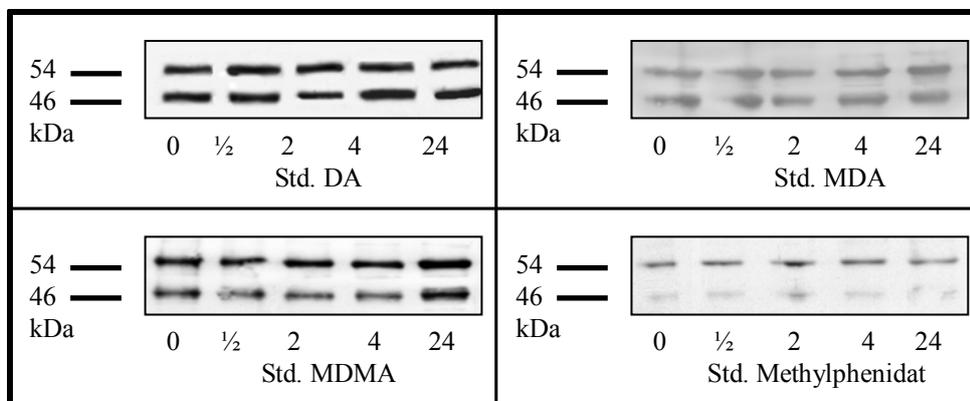


Abb. 5.2.9: WB-Analyse zur Expressionskontrolle nach Amphetaminbehandlung von differenzierten PC12-Zellen: SAPK/JNK

5.2.5.2.2 p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase

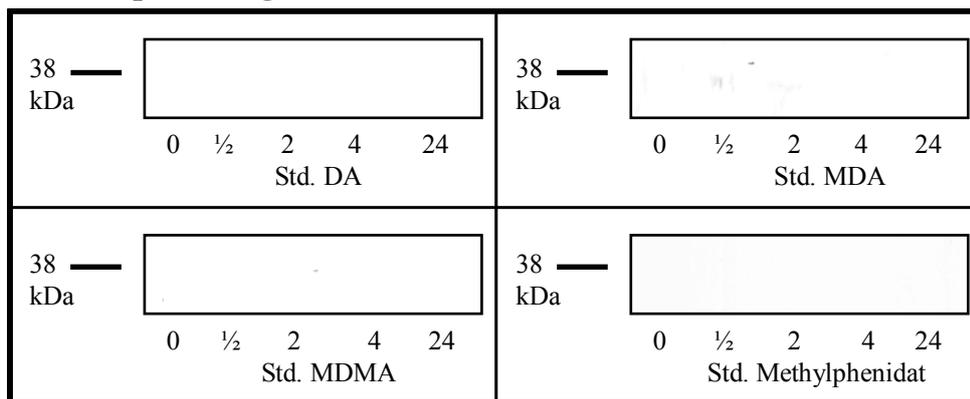


Abb. 5.2.10: WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von differenzierten PC12-Zellen: Phospho-p38

Phospho-p38 war bei allen untersuchten Amphetaminen nicht nachweisbar und blieb in den Western Blot-Analysen im untersuchten Zeitfenster negativ. Auswertung s. Tabelle:

Phospho-p38	0 h	½ h	2 h	4 h	24 h
DA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
MDA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
MDMA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Methylphenidat	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Tab. 5.2.7: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von differenzierten PC12-Zellen: Phospho-p38

Die Western Blot-Analyse zur Expressionskontrollanalyse ergab für alle untersuchten nicht-phosphospezifischen Antikörper ein positives Ergebnis (s. Abb. 5.2.11).

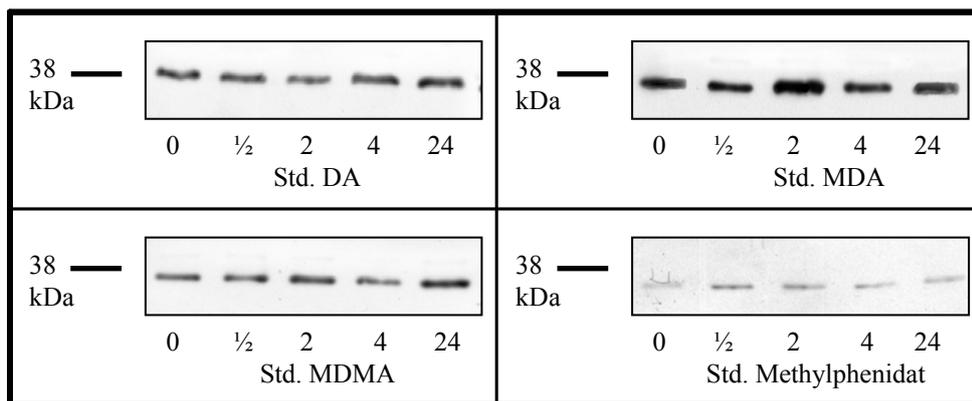


Abb. 5.2.11: WB-Analyse zur Expressionskontrolle nach Amphetaminbehandlung von differenzierten PC12-Zellen: p38

5.2.5.2.3 p44/42 mitogen-aktivierte Proteinkinase

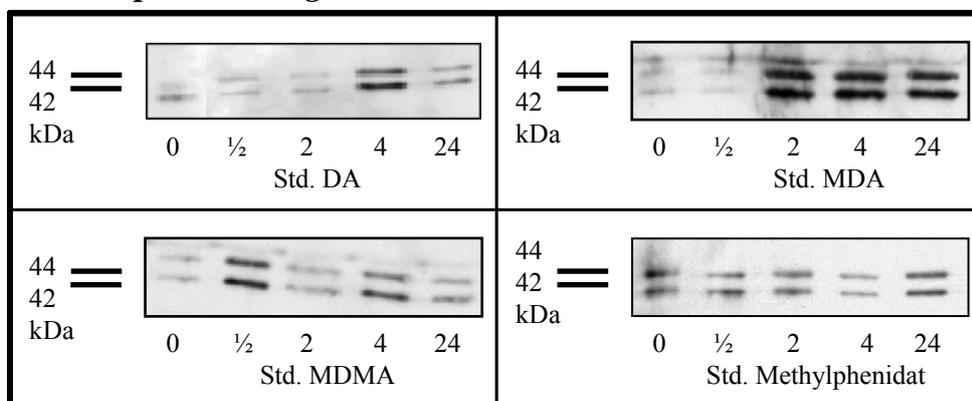


Abb. 5.2.12: WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von differenzierten PC12-Zellen: Phospho-p44/42

Phospho-p44/42 war bei allen untersuchten Amphetaminen von null bis 24 Stunden positiv.

Auswertung siehe Tabelle:

Phospho-p44/42	0 h	½ h	2 h	4 h	24 h
DA	+	+	+	+++	++
MDA	+	+	+++	+++	++
MDMA	+	++	+	++	+
Methylphenidat	+	+	+	+	++

Tab. 5.2.8: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von differenzierten PC12-Zellen: Phospho-p44/42

Die Western Blot-Analyse zur Expressionskontrollanalyse ergab für alle untersuchten nicht-phosphospezifischen Antikörper ein positives Ergebnis (s. Abb. 5.2.13).

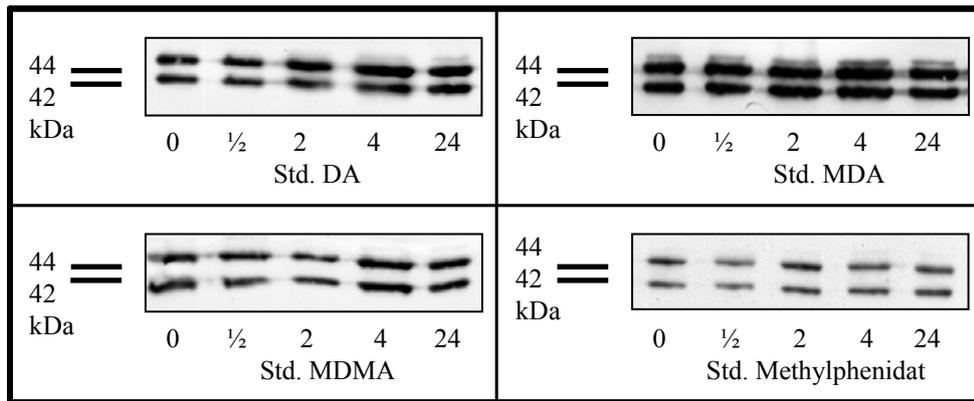


Abb. 5.2.13: WB-Analyse zur Expressionskontrolle nach Amphetaminbehandlung von differenzierten PC12-Zellen: p44/42

5.2.5.2.4 Akt

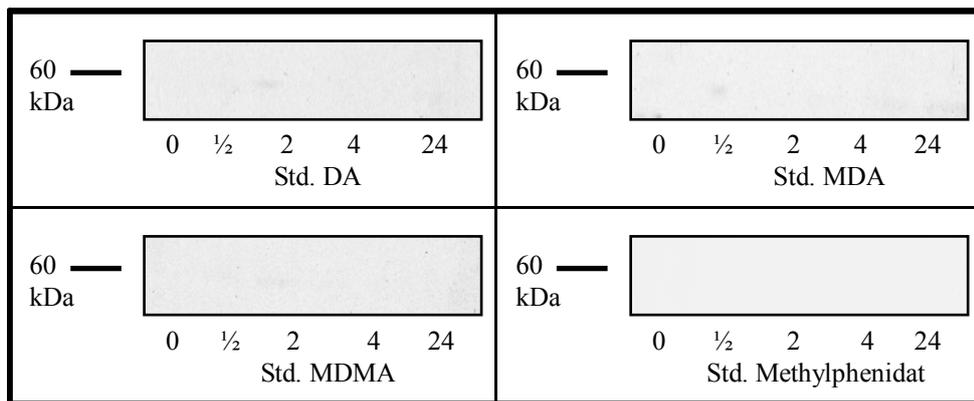


Abb. 5.2.14: WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von differenzierten PC12-Zellen: Phospho-Akt

Phospho-Akt ließ sich im untersuchten Zeitfenster für differenzierte PC12-Zellen nicht nachweisen. Auswertung siehe Tabelle:

Phospho-Akt	0 h	1/2 h	2 h	4 h	24 h
DA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
MDA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
MDMA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Methylphenidat	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Tab. 5.2.9: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von differenzierten PC12-Zellen: Phospho-Akt

Die Western Blot-Analyse zur Expressionskontrollanalyse ergab für alle untersuchten nicht-phosphospezifischen Antikörper ein positives Ergebnis (s. Abb. 5.2.14).

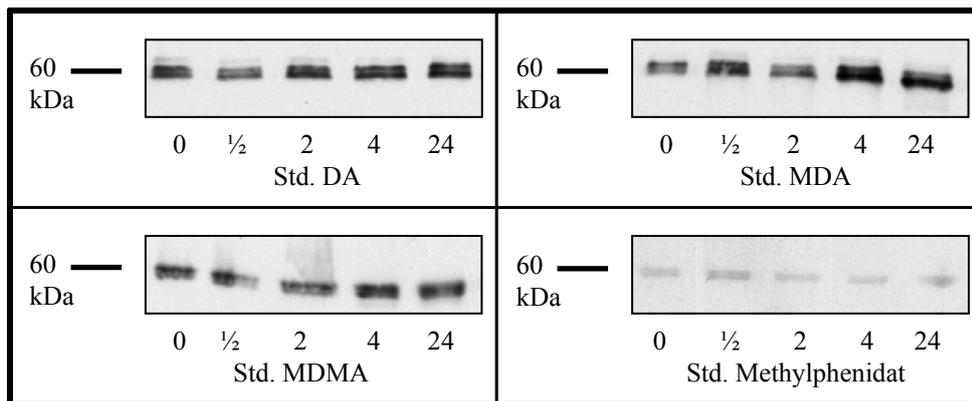


Abb. 5.2.15 WB-Analyse zur Expressionskontrolle nach Amphetaminbehandlung von differenzierten PC12-Zellen: Akt

5.2.5.2.5 Caspase-3 aktiviert

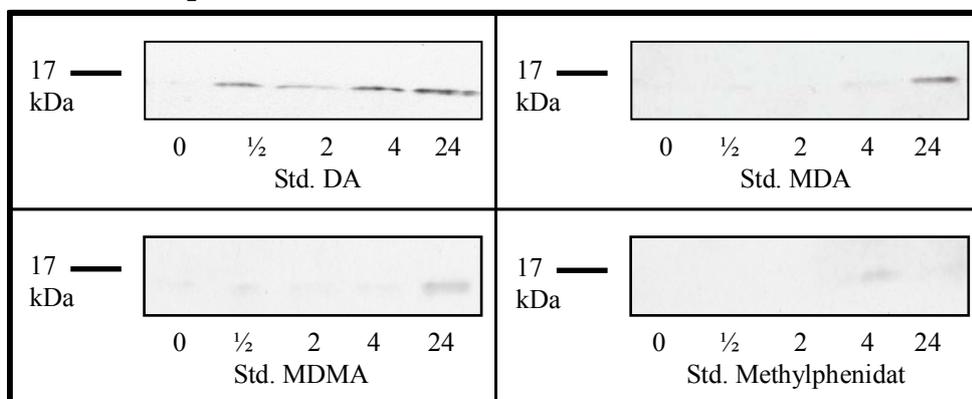


Abb. 5.2.16: WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von differenzierten PC12-Zellen: Caspase-3 aktiviert

Der Nachweis der aktivierten Form der Caspase-3 gelang bei DA-Behandlung nach einer halben Stunde, nach MDA- und MDMA-Behandlung nach 24 Stunden. Auswertung siehe Tabelle:

Caspase-3 aktiviert	0 h	½ h	2 h	4 h	24 h
DA	neg.	+	+	++	+
MDA	neg.	neg.	neg.	neg.	+
MDMA	neg.	neg.	neg.	neg.	+
Methylphenidat	neg.	neg.	neg.	(+)	neg.

Tab. 5.2.10: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von differenzierten PC12-Zellen: Caspase-3 aktiviert

5.2.5.2.6 Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase aktiviert

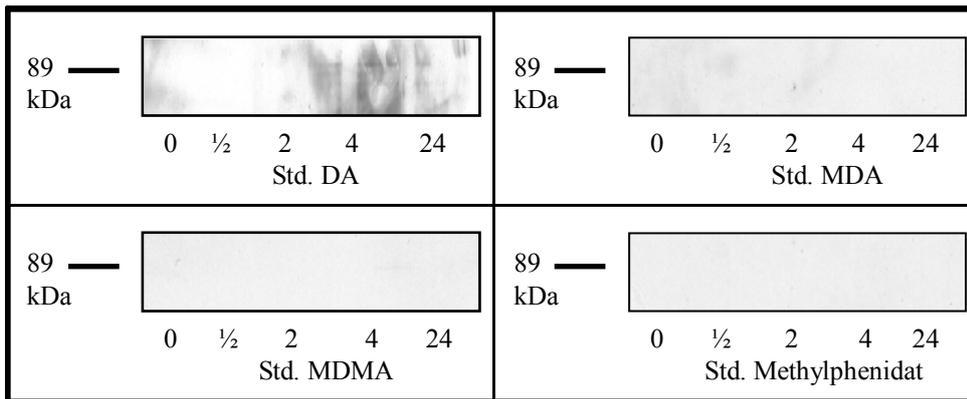


Abb. 5.2.17: WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von differenzierten PC12-Zellen: PARP aktiviert

Die aktivierte Form von PARP ließ sich bei den untersuchten Amphetaminen für den Behandlungszeitraum nicht nachweisen. Auswertung siehe Tabelle:

PARP aktiviert	0 h	1/2 h	2 h	4 h	24 h
DA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
MDA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
MDMA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Methylphenidat	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Tab. 5.2.11: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung von differenzierten PC12-Zellen: PARP aktiviert

5.2.5.3 Western Blot-Analysen von differenzierten PC12-Zellen nach Serumentzug mit Signaltransduktionshemmstoffen

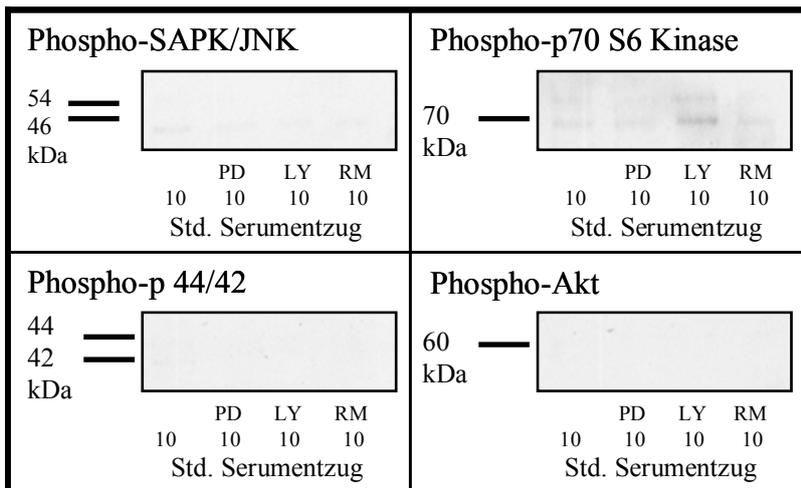


Abb. 5.2.18: WB-Analyse nach Serumentzug mit Signaltransduktionshemmstoffen von differenzierten PC12-Zellen

Phospho-p44/42, Phospho-Akt und Phospho-SAPK/JNK unter Zusatz von PD 98059, LY 294002 und Rapamycin konnte nach zehn Stunden Serumentzug nicht nachgewiesen werden.

Phospho-p70S6K unter Zusatz von LY 294002 war positiv. Phospho-p70S6K unter Zusatz von PD 98059 und Rapamycin war fraglich positiv. Auswertung siehe Tabelle:

Phospho-Antikörper	PC12 differenziert			
	Kontrolle	PD98059	LY294009	Rapamycin
SAPK/JNK	neg.	neg.	neg.	neg.
p70S6K	+	(+)	++	(+)
p44/42	neg.	neg.	neg.	neg.
Akt	neg.	neg.	neg.	neg.

Tab. 5.2.12: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Serumentzug mit Signaltransduktionshemmstoffen von differenzierten PC12-Zellen: Phospho-SAPK/JNK, Phospho-p38, Phospho-p44/42 und Phospho-Akt

Die Western Blot-Analyse zur Expressionskontrollanalyse ergab für alle untersuchten nicht-phosphospezifischen Antikörper ein positives Ergebnis (s. Abb. 5.2.19).

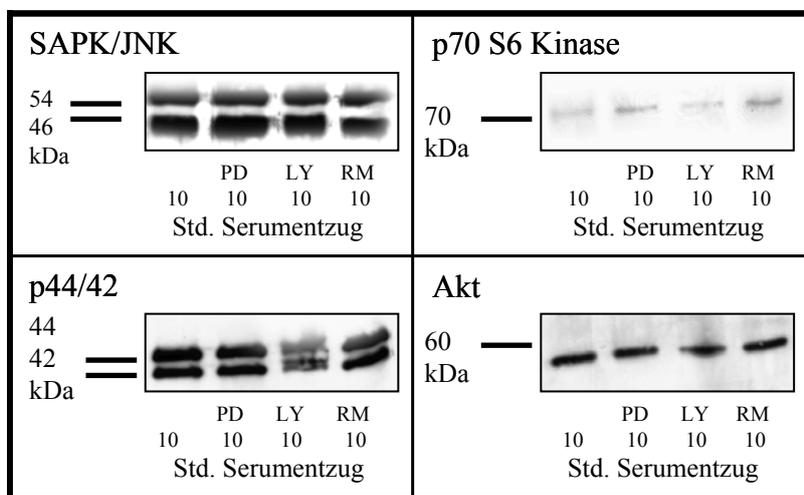


Abb. 5.2.19: WB-Analyse zur Expressionskontrollanalyse nach Serumentzug mit Signaltransduktionshemmstoffen von differenzierten PC12-Zellen

5.2.5.4 Western Blot-Analysen von differenzierten PC12-Zellen nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen

5.2.5.4.1 Stress-aktivierte Proteinkinase

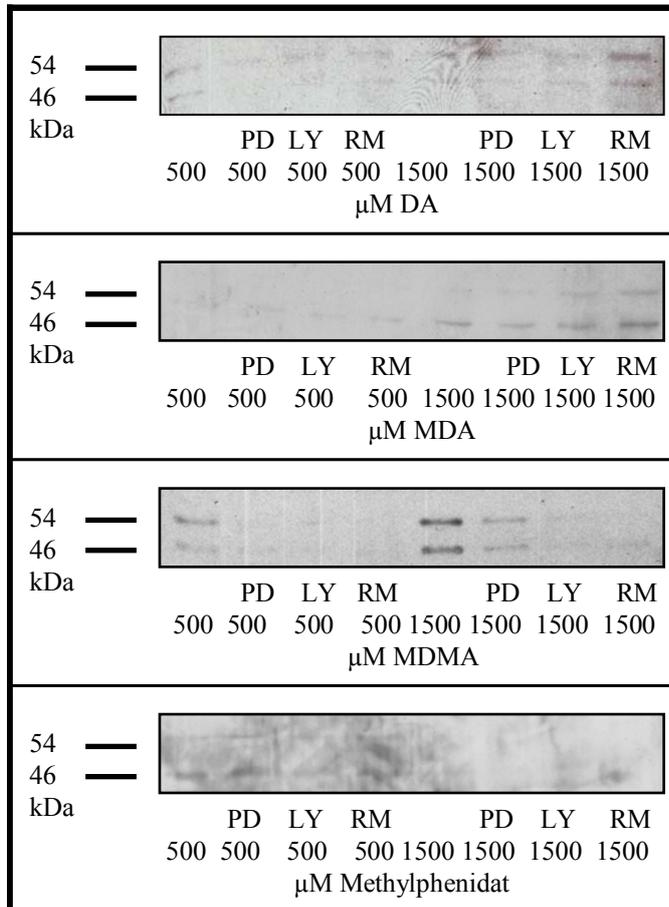


Abb. 5.2.20: WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von differenzierten PC12-Zellen: Phospho-SAPK/JNK

Phospho-SAPK/JNK konnte bei allen Hemmstoffen nach DA-Behandlung mit 500 und 1500 μM nachgewiesen werden, bei MDA-Behandlung nur in einer Konzentration von 1500 μM . Ein Nachweis nach MDMA-Behandlung gelang nur bei 1500 μM und Zusatz von PD 98059. Bei Methylphenidat konnte Phospho-SAPK/JNK unter Zusatz der untersuchten Hemmstoffe nicht nachgewiesen werden. Auswertung siehe Tabelle:

Phospho-SAPK/JNK	Amphetaminkonzentration: 500 μM				Amphetaminkonzentration: 1500 μM			
	Kontrolle	PD 98059	LY 294002	Rapamycin	Kontrolle	PD 98059	LY 294002	Rapamycin
DA	+	+	+	+	+	+	+	++
MDA	neg.	neg.	neg.	neg.	+	+	+	+
MDMA	+	neg.	neg.	neg.	++	+	neg.	neg.
Methylphenidat	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Tab. 5.2.13: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von differenzierten PC12-Zellen: Phospho-SAPK/JNK

Die Western Blot-Analyse zur Expressionskontrollanalyse ergab für alle untersuchten nicht-phosphospezifischen Antikörper ein positives Ergebnis (s. Abb. 5.2.21).

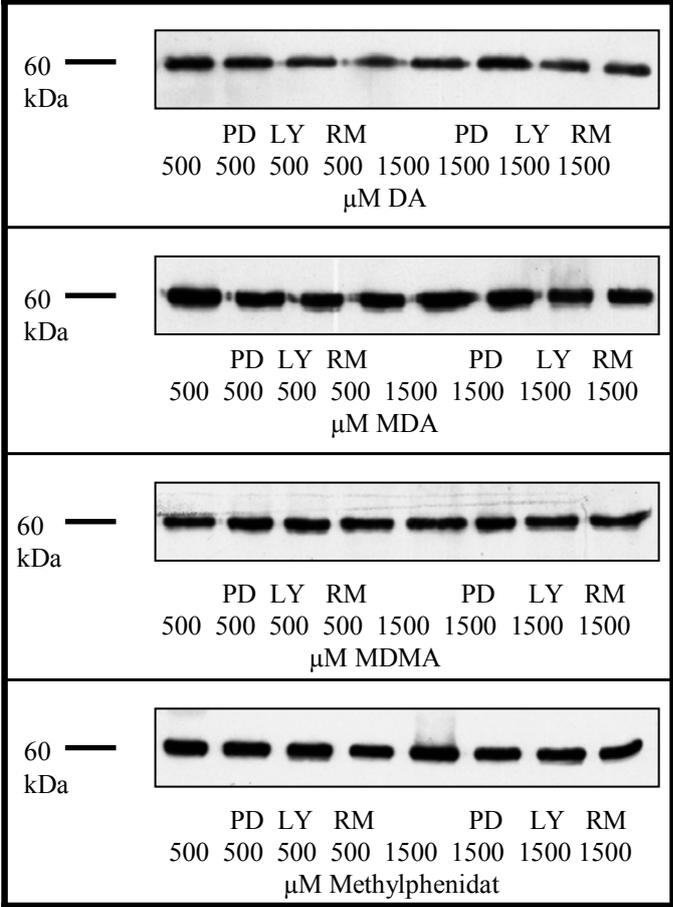


Abb. 5.2.21: WB-Analyse zur Expressionskontrollanalyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von differenzierten PC12-Zellen: SAPK/JNK

5.2.5.4.2 p70 S6 Kinase

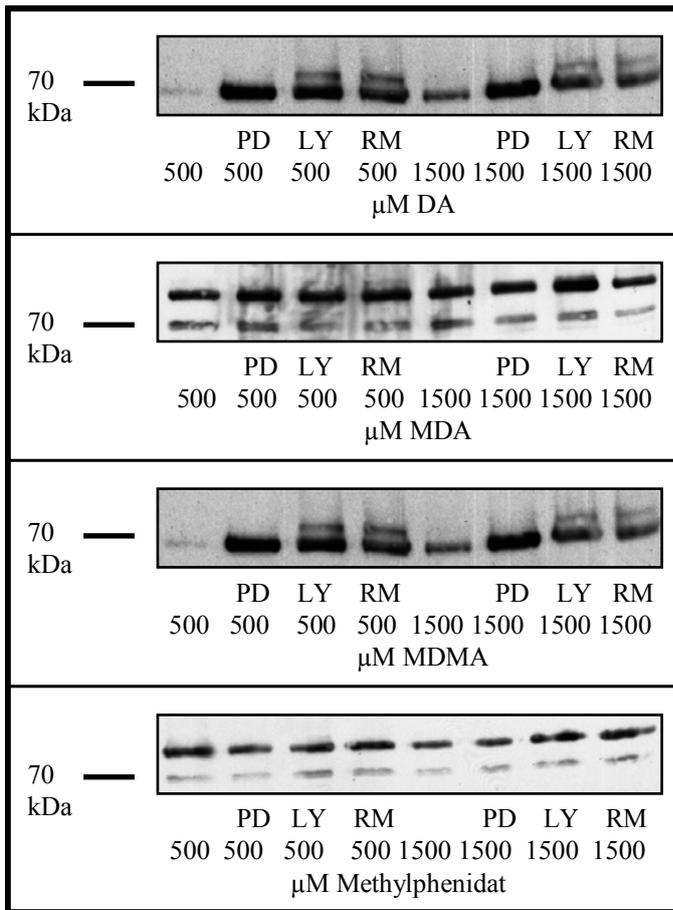


Abb. 5.2.22 WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von differenzierten PC12-Zellen: Phospho-p70 S6 Kinase

Positiv war der Nachweis von Phospho-p70 S6K sowohl bei Behandlung mit 500 μM, als auch bei 1500 μM DA, MDA und MDMA, bei allen drei in der Arbeit verwendeten Signaltransduktionshemmstoffen. Bei der Behandlung mit Methylphenidat war der Nachweis von Phospho-p70S6K ebenfalls positiv, wenn auch etwas schwächer. Auswertung siehe Tabelle:

Phospho-p70 S6 Kinase	Amphetaminkonzentration: 500 μM				Amphetaminkonzentration: 1500 μM			
	Kontrolle	PD 98059	LY 294002	Rapamycin	Kontrolle	PD 98059	LY 294002	Rapamycin
DA	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MDA	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MDMA	+	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
Methylphenidat	++	++	++	++	++	++	++	++

Tab. 5.2.14: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von differenzierten PC12-Zellen: Phospho-p70 S6 Kinase

Die Western Blot-Analyse zur Expressionskontrollanalyse ergab für alle untersuchten nicht-phosphospezifischen Antikörper ein positives Ergebnis (s. Abb. 5.2.23).

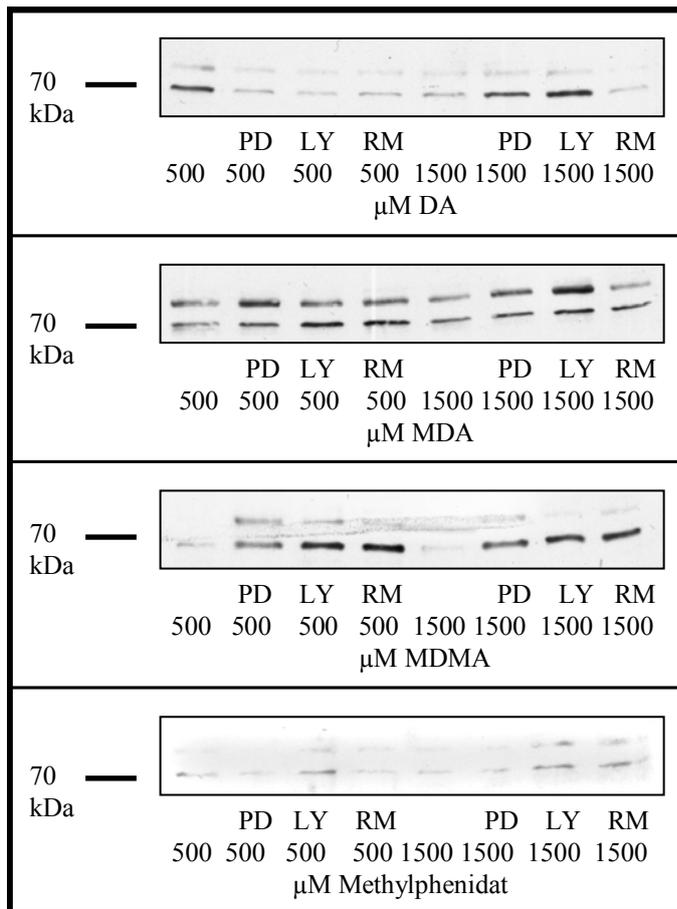


Abb. 5.2.23: WB-Analyse zur Expressionskontrollanalyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von differenzierten PC12-Zellen: p70 S6 Kinase

5.2.5.4.3 p44/42 mitogen-aktivierte Proteinkinase

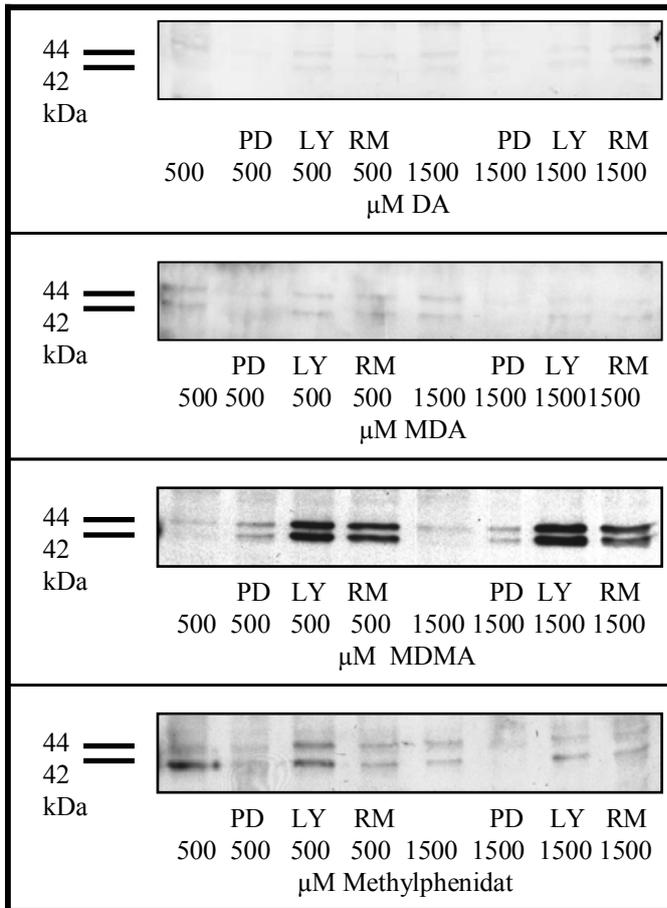


Abb. 5.2.24: WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von differenzierten PC12-Zellen: Phospho-p44/42

Schwach positiv war der Nachweis von Phospho-p44/42 MAPK im Western Blot nach 500 und 1500 μ M DA-, und MDA-Behandlung und Zusatz von LY 294002 und Rapamycin. Mit PD 98059 ließ sich Phospho-p44/42 bei diesen Amphetaminen nicht nachweisen. Unter MDMA- und Methylphenidatbehandlung war der Nachweis von Phospho-p44/42 bei beiden eingesetzten Konzentrationen und Zusatz von LY 294002 und Rapamycin stark positiv, unter Zusatz von PD 98059 zu 500 und 1500 μ M MDMA sowie zu 1500 μ M Methylphenidat schwach positiv. Kein Nachweis gelang bei einer Methylphenidatkonzentration von 500 μ M und Zusatz von PD 98059. Auswertung siehe Tabelle:

Phospho-p44/42	Amphetaminkonzentration: 500 μ M				Amphetaminkonzentration: 1500 μ M			
	Kontrolle	PD 98059	LY 294002	Rapa-mycin	Kontrolle	PD 98059	LY 294002	Rapa-mycin
DA	+	neg.	+	+	+	neg.	+	++
MDA	+	neg.	+	+	+	neg.	+	+
MDMA	+	+	+++	+++	+	+	+++	+++
Methylphenidat	++	neg.	+++	+++	+++	+	+++	+++

Tab. 5.2.14: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von differenzierten PC12-Zellen: Phospho-p44/42

Die Western Blot-Analyse zur Expressionskontrollanalyse ergab für alle untersuchten nicht-phosphospezifischen Antikörper ein positives Ergebnis (s. Abb. 5.2.25).

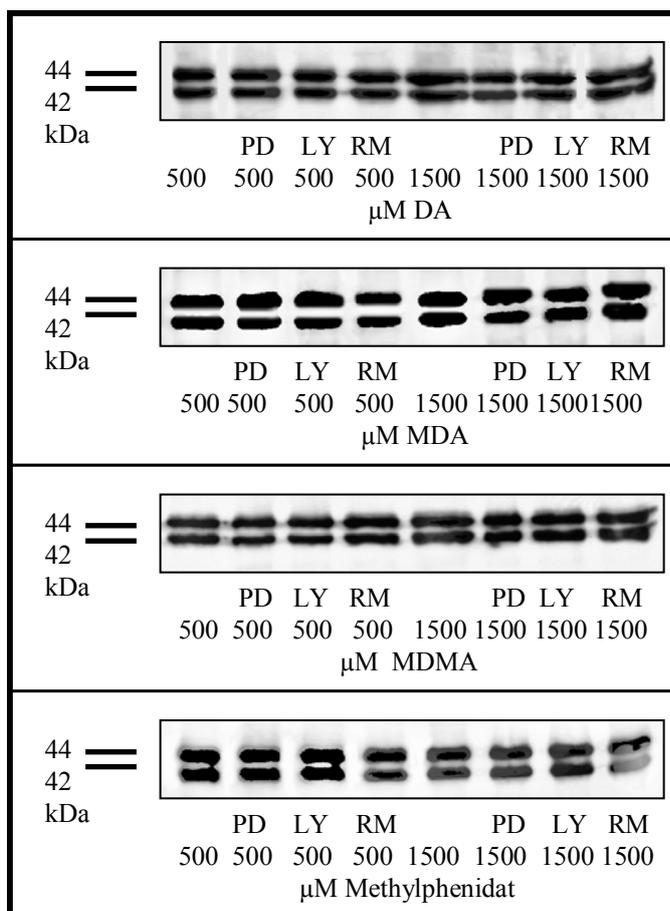


Abb. 5.2.25: WB-Analyse zur Expressionskontrollanalyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von differenzierten PC12-Zellen: p44/42

5.2.5.4.4 Akt

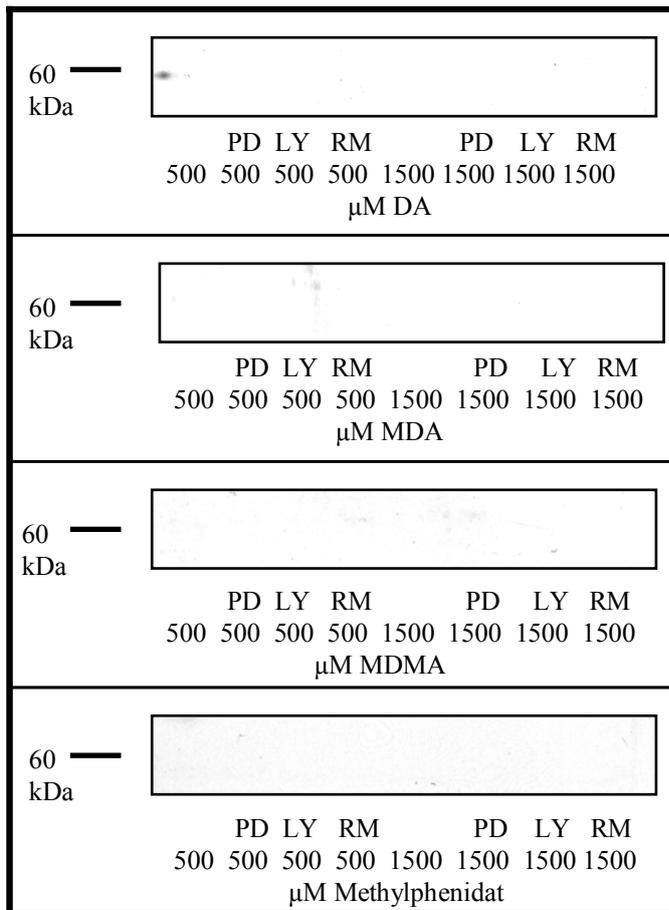


Abb. 5.2.26: WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von differenzierten PC12-Zellen: Phospho-Akt

Phospho-Akt konnte unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht nachgewiesen werden.

Auswertung siehe Tabelle:

Phospho-Akt	Amphetaminkonzentration: 500 μ M				Amphetaminkonzentration: 1500 μ M			
	Kontrolle	PD 98059	LY 294002	Rapamycin	Kontrolle	PD 98059	LY 294002	Rapamycin
DA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
MDA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
MDMA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Methylphenidat	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Tab. 5.2.15: Semiquantitative Auswertung der WB-Analyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von differenzierten PC12-Zellen: Phospho-Akt

Die Western Blot-Analyse zur Expressionskontrollanalyse ergab für alle untersuchten nicht-phosphospezifischen Antikörper ein positives Ergebnis (s. Abb. 5.2.27).

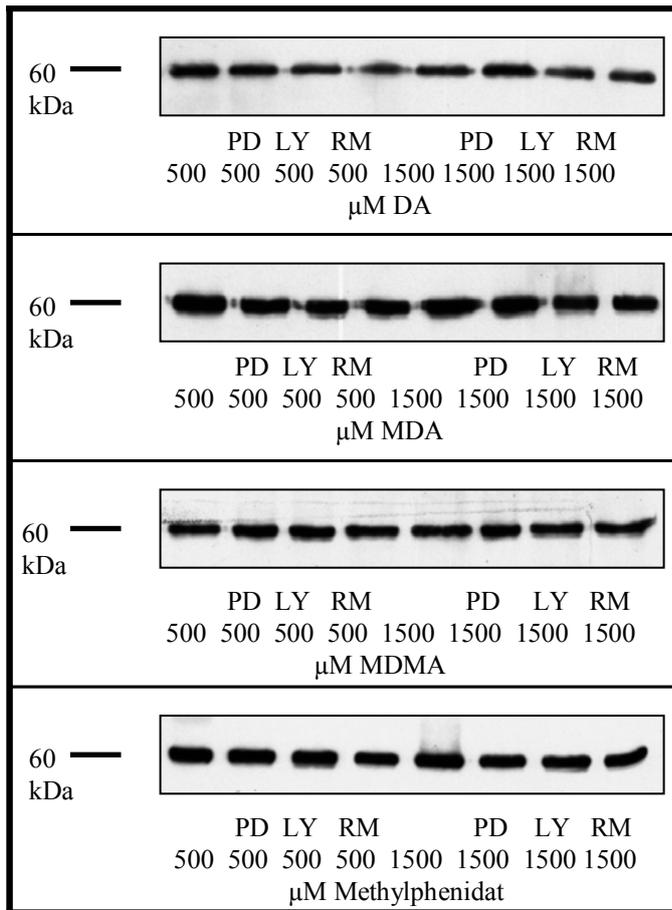


Abb. 5.2.27: WB-Analyse zur Expressionskontrollanalyse nach Amphetaminbehandlung mit Signaltransduktionshemmstoffen von differenzierten PC12-Zellen: Akt

6. Diskussion

Amphetamin und Amphetaminderivate unterliegen in Deutschland auf Grund ihres Missbrauchpotentials dem Betäubungsmittelgesetz. Trotzdem finden sie eine immer stärkere Verbreitung, sowohl als Partydroge (Thomasius und Kraus, 1999), als auch als Medikament zur Behandlung des ADHD (Schubert et al., 2001). Dabei ist deren neurotoxische Wirkung schon länger bekannt (Schmidt und Kehne, 1990). Unklar sind bislang noch die Mechanismen der Neurotoxizität. Mehrfach konnte jedoch schon gezeigt werden, dass es nach Amphetaminexposition zur Aktivierung intrazellulärer apoptotischer Signalwege kommt (Deng et al., 2002; Simantov und Tauber, 1997; Cadet et al., 1997; Cadet et al., 2003; Davidson et al., 2001). Ebenso konnte in der eigenen Forschergruppe gezeigt werden, dass es deutliche Unterschiede hinsichtlich des toxischen Potentials zwischen den verschiedenen Amphetaminderivaten gibt (Stumm et al., 1999). In der nun vorliegenden Arbeit sollten deshalb das DA, das MDMA sowie sein Metabolit MDA, als auch das zur Behandlung des ADHD eingesetzten Methylphenidat auf die Induktion apoptotischer Signalwege in differenzierten, als auch undifferenzierten PC12-Zellen untersucht werden.

6.1 Zusammenfassung der eigenen Ergebnisse

Dabei sollten im Einzelnen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Gibt es konzentrationsabhängige Unterschiede der untersuchten Amphetamine in ihrer zytotoxischen Wirkung?
2. Welche pro- bzw. antiapoptotischen intrazellulären Signalwege werden während der Amphetaminexposition aktiviert?
3. Welchen Einfluss hat die Hemmung der intrazellulären Signaltransduktion auf die zytotoxische Wirkung während der Amphetaminexposition?

ad 1.: Die Schädigung der PC12-Zellen durch verschiedene Amphetamine nahm mit steigender Konzentration zu. Deutliche Unterschiede zeigten sich jedoch zwischen den methylierten Amphetaminderivaten MDMA und Methylphenidat sowie den nicht-methylierten Amphetaminderivaten DA und MDA. Von den in der Arbeit verwendeten Amphetaminen hatte DA die stärkste toxische Wirkung, gefolgt von MDA und MDMA, wohingegen sich für Methylphenidat keine signifikante Zytotoxizität nachweisen ließ. Die Schädigung war bei den differenzierten Zellen etwas stärker ausgeprägt, als bei den undifferenzierten.

ad 2.: In undifferenzierten PC12-Zellen führten alle in der Arbeit untersuchten Amphetaminderivate zur Aktivierung der Caspase-3 und PARP. In differenzierten PC12-Zellen führten die stark toxischen Amphetamine DA und MDA zu einer ausgeprägten Aktivierung der Caspase-3, wohingegen die schwach toxischen Amphetaminderivate MDMA und Methylphenidat nur eine schwache Aktivierung aufwiesen. Auf Grund der Aktivierung der Caspase-3 und PARP ist als Form des Zelltodes eine Apoptose anzunehmen.

Alle untersuchten Amphetamine führten bei undifferenzierten PC12-Zellen ebenfalls zu einer deutlichen Aktivierung der SAPK/JNK, sowie zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung der p44/42 MAPK. Aktiviert wurde auch die p38 MAPK. Diese setzte unter Einfluss der stark toxischen Amphetamine DA und MDA früher ein, als unter MDMA und Methylphenidat. Ferner zeigte sich bei MDA- und MDMA-Behandlung eine vorübergehende Deaktivierung und anschließend wieder eine kurzzeitige Aktivierung von Akt. Nach DA- und Methylphenidatbehandlung blieb die vorübergehende Deaktivierung von Akt aus und es erfolgte eine baldige und endgültige Deaktivierung, die bei Methylphenidat früher einsetzte, als bei DA. Eine schwache Aktivierung von SAPK/JNK fand sich bei der Behandlung differenzierter PC12-Zellen mit DA, MDA und MDMA, nicht jedoch nach Methylphenidatbehandlung. Alle in der Arbeit untersuchten Amphetamine führten jedoch zu einer Aktivitätssteigerung der p44/42. Nicht nachgewiesen werden konnte in differenzierten PC12-Zellen eine Aktivierung der Signalwege p38, Akt und PARP.

ad 3.: Eine deutliche Steigerung der Zytotoxizität konnte durch Zusatz des MEK 1/2-Inhibitors PD 98059 bereits bei niedriger Amphetaminkonzentration beobachtet werden. Nach Hemmung der PI3K durch LY 294002 zeigte sich ebenfalls eine Zunahme der Toxizität. Diese trat allerdings erst in höhermolaren Amphetaminkonzentrationen auf. Nur bei Behandlung der undifferenzierten Zellen mit DA und MDA unter Zusatz von Rapamycin wurde der stark toxische Effekt der Amphetamine attenuiert. Dahingegen hatte Rapamycin bei den untersuchten methylierten Amphetaminen MDMA und Methylphenidat keinen signifikanten Einfluss auf die Zytotoxizität. Keine Rolle spielte der Zusatz von Rapamycin zu den differenzierten PC12-Zellen.

In den Western Blot-Analysen von undifferenzierten PC12-Zellen zeigte sich, dass durch PD 98059 die Aktivierung von p44/42 fast vollständig aufgehoben wird. Nur leicht abgeschwächt wurde die Aktivierung von Akt durch LY 294002 nach DA-Behandlung. Nach MDA-Behandlung wurde die Aktivierung komplett aufgehoben. Die leichte Aktivierung von Akt nach MDMA-Behandlung wurde von allen eingesetzten Hemmstoffen aufgehoben.

Rapamycin hemmte bei den stark toxischen Amphetaminen DA und MDA die Aktivierung von SAPK/JNK, nicht jedoch bei MDMA und Methylphenidat. Die anderen Hemmstoffe hatten erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Aktivierung von SAPK/JNK.

Keinen Einfluss auf die Aktivierung von SAPK/JNK zeigten die untersuchten Hemmstoffe bei den differenzierten PC12-Zellen. Die Aktivierung von p44/42 konnte dahingegen erwartungsgemäß durch PD 98059 gehemmt werden.

Rapamycin hatte weder bei den differenzierten, noch bei den undifferenzierten PC12-Zellen einen Einfluss auf die Aktivierung der p70 S6 Kinase.

6.2 Zellbiologische Untersuchungsmethoden zu Amphetaminwirkungen

Die toxische Wirkung der Amphetamine im Tiermodell (Burgess et al., 2000) und beim Menschen (Poethke-Müller, 1999; Kalant, 2001; Gouzoulis-Mayfrank et al., 2002) konnte mittlerweile nachgewiesen werden. Es gibt etliche Hinweise darauf, dass es dabei zum apoptotisch vermittelten Zelltod kommt (Deng et al., 2002; Simantov und Tauber, 1997; Stumm et al., 1999; Cadet et al., 1997; Cadet et al., 2003; Davidson et al., 2001). Noch nicht geklärt werden konnte die Frage, welche Signalwege in den Zelluntergang involviert sind. Hier bietet sich die Untersuchung in Zellkultursystemen an, da in einem Tierversuch diese Frage auf Grund der Heterogenität der Zellen nicht eindeutig zu beantworten gewesen wäre. Deshalb wurden in der nun vorliegenden Arbeit die Experimente in einem Zellkultursystem und an einer Zelllinie durchgeführt.

Verwendet wurden dazu ausschließlich PC12-Zellen. Sie stellen ein etabliertes Modell für *in vitro*-Untersuchungen dar. Durch ihre Fähigkeit zur Ausbildung von Neuriten nach Stimulation mit NGF, eignen sie sich auch als Modell für differenzierte neuronale Zellen.

Einmal ausdifferenzierte PC12-Zellen sind nicht mehr in der Lage, in den ursprünglichen nativen Zustand zurückzukehren. Wird ihnen NGF entzogen, unterliegen sie apoptotischen Prozessen (Xia et al., 1995). Aus diesem Grund wurden sämtliche Versuche mit differenzierten Zellen unter fortgesetzter NGF-Stimulation durchgeführt. Zu berücksichtigen war bei der Bewertung der Ergebnisse dabei jedoch die antiapoptotische Wirkung von NGF, die durch LY 294002 aufgehoben wird (Yao und Cooper, 1995).

Um Einflüsse der für das Zellwachstum notwendigen Seren auf die Western Blot-Analysen zu vermeiden, erfolgte die Proteinisolierung unter Serum-freien Bedingungen. Cadet und Ordonez (2000) konnten nachweisen, dass es bei *in vitro*-Untersuchungen mit MA, zu einer deutlichen Steigerung der Zytotoxizität unter Serumentzug bei zunehmender Amphetaminkonzentration kommt. Ebenso führt auch Serumentzug zur Aktivierung

apoptotischer Signalwege (Yao und Cooper, 1995). Aus diesem Grund, wurden im Vorversuch PC12-Zellen in Serum-freiem Medium kultiviert, und auf die Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege untersucht. Durch den Serumentzug bei gleichzeitiger Amphetaminbehandlung kann es deshalb allenfalls zu einer Verstärkung der intrazellulären Signalwege kommen, was sich v. a. im höhermolaren Bereich auswirkt (Cadet und Ordonez, 2000).

6.3 Amphetaminwirkung auf PC12-Zellen

Im Folgenden sollen die in der Zielsetzung genannten Fragestellungen genauer erläutert werden. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede im Verhalten differenzierter und undifferenzierter PC12-Zellen, weshalb diese jeweils getrennt diskutiert werden.

6.3.1 Undifferenzierte PC12-Zellen

In den Zytotoxizitätsassays konnte an undifferenzierten PC12-Zellen gezeigt werden, dass DA, gefolgt von MDA, das Amphetamin mit der stärksten toxischen Wirkung ist. MDMA erwies sich als wesentlich schwächer toxisch, als MDA, aber immer noch stärker als Methylphenidat. Damit konnten die Befunde von Stumm et al. aus der eigenen Forschungsgruppe bestätigt werden. Sie beobachteten ebenfalls, dass DA und sein Ringsubstituent MDA stärker toxisch waren, als die methylierten Amphetamine MA und MDMA (Stumm et al., 1999).

In undifferenzierten PC12-Zellen wurde die mit zellulärem Stress assoziierte MAPK SAPK/JNK durch die in der Arbeit verwendeten Amphetamine phosphoryliert und somit aktiviert. Cadet et al. (2003) beobachteten nach MA-Administration ebenfalls eine gesteigerte Expression von JNK-Protein in Mäusehirnen, und führten dies auf die Entstehung freier Radikale zurück. Diese Befunde stimmen auch mit den Ergebnissen in der eigenen Arbeitsgruppe von Stumm und Mitarbeitern (Stumm et al., 1999) überein. Sie untersuchten das Substrat von SAPK/JNK, den Transkriptionsfaktor c-jun. Dabei stellten sie fest, dass sowohl nach DA-, als auch nach MDA-Administration die c-jun-Transkription verlängert ist, wohingegen MA- und MDMA-Behandlung keinen signifikanten Einfluss darauf hat. In der vorliegenden Arbeit zeigten die verwendeten Hemmstoffe der intrazellulären Signalwege erwartungsgemäß keinen Einfluss auf diesen Signalweg.

Ebenfalls aktiviert wurde in undifferenzierten PC12-Zellen der p38-Signalweg. Dieser wird durch die MKK3 aktiviert, und stellt ebenfalls eine zelluläre Antwort auf apoptotische Reize dar (Xia et al., 1995). Auch hier zeigte sich wieder die schwach toxische Potenz von

Methylphenidat, das im Gegensatz zu DA, MDA und MDMA, zu einer verzögerten Phosphorylierung führte.

Das hohe zytotoxische Potential von DA zeigte sich auch in der frühen Aktivierung des Apoptosemarkers Caspase-3. Diese setzte bei der Behandlung mit DA früher ein, als bei den anderen Amphetaminderivaten. Oliveira und Mitarbeiter (Oliveira et al., 2003) beobachteten ebenfalls eine Aktivierung der Caspase-3 nach Amphetaminbehandlung von PC12-Zellen.

Die nur während einer intermediären Phase der Apoptose aktivierte PARP (Decker und Muller, 2002) war ebenfalls in undifferenzierten PC12-Zellen nachweisbar. In replizierenden Zellen führt eine begrenzte DNA-Schädigung zur Aktivierung von PARP. Dadurch können Proteine für die Genomreparatur aktiviert werden. Weshalb die Zellen nach genotoxischem Stress zwischen DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest oder Apoptose wechseln, wird noch nicht ganz verstanden. Als eine Folge der Einmündung in die Apoptose, wird PARP von Caspasen gespalten und somit inaktiviert. Dadurch könnte eine möglicherweise zwecklose DNA-Reparatur verhindert werden (Amé et al., 2004).

Im Zytotoxizitätsassay zeigte sich bei simultaner Behandlung mit LY294002 bei steigender Konzentration aller untersuchten Amphetamine eine massive Zunahme der Toxizität im Vergleich zur Kontrolle ohne Hemmstoffe. Akt kann das Überleben von Zellen unterstützen, in dem es apoptosevermittelnde Proteine hemmt (Lawlor und Alessi, 2001). Andererseits wird Akt bei verschiedensten Formen des Zelltodes deaktiviert (Luo et al.; 2003). Es zeigte sich, dass Akt bereits nach Serumentzug aktiviert war. Nach der Behandlung mit dem stark toxischen DA blieb es über vier Stunden aktiviert. Nach MDA- und MDMA-Behandlung wurde es zunächst deaktiviert, nach vier Stunden vorübergehend wieder aktiviert und anschließend wieder deaktiviert. Das wenig toxische Methylphenidat führte zur schnellen Deaktivierung von Akt. Die Deaktivierung ist sowohl mit Caspase-unabhängigem, als auch mit Caspase-abhängigem Zelltod assoziiert (Luo et al., 2003). Die endgültige Deaktivierung nach DA-, MDA- und MDMA-Behandlung steht im zeitlichen Zusammenhang mit der Spaltung und Aktivierung der Caspase-3. Diese wiederum spaltet und deaktiviert Akt (Cross et al., 2000). Deshalb ist davon auszugehen, dass die Deaktivierung in diesem Fall durch die Caspase-3 erfolgt und der apoptotische Prozess nicht mehr aufgehalten werden kann. Unklar bleibt letztlich, weshalb Akt nach MDA- und MDMA-Behandlung vorübergehend deaktiviert wird und nach Methylphenidatbehandlung die Deaktivierung sofort endgültig erfolgt. Jayanthi und Mitarbeiter (Jayanthi et al., 2004) konnten zeigen, dass nach MA-Behandlung von Mäusen der apoptotische Prozess in neuronalen Zellen durch Interaktion zwischen ER- und Mitochondrien-abhängigen Signalwegen induziert wird, die als gemeinsame Endstrecke die

Aktivierung der Caspasen 6 und 3 haben. ER-Stress führt dabei sowohl zur Aktivierung von Akt, als auch von ERK 1/2 in verschiedenen Zelltypen (Hu et al., 2004). Zwischenzeitlich konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass die durch DA induzierte Apoptose mitochondrial vermittelt wird (Krasnova et al., 2005). Dahingegen kommt es in der vorliegenden Arbeit vermutlich frühzeitig nach DA-Exposition zu ER-Stress, wohingegen es nach MDA- und MDMA-Exposition erst nach einer zeitlichen Verzögerung und nach Methylphenidatbehandlung überhaupt nicht, oder zumindest nicht im erfassten Zeitfenster, zu ER-Stress kommt. Dafür spricht auch die schwache Aktivitätssteigerung von p44/42 nach Methylphenidatexposition.

Die Aktivitätszunahme der Phospho-p44/42 MAPK könnte auch durch den Serumentzug vor der Proteinisolierung gefördert worden sein. Cross und Mitarbeiter (Cross et al., 2000) konnten zeigen, dass der Entzug von Wachstumsfaktoren die p44/42 MAPK aktiviert, was zur Apoptosehemmung führt. Bei der Proteinisolierung unter Serum-freien Milieubedingungen werden ebenfalls Wachstumsfaktoren entzogen und es kommt in Folge dessen zur Aktivierung der p44/42 MAPK, wodurch apoptotische Prozesse inhibiert werden. In ihrer Übersichtsarbeit berichten Cross et al. weiter (Cross et al., 2000), dass das nur eine zweitrangige Wirkung dieses Signalweges ist. Dennoch könnte sich dieser Effekt, unter den in der Arbeit gegebenen Versuchsbedingungen, zusätzlich auf eine verstärkte Aktivierung ausgewirkt haben. Andererseits wird die p44/42 auch während der Zellproliferation aktiviert. In den Western Blot-Analysen ließ sich die Aktivierung der p44/42 MAPK durch PD 98059 ebenfalls komplett oder zumindest teilweise unterdrücken. Die signifikante Abnahme der überlebenden Zellen nach Hemmung der MEK 1/2 durch PD 98059 setzt sich somit zum einen aus der Proliferationshemmung und zum anderen aus der Hemmung antiapoptotischer Signalwege zusammen.

Rapamycin hemmt durch indirekte Deaktivierung der p70 S6K Zellwachstum und Proliferation. Ein weiterer übergeordneter Aktivator der p70 S6K ist die PI3K (Duronio et al., 1998). Weder LY 294002 noch Rapamycin hatte einen Einfluss auf die Aktivität der p70 S6K, was zeigt, dass sie nicht für das Überleben nach Amphetaminexposition benötigt wird und es noch weitere Aktivatoren für die p70 S6K in PC12-Zellen gibt.

In den Zytotoxizitätsassays hatte Rapamycin einen protektiven Effekt auf native PC12-Zellen. Die Schädigung war deutlich geringer als bei den Versuchsansätzen ohne Rapamycin. In weiteren Versuchen müsste nun geklärt werden, ob es sich dabei um ein Grundlegendes Prinzip handelt, oder ob diese Wirkung durch den Serumentzug vor der Proteinisolierung zu Stande kommt.

6.3.2 Differenzierte PC12-Zellen

DA und MDA sind bei differenzierten Zellen in etwa gleich stark toxisch. Bei weitem schwächer toxisch ist MDMA, wohingegen Methylphenidat so gut wie nicht toxisch ist. Diese Ergebnisse stimmen auch mit den Befunden von Stumm et al. überein (Stumm et al., 1999).

Die Differenzierung von PC12-Zellen durch NGF wird von einer kurzzeitigen JNK-Aktivierung begleitet (Xiao und Liu, 2003). Auf der anderen Seite wird die Aktivierung von JNK mit zellulärem Stress in Verbindung gebracht. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nun, dass sowohl die nicht-methylierten Amphetamine DA und MDA, als auch das methylierte Amphetamin MDMA zu einer anhaltenden Aktivierung von SAPK/JNK führten. Das kaum toxische Methylphenidat führte dahingegen nicht zur Aktivierung von JNK.

DA führte auch in differenzierten PC12-Zellen zu einer frühzeitigen Aktivierung der Caspase-3. Nach MDA- und MDMA-Behandlung setzt die Aktivierung deutlich später ein. Methylphenidat ist kein Aktivator der Caspase-3 in differenzierten PC12-Zellen.

Nicht aktiviert wurde PARP. Amé und Koautoren (Amé et al., 2004) berichten, dass nach vollständiger DNA-Schädigung in postmitotischen Zellen, wie sie durch ROS beispielsweise nach einer Ischämie auftreten kann, PARP aktiviert wird. Die Schädigung nach Amphetaminexposition wird vermutlich ebenfalls durch ROS verursacht. Weshalb PARP in der vorliegenden Arbeit nicht aktiviert wurde bleibt letztlich unklar. Denkbar wäre, dass die DNA-Schädigung nicht ausgeprägt genug war, oder dass PARP in postmitotischen differenzierten PC12-Zellen nicht exprimiert wird, was in weiterführenden Experimenten geklärt werden müsste.

In differenzierten PC12-Zellen zeigte sich nach Amphetaminbehandlung eine Aktivitätssteigerung der p44/42. Diese setzte nach Methylphenidatexposition wesentlich später ein und fällt deutlich schwächer aus, als nach Behandlung der Zellen mit den anderen untersuchten Amphetaminen. Möglicherweise spielt dabei die von Cross und Mitarbeitern (Cross et al., 2000) diskutierte Apoptosehemmung durch Aktivitätssteigerung der p44/42 eine Rolle. Das dürfte auch der Grund für die massive Zunahme der Zytotoxizität der untersuchten Amphetamine bei simultaner Behandlung mit PD 98059 sein.

Nach NGF-Stimulation wird Akt in PC12-Zellen aktiviert (Klesse und Parada, 1999). Wie oben bereits erwähnt deaktivieren Stressoren Akt und heben dadurch dessen protektive Wirkung auf. Die Deaktivierung wird sowohl mit Caspase-abhängigem, als auch Caspase-unabhängigem Zelltod in Verbindung gebracht (Luo et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass es nach Serumentzug schnell zu einer Deaktivierung von Akt kommt. Offensichtlich werden durch den Serumentzug bedingten Wachstumsfaktorenentzug

bereits apoptotische Signalwege aktiviert, die zur Deaktivierung von Akt führen. Eine toxisitätssteigernde Wirkung im Zytotoxizitätsassay zeigte die simultane Behandlung der Zellen mit dem spezifischen Hemmstoff der PI3K LY 294002. Da die Behandlung der Zellen in dieser Versuchsreihe mit Serumzusatz erfolgte, und darunter die Aktivierung der Akt erhalten blieb, kam es dort zur Hemmung apoptotischer Signalwege. Nach Zusatz von LY 294002 wurde dieser protektive Effekt aufgehoben was zur Toxizitätssteigerung der untersuchten Amphetamine führte.

Auch in differenzierten PC12-Zellen hatte keiner der untersuchten Hemmstoffe einen Einfluss auf die Aktivierung der p70 S6K, was zeigt, dass sie auch hier für das Überleben eher eine untergeordnete Rolle spielen.

6.4 Mechanismus der Neurotoxizität von Amphetaminen

In zahlreichen *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen konnte mittlerweile gezeigt werden, dass Amphetamine eine neurotoxische Wirkung besitzen. Die meisten Arbeiten wurden bisher über die als Partydroge weit verbreitete Substanz MDMA (*Ecstasy*) publiziert. Mitte der achtziger Jahre konnte zum ersten Mal beobachtet werden, dass MDA serotonerge Nervenendigungen zerstört (Ricaurte et al., 1985). MDMA und DA sind ebenfalls neurotoxische Substanzen, wobei MDMA hauptsächlich serotonerge Neuronen schädigt (McKenna und Peroutka, 1990), DA dahingegen hauptsächlich dopaminerge (Schmidt und Kehne, 1990). Für Methylphenidat ließ sich bisher noch keine Neurotoxizität nachweisen (Yuan et al., 1997).

Die neurotoxische Wirkung der Amphetamine beruht vermutlich auf der Entstehung freier Radikale (Lin et al., 1999; Shankaran et al., 1999 [a]). Neben den Sauerstoffradikalen (ROS) spielen vermutlich noch Stickstoffradikale (RNS) eine Rolle bei der Vermittlung der toxischen Wirkung der Amphetamine (Kuhn und Geddes, 2000). Die Entstehung freier Radikale, einschließlich O^{2-} , OH^{\cdot} , H_2O_2 und NOO^{\cdot} scheint ein generelles Prinzip für den Untergang neuronaler Zellen zu sein, da sie ebenfalls in Modellen für die Entstehung der Parkinsonkrankheit und der zerebralen Ischämie nachgewiesen werden konnten (Cadet et al., 2003).

Einige wichtige neuronale Proteine wurden als Ziele sowohl für die kurzzeitige, als auch für die langfristige Wirkung der Amphetamine identifiziert. Zu ihnen gehören sowohl die Enzyme Tyrosinhydroxylase und TPH, die die Biosynthese von Dopamin bzw. Serotonin katalysieren, als auch die Serotonin- bzw. Dopamintransporter, die die Transmitter aus dem synaptischen Spalt wieder in die präsynaptische Nervenendigung zurückbefördern. Veränderungen an diesen Proteinen haben sowohl Auswirkung auf Verhaltens-, als auch auf physiologische Prozesse, die durch Serotonin und Dopamin vermittelt werden. Auffällig ist,

dass einige ROS und RNS, die mit der toxischen Wirkung von Amphetaminen in Verbindung gebracht werden, ebenfalls die Wirkung der TPH, sowie des Serotonin- und Dopamintransporters vermindern können (Kuhn und Geddes, 2000).

In Übereinstimmung mit Stumm et al. (1999) konnte in der nun vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die methylierten Amphetamine weniger toxisch sind, als die nicht-methylierten.

Tabelle 6.1 gibt einen Überblick über die Zytotoxizität der untersuchten Amphetamine:

PC12-Zellen	zytotoxischer Effekt
undifferenziert	DA>MDA>>MDMA>Methylphenidat
differenziert	DA≈MDA>>MDMA>Methylphenidat

Tab. 6.1 Zytotoxischer Effekt der in der Arbeit untersuchten Amphetamine

Obwohl der genaue Mechanismus für die neurotoxische Wirkung der Amphetamine noch nicht geklärt ist, konnte mittlerweile gezeigt werden, dass der Zelltod apoptotisch vermittelt wird. Simantov und Tauber (1997) konnten in ihrer Arbeit an zwei unterschiedlichen Zelllinien zeigen, dass der apoptotisch induzierte Zelltod nach MDMA-Behandlung zeit- und dosisabhängig ist. Das konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Des Weiteren konnte hier gezeigt werden, dass unterschiedliche Phänotypen ein und derselben Zelllinie unterschiedlich sensibel auf verschiedene Amphetaminderivate reagieren. In einer anderen Arbeit von Stumm und Mitarbeitern (Stumm et al., 1999) wurden verschiedene pro- und antiapoptotische Transkriptionsfaktoren nach Amphetaminbehandlung an neokortikalen Rattenneuronen untersucht. Dabei zeigte sich nach Behandlung mit den methylierten Amphetaminen MDMA und MA keine Hochregulierung des mit zellulärem Stress assoziierten Transkriptionsfaktors c-jun. Die Behandlung mit DA und MDA führte dahingegen zu einer verlängerten Induktion der c-jun Transkription. Im Gegensatz dazu konnte nun gezeigt werden, dass in PC12-Zellen die methylierten Amphetamine ebenfalls zu einer Phosphorylierung und somit zu einer Aktivierung von JNK führen. Das gering toxische Methylphenidat bewirkte jedoch nur in nativen PC12-Zellen eine schwache Aktivierung. Ebenso konnte gezeigt werden, dass in nativen PC12-Zellen eine starke Aktivierung erfolgt, als in differenzierten. Cadet et. al (2003) konnten ebenfalls eine Aktivierung von JNK in Mäusehirnen nach MA-Behandlung nachweisen. Die Aktivierung apoptotischer Signalwege ist somit nicht nur zeit- und dosisabhängig. Es besteht ebenfalls ein Zusammenhang zwischen den eingesetzten Amphetaminen und den untersuchten Zelltypen.

Interessanterweise zeigte sich ebenfalls nur in den undifferenzierten PC12-Zellen eine Aktivierung der p38 MAPK. Das zeigt, dass durch die Differenzierung von PC12-Zellen

einzelne Signalwege ausgeschaltet werden. Die p38 MAPK wird ebenso wie die SAPK/JNK durch apoptotische Stimuli aktiviert (Xia et al., 1995). Darüber hinaus führt aber auch die Produktion von Zytokinen in Monozyten, sowie, in verschiedenen Zelltypen, die Proliferation zur Aktivierung dieses Signalweges. Es wird vermutet, dass die Involvierung der p38 MAPK in apoptotische Vorgänge vom Zelltyp und vom apoptotischen Stimulus abhängt, und dass sie in die zelluläre Antwort auf Überleben bzw. Zelluntergang integriert ist (Widmann et al., 1999). Da die Aktivierung in der vorliegenden Arbeit in zeitlichem Zusammenhang mit der Amphetaminbehandlung erfolgte, und diese bei DA-Administration früher einsetzte, als bei den anderen, weniger toxischen Amphetaminen, ist in diesem Fall davon auszugehen, dass ihre Aktivierung mit der Induktion apoptotischer Prozesse in Zusammenhang steht.

Von Deng et al. (2001) konnte in einem *in vivo*-Experiment die Spaltung und folglich die Aktivierung der proapoptotischen Caspasen 3 und 9 und der PARP sowie DFF45 nach MA-Behandlung nachgewiesen werden. Sie benutzten dazu nicht-dopaminerge striatale Rattenzellen und konnten somit beweisen, dass es eine von Dopamin unabhängige Schädigung neuronaler Zellen durch MA gibt, die durch Freisetzung von Zytocrom C aus den Mitochondrien induziert wird. Ebenfalls eine Aktivierung der Caspase-3 und Freisetzung von Zytocrom C nach Amphetaminexposition konnten Oliveira und Mitarbeiter (Oliveira et al., 2003) an PC12-Zellen beobachten. Die Aktivierung der Caspase-3 nach Amphetaminbehandlung zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit. Das stark toxische DA führte dabei früher zu einer Aktivierung als die anderen untersuchten Amphetamine. Interessanterweise zeigte sich in der nun vorliegenden Arbeit eine Spaltung der Caspase-3 in undifferenzierten PC12-Zellen auch nach Methylphenidatbehandlung, für das bisher keine Toxizität an dopaminergen Neuronen nachgewiesen werden konnte (Yuan et al., 1997).

PARP wird in einer intermediären Phase des apoptotischen Prozesses aktiviert und durch Caspase-3 und -7 wieder inaktiviert (Decker und Muller, 2002). Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DNA-Strangbrüchen bei replizierenden Zellen (Amé et al., 2004). Der vorübergehende Nachweis der aktivierten Form, nach Behandlung mit allen vier Amphetaminderivaten bei den nativen PC12-Zellen, deutet daraufhin, dass es hier ebenfalls zu DNA-Strangbrüchen kam, und dass in geschädigten Zellen ein Reparaturversuch unternommen wurde.

Neu konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass es nach Amphetaminadministration auch zu einer Aktivierung der mit mitotischen Prozessen assoziierten p44/42 MAPK kommt. Andere Autoren berichten ebenfalls von einer verstärkten ERK1/2-Expimierung durch eine Vielzahl

von Stimuli, wie Hypoxie, Wachstumsfaktorenentzug, H₂O₂ und Chemotherapeutika, und bringen dies mit der Hemmung apoptotischer Prozesse in Zusammenhang. Die Apoptosehemmung von p44/42 ist jedoch nur zweitrangig, zu ihrer Rolle bei der Proliferation (Cross et al., 2000).

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen konnte eine Aktivierung von Akt bei differenzierten PC12-Zellen nicht nachgewiesen werden. Sie wurde bereits nach kurzer Zeit unter Serum-freien Bedingungen deaktiviert, was zeigt, dass durch den Wachstumsfaktorenentzug bereits apoptotische Signalwege aktiviert werden, wodurch Akt deaktiviert wird. Dahingegen blieb die Aktivierung von Akt bei undifferenzierten PC12-Zellen über einen längeren Zeitraum nachweisbar. Die Deaktivierung nach DA-, MDA- und MDMA-Behandlung tritt zeitgleich mit der Aktivierung der Caspase-3 auf, weshalb davon auszugehen ist, dass sie durch diese deaktiviert wird und der apoptotische Prozess an dieser Stelle nicht mehr aufgehalten werden kann.

Gegensätzlich Ergebnisse zeigten sich gegenüber der Arbeit von Yao und Cooper. Sie berichteten von einer Hemmung der p70 S6 Kinase durch Rapamycin und den spezifischen Inhibitor der PI3K LY294002 in PC12-Zellen (Yao und Cooper, 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass in differenzierten PC12-Zellen, bei gleichzeitiger Amphetaminbehandlung, LY 294002 keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der p70 S6 Kinase hatte, ebenso wie der spezifische Hemmstoff der MEK 1/2, PD 98059, und der spezifische Hemmstoff von mTOR, Rapamycin.

7. Zusammenfassung/Abstract

Amphetamine haben sowohl wegen ihres hohen Missbrauchspotentials, als auch wegen ihres Einsatzes bei der Behandlung des Aufmerksamkeitsdefizitsyndroms in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. D-Amphetamin (DA), Methylenedioxyamphetamin (MDA), Methylenedioxymethamphetamin (MDMA) sowie Methylphenidat wurden in der Arbeit untersucht. DA wird als Dopingmittel eingesetzt, kann aber auch als Reservemedikament zur Behandlung des Aufmerksamkeitsdefizitsyndroms eingesetzt werden, wenn Methylphenidat nicht anspricht. Der Wirkstoff MDMA ist als Partydroge weit verbreitet und wurde unter dem Namen *Ecstasy* bekannt. MDA ist ebenfalls ein Bestandteil von *Ecstasy*-Pillen, als auch ein Abbauprodukt von MDMA. Seit längerem ist bekannt, dass Amphetamine neurotoxisch sind und dass der Zelltod apoptotisch vermittelt wird.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob es konzentrationsabhängige Unterschiede der Amphetamine in ihrer zytotoxischen Wirkung gibt, welche pro- bzw. antiapoptotischen intrazellulären Signalwege dabei aktiviert werden und welchen Einfluss die Hemmung der intrazellulären Signaltransduktion mit den spezifischen Hemmstoffen PD 98059, LY 294002 und Rapamycin auf die zytotoxische Wirkung der Amphetamine hat.

Die zytotoxische Wirkung der untersuchten Amphetamine unterscheidet sich zum Teil erheblich. Die nicht-methylierten Amphetamine DA und MDA sind deutlich stärker toxisch als die methylierten Amphetamine MDMA und Methylphenidat. Die Schädigung nimmt mit steigender Konzentration zu, wobei differenzierte PC12-Zellen empfindlicher als native PC12-Zellen reagieren.

Die untersuchten Amphetamine induzieren Apoptose. Es konnte eine Aktivierung der Caspase-3 nachgewiesen werden, wohingegen nur bei undifferenzierten PC12-Zellen eine Aktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) zu beobachten war.

Die Aktivierung der mit zellulärem Stress assoziierten c-Jun NH₂-Terminale Kinase (JNK) konnte bei beiden Phänotypen nachgewiesen werden, der proapoptotische Signalweg p38 MAPK wurde nur bei den undifferenzierten PC12-Zellen aktiviert. Insgesamt gesehen zeigt sich, dass DA der stärkste Stimulus für die Aktivierung proapoptotischer Signalwege ist, Methylphenidat dagegen nur ein schwacher. Die beiden anderen untersuchten Amphetaminderivate MDA und MDMA lagen in ihrer Wirkung zwischen DA und Methylphenidat. Diese Daten korrelieren sehr gut mit der neurotoxischen Wirkung.

Interessanterweise konnte bei allen untersuchten Amphetaminen auch eine deutliche Aktivierung des mit Proliferation und Differenzierung assoziierten p44/42 MAPK-

Signalweges nachgewiesen werden. Die Proteinkinase B (PKB) zeigte bei undifferenzierten PC12-Zellen eine konstitutive Aktivierung. Die Deaktivierung steht in zeitlichem Zusammenhang mit der Aktivierung der Caspase-3 und zeigt die nicht mehr umkehrbare Einmündung in den apoptotischen Zelltod an.

Nach Hemmung des p44/42 MAPK-Signalweges durch PD 98059 als auch der Proteinkinase B (PKB) durch LY 294002 verstärkte sich die Toxizität der Amphetamine sowohl in differenzierten, als auch in nativen PC12-Zellen. In den Western Blot-Analysen zeigte sich ebenfalls eine Hemmung der Aktivierung von phospho-p44/42 MAPK durch PD 98059. Eine Hemmung der Aktivierung von phospho-Akt in undifferenzierten PC12-Zellen zeigte sich nach Vorbehandlung mit LY 294002.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Amphetamine zytotoxisch wirken. Die Toxizität wird über eine konzentrationsabhängige Aktivierung intrazellulärer proapoptotischer Signalwege vermittelt, wobei sich die toxische Wirkung der Amphetaminderivate jedoch erheblich unterscheidet.

Unter diesen Gesichtspunkten stellt der Amphetaminkonsum ein erhebliches neurologisches Risiko dar. Auch wenn sich keine signifikante akute toxische Wirkung in der Arbeit nachweisen ließ, führte Methylphenidat dennoch zu einer Aktivierung intrazellulärer proapoptotischer Signalwege, so dass die Verordnung zur Behandlung des Aufmerksamkeitsdefizitsyndroms auch unter diesem Aspekt nur unter strenger Indikationsstellung erfolgen sollte.

During the last years amphetamines gained more attention due to their high potential as drugs of abuse and for the treatment of the attention deficit-syndrome. In this study D-amphetamine (DA), methylenedioxyamphetamine (MDA), methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and methylphenidate were investigated. DA is often used as a doping substance, the active substance MDMA is widely applied as a recreational drug and became popular under the name *Ecstasy*, and MDA is both an ingredient of *Ecstasy*-pills and a metabolite of MDMA. It is well known that amphetamines are neurotoxic and induce cell death by apoptosis.

In the present study the following questions were addressed: i) are the cytotoxic effects of the amphetamine-derivates concentration-dependent, ii) which pro- and antiapoptotic intracellular signalling pathways are involved and iii) what is the influence of the inhibition of intracellular signal-transduction pathways on cytotoxic effects.

The cytotoxic effect differed in part considerably among the amphetamines. The non-methylated derivates DA and MDA were more toxic than the methylated amphetamines

MDMA and methylphenidate. Cell death occurred in a concentration-dependent manner and differentiated PC12-cells were more sensitive than proliferative PC12-cells.

The cell death occurred by apoptosis. Activation of caspase-3 could be detected and the activation of the poly-(ADP-ribose)-polymerase (PARP) was present in undifferentiated PC12-cells. In addition, activation of c-Jun NH₂-terminale kinase (JNK) could be detected and activation of the proapoptotic signalling pathway p38 was observed in undifferentiated PC12-cells.

In conclusion, DA showed the most prominent effects and methylphenidate was a weak stimulus for the activation of proapoptotic intracellular signalling pathways. The effects of MDA and MDMA were in between the effects of DA and methylphenidate. These data correlate with the neurotoxic effect.

Interestingly in all amphetamines a significant activation of the p44/42 MAPK-signalling pathway, usually associated with proliferation and differentiation, could be observed. The Proteinkinase B (PKB) was constitutively activated in undifferentiated PC12-cells. The deactivation occurred in association with the activation of caspase-3 and showed the irreversible activation of apoptotic cell-death.

Inhibiting the p44/42 MAPK-signalling pathway by PD 98059 and PKB by LY 294002 intensified the toxicity of the amphetamines both in differentiated and native PC12-cells. These data were corroborated by Western blot analysis.

In conclusion, it could be shown that amphetamines are cytotoxic. Toxicity is transduced by a concentration-dependent activation of intracellular proapoptotic signalling-pathways whereas the toxic effects of the amphetamine-derivates differ markedly.

These data underscore the extreme neurological risk of amphetamine abuse. Although there is no proof of significant acute toxic effect of methylphenidate in this work, it led to an activation of intracellular proapoptotic signalling pathways.

8. Literaturverzeichnis

- Agell, N., O. Bachs, N. Rocamora, P. Villalonga (2002). "Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca^{2+} , and calmodulin." Cell Signal **14**(8): 649-54.
- Alessi, D. R., A. Cuenda, P. Cohen, D. T. Dudley, A. R. Saltiel (1995). "PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo." J Biol Chem **270**(46): 27489-94.
- Amé, J.-C., C. Spenlehauer und G. de Murcia (2004). "The PARP superfamily." BioEssays **26**(8): 882-893
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Budihardjo, I., H. Oliver, M. Lutter, X. Luo, X. Wang (1999). "Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 269-90.
- Burgess, C., A. O'Donohoe, M. Gill (2000). "Agony and ecstasy: a review of MDMA effects and toxicity." Eur Psychiatry **15**(5): 287-94.
- Cadet, J. L., S. Jayanthi, X. Deng (2003). "Speed kills: cellular and molecular bases of methamphetamine-induced nerve terminal degeneration and neuronal apoptosis." Faseb J **17**(13): 1775-88.
- Cadet, J. L. und S. Ordonez (2000). "Serum withdrawal potentiates the toxic effects of methamphetamine in vitro." Ann N Y Acad Sci **914**: 82-91.
- Cadet, J. L., S. V. Ordonez, J. V. Ordonez (1997). "Methamphetamine induces apoptosis in immortalized neural cells: protection by the proto-oncogene, bcl-2." Synapse **25**(2): 176-84.
- Chen, J. und Y. Fang (2002). "A novel pathway regulating the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling." Biochem Pharmacol **64**(7): 1071-7.
- Colado, M. I., E. O'Shea, R. Granados, B. Esteban, A. B. Martin, A. R. Green (1999). "Studies on the role of dopamine in the degeneration of 5-HT nerve endings in the brain of Dark Agouti rats following 3,4- methylenedioxymethamphetamine (MDMA or 'ecstasy') administration." Br J Pharmacol **126**(4): 911-24.
- Colado, M. I., E. O'Shea, R. Granados, T. K. Murray, A. R. Green (1997). "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**(5): 889-900.
- Crespi, D., T. Mennini, M. Gobbi (1997). "Carrier-dependent and Ca^{2+} -dependent 5-HT and dopamine release induced by (+)-amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, p- chloroamphetamine and (+)-fenfluramine." Br J Pharmacol **121**(8): 1735-43.
- Cross, T. G., D. Scheel-Toellner, N. V. Henrquez, E. Deacon, M. Salmon, J. M. Lord (2000). "Serine/threonine protein kinases and apoptosis." Exp Cell Res **256**(1): 34-41.

Curran, H. V. (2000). "Is MDMA ('Ecstasy') neurotoxic in humans? An overview of evidence and of methodological problems in research." Neuropsychobiology **42**(1): 34-41.

Das, K. P., T. M. Freudenrich, W. R. Mundy (2004). "Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures." Neurotoxicology and Teratology **26**: 397-406

Davidson, C., A. J. Gow, T. H. Lee, E. H. Ellinwood (2001). "Methamphetamine neurotoxicity: necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment." Brain Res Brain Res Rev **36**(1): 1-22.

de la Torre, R., M. Farre, P. N. Roset, C. H. Lopez, M. Mas, J. Ortuno, E. Menoyo, N. Pizarro, J. Segura, J. Camí (2000). "Pharmacology of MDMA in humans." Ann N Y Acad Sci **914**: 225-37.

Decker, P. und S. Muller (2002). "Modulating poly (ADP-ribose) polymerase activity: potential for the prevention and therapy of pathogenic situations involving DNA damage and oxidative stress." Curr Pharm Biotechnol **3**(3): 275-83.

Deng, X., N. S. Cai, M. T. McCoy, W. Chen, M. A. Trush, J. L. Cadet (2002). "Methamphetamine induces apoptosis in an immortalized rat striatal cell line by activating the mitochondrial cell death pathway." Neuropharmacology **42**(6): 837-45.

Dennis, P. B., N. Pullen, R. B. Pearson, S. C. Kozma, G. Thomas (1998). "Phosphorylation sites in the autoinhibitory domain participate in p70(s6k) activation loop phosphorylation." J Biol Chem **273**(24): 14845-52.

Duronio, V., M. P. Scheid, S. Ettinger (1998). "Downstream signalling events regulated by phosphatidylinositol 3-kinase activity." Cell Signal **10**(4): 233-9.

Göthert, M., Bönisch, H., Schlicker, E., Helmchen, H.

Psychopharmaka – Stimulantien

In: „Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie“

Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Förstermann, U. und Starke, K. (Hrsg.)

Urban & Fischer Verlag, München – Jena, 2001, 8. Auflage, 363 – 365

Gu, X. F. und E. C. Azmitia (1993). "Integrative transporter-mediated release from cytoplasmic and vesicular 5-hydroxytryptamine stores in cultured neurons." Eur J Pharmacol **235**(1): 51-7.

Hegadoren, K. M., G. B. Baker, M Bourin (1999). "3,4-Methylenedioxy analogues of amphetamine: defining the risks to humans." Neurosci Biobehav Rev **23**(4): 539-53.

Hu, P., Z. Han, A. D. Couvillon und J. H. Exton (2004). "Critical Role of Endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK Pathways in Counteracting ER Stress-Induced Cell Death." JBC Papers in Press, Manuscript M407700200

Jayanthi, S., X. Deng, P.-A. H. Noailles, B. Ladenheim und J. L. Cadet (2004).

"Methamphetamine induces neuronal apoptosis via cross-talk between endoplasmic reticulum and mitochondrial-dependent death cascades." FASEB J, **18**: 238-251

Jayanthi, S., B. Ladenheim, A. M. Andrews, J. L. Cadet (1999). "Overexpression of human copper/zinc superoxide dismutase in transgenic mice attenuates oxidative stress caused by methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy)." Neuroscience **91**(4): 1379-87.

Julien, Robert M.

Psychostimulantien: Cocain und die Amphetamine

In: „Drogen und Psychopharmaka“

Spektrum Akademischer Verlag

Heidelberg – Berlin – Oxford, 1997, 1. Auflage, 133 - 167

Kalant, H. (2001). "The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs." Cmaj **165**(7): 917-28.

Klesse, L. J. und F. Parada (1999). "Trks: Signal Transduction and Intracellular Pathways. " Microsc. Res. Tech. **45**: 210-216.

Kleven, M. S. und L. S. Seiden (1992). "Methamphetamine-induced neurotoxicity: structure activity relationships." Ann N Y Acad Sci **654**: 292-301.

Karsnova, I. N., B. Ladenheim und J. L. Cadet (2005). "Amphetamine induces apoptosis of medium spiny striatal projection neurons via the mitochondria-dependent pathway." Faseb J express article10.1096/fj.04-2881fje

Kuhn, D. M. und T. J. Geddes (2000). "Molecular footprints of neurotoxic amphetamine action." Ann N Y Acad Sci **914**: 92-103.

Lawlor, M. A. und D. R. Alessi (2001). "PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?" Journal of Cell Science **114**: 2903-2910

Lin, H. C., B. H. Kang, C.-S. Wong, S.-P. Mao, F.-J. Wan (1999). "Systemic administration of D-amphetamine induced a delayed production of nitric oxide in the striatum of rats." Neurosci Lett **276**(3): 141-4.

Llorens, F., L. Garcia, E. Itarte, N. Gómez (2002). "Apigenin and LY294002 prolong EGF-stimulated ERK1/2 activation in PC12 cells but are unable to induce full differentiation." FEBS Lett **510**(3): 149-53.

Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M.

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT)

In: „Pharmakologie und Toxikologie“

Lüllmann, H., Mohr, K. (Hrsg.),

Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, 1999, 14. Auflage, 20 und 97 - 99

Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M.

Dopamin und Dobutamin

In: „Pharmakologie und Toxikologie“

Lüllmann, H., Mohr, K. (Hrsg.),

Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, 1999, 14. Auflage, 79

- Luo, H. R., H. Hattori, M. A. Hossain, L. Hester, Y. Huang, W. Lee-Kwon, M. Donowitz, E. Nagata, S. H. Snyder (2003). "Akt as a mediator of cell death." PNAS **100**(20): 11712-11717
- Markowitz, J. S. und K. S. Patrick (2001). "Pharmacokinetic and pharmacodynamic drug interactions in the treatment of attention-deficit hyperactivity disorder." Clin Pharmacokinet **40**(10): 753-72.
- McCann, U. D., V. Eligulashvili, G. A. Ricaurte (2000). "(+/-)3,4-Methylenedioxyamphetamine ('Ecstasy')-induced serotonin neurotoxicity: clinical studies." Neuropsychobiology **42**(1): 11-6.
- McKenna, D. J. und S. J. Peroutka (1990). "Neurochemistry and neurotoxicity of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, "ecstasy")." J Neurochem **54**(1): 14-22.
- Miller, D. B. und J. P. O'Callaghan (1996). "Neurotoxicity of d-amphetamine in the C57BL/6J and CD-1 mouse. Interactions with stress and the adrenal system." Ann N Y Acad Sci **801**: 148-67.
- Mortensen, O. V. und S. G. Amara (2003). "Dynamic regulation of the dopamine transporter." E J Phar **479**: 159-70
- Oliveira, M. T., Rego, A. C., Macedo, T. R., Oliveira, C. R. (2003). "Drugs of abuse induce apoptotic features in PC12 cells." Ann N Y Acad Sci **1010**: 667-70.
- O'Shea, E., B. Esteban, J. Camarero, A. R. Green, M. I. Colado (2001). "Effect of GBR 12909 and fluoxetine on the acute and long term changes induced by MDMA ('ecstasy') on the 5-HT and dopamine concentrations in mouse brain." Neuropharmacology **40**(1): 65-74.
- Pang, L., T. Sawada, S. J. Decker, A. R. Saltiel (1995). "Inhibition of MAP kinase kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by nerve growth factor." J Biol Chem **270**(23): 13585-8.
- Parker, E. M., A. Monopoli, E. Ongini, G. Lozza, C. M. Babij (2000). "Rapamycin, but not FK506 and GPI-1046, increases neurite outgrowth in PC12 cells by inhibiting cell cycle progression." Neuropharmacology **39**(10): 1913-9.
- Poethke-Müller, C. (1999). "Ecstasy, Neue pharmakologische und epidemiologische Erkenntnisse und deren praktische Bedeutung." Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz **42**: 187 – 195
- Ricaurte, G., G. Bryan, L. Strauss, L. Seiden, C. Schuster (1985). "Hallucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals." Science **229**(4717): 986-8.
- Ricaurte, G. A., J. Yuan, U. D. McCann (2000). "(+/-)3,4-Methylenedioxyamphetamine ('Ecstasy')-induced serotonin neurotoxicity: studies in animals." Neuropsychobiology **42**(1): 5-10.
- Rudnick, G. und S. C. Wall (1992). "The molecular mechanism of "ecstasy" [3,4-methylenedioxy- methamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(5): 1817-21.

Sambrook, J. und M. J. Gething (1989). "Protein structure. Chaperones, paperones." Nature **342**(6247): 224-5.

Schmidt, C. J. und J. H. Kehne (1990). "Neurotoxicity of MDMA: neurochemical effects." Ann N Y Acad Sci **600**: 665-80.

Schmoldt, A.

Epidemiologische Entwicklung des Ecstasy-Konsums

In: „Ecstasy – Wirkungen, Risiken, Interventionen, Ein Leitfaden für die Praxis“

Thomasius, R. (Hrsg.), Ferdinand Enke Verlag

Stuttgart, 1999, 1. Auflage, 23 – 36

Schubert, I., Lehmkuhl, G., Spengler, A., Döpfner, M., von Ferber, L. (2001). "Methylphenidat bei hyperkinetischen Störungen, Verordnungen in den 90er-Jahren." Dt Ärztebl **98**: B 455 - 458 [Heft 9]

Schuldiner, S., S. Steiner-Mordoch, R. Yelin, S. C. Wall, G. Rudnick (1993). "Amphetamine derivatives interact with both plasma membrane and secretory vesicle biogenic amine transporters." Mol Pharmacol **44**(6): 1227-31.

(a) Shankaran, M., B. K. Yamamoto, G. A. Gudelsky (1999). "Involvement of the serotonin transporter in the formation of hydroxyl radicals induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine." Eur J Pharmacol **385**(2-3): 103-10.

(b) Shankaran, M., B. K. Yamamoto, G. A. Gudelsky (1999). "Mazindol attenuates the 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced formation of hydroxyl radicals and long-term depletion of serotonin in the striatum." J Neurochem **72**(6): 2516-22.

Shimoke, K. und H. Chiba (2001). "Nerve growth factor prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced cell death via the Akt pathway by suppressing caspase-3-like activity using PC12 cells: relevance to therapeutical application for Parkinson's disease." J Neurosci Res **63**(5): 402-9.

Simantov, R. und M. Tauber (1997). "The abused drug MDMA (Ecstasy) induces programmed death of human serotonergic cells." Faseb J **11**(2): 141-6.

Spear, N., A. G. Estevez, L. Barbeito, J. S. Beckman, G. V. W. Johnson (1997). "Nerve growth factor protects PC12 cells against peroxynitrite-induced apoptosis via a mechanism dependent on phosphatidylinositol 3-kinase." J Neurochem **69**(1): 53-9.

Sprague, J. E., S. L. Everman, D. E. Nicholas (1998). "An integrated hypothesis for the serotonergic axonal loss induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine." Neurotoxicology **19**(3): 427-41.

Stumm, G., J. Schlegel, T. Schäfer, C. Würz, H. D. Mennel, J. C. Krieg, H. Vedder (1999). "Amphetamines induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons." Faseb J **13**(9): 1065-72.

Tölle, R.

Alterstypische und neurotische Verhaltensstörungen im Kindesalter

In: „Psychiatrie, einschließlich Psychotherapie“

Tölle, R. (Hrsg.), Springer-Verlag,
Berlin-Heidelberg-New York, 1999, 12. Auflage, 63 – 66

Thomasius, R., Kraus, D.

Epidemiologische Entwicklung des Ecstasy-Konsums

In: „Ecstasy – Wirkungen, Risiken, Interventionen, Ein Leitfaden für die Praxis“

Thomasius, R. (Hrsg.), Ferdinand Enke Verlag

Stuttgart, 1999, 1. Auflage, 21 – 22

Vaudry, D., P. J. Stork, P. Lazarovici, L. E. Eiden (2002). "Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections." Science **296**(5573): 1648-9.

Versteeg, H. H., E. Nijhuis, G. R. van den Brink, M. Evertzen, G. N. Pynaert, S. J. H. van Deventer, P. J. Coffers, M. P. Peppelenbosch (2000). "A new phosphospecific cell-based ELISA for p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK), p38 MAPK, protein kinase B and cAMP-response-element-binding protein." Biochem J **350 Pt 3**: 717-22.

Vlahos, C. J., W. F. Matter, K. Y. Hui, R. F. Brown (1994). "A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)." J Biol Chem **269**(7): 5241-8.

Wagner, G. C., G. A. Ricaurte, C. Johanson, C. R. Schuster, L. S. Seiden (1980).

"Amphetamine induces depletion of dopamine and loss of dopamine uptake sites in caudate." Neurology **30**(5): 547-50.

Walker, T. M., J. E. Davenport-Jones, R. M. Fox, C. K. Atterwill (1999). "The neurotoxic effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its metabolites on rat brain spheroids in culture." Cell Biol Toxicol **15**(3): 137-42.

Wan, F. J., H. C. Lin, Y. S. Lin, C. J. Tseng (2000). "Intra-striatal infusion of D-amphetamine induces hydroxyl radical formation: inhibition by MK-801 pretreatment." Neuropharmacology **39**(3): 419-26.

Widmann, C., S. Gibson, M. B. Jarpe, G. L. Johnson (1999). "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." Physiol Rev **79**(1): 143-80.

Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis, M. E. Greenberg (1995). "Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis." Science **270**(5240): 1326-31.

Xiao, J. und Y. Liu (2003). "Differential roles of ERK and JNK in early and late stages of neurogenesis: a study in a novel PC12 model system." J. Neurochem **86**: 1516-23

Yao, R. und G. M. Cooper (1996). "Growth factor-dependent survival of rodent fibroblasts requires phosphatidylinositol 3-kinase but is independent of pp70S6K activity." Oncogene **13**(2): 343-51.

Yao, R. und G. M. Cooper (1995). "Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor." Science **267**(5206): 2003-6.

Yu, S.-W., H. Wang, T. M. Dawson und V. L. Dawson (2003). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity." Neurobiology of Disease **14**: 303-317

Yuan, J., U. McCann, G. Ricaurte (1997). "Methylphenidate and brain dopamine neurotoxicity." Brain Res **767**(1): 172-5.

Zaczek, R., G. Battaglia, J. F. Controra, S. Culp, E. B. de Souza (1989). "Methylphenidate and pemoline do not cause depletion of rat brain monoamine markers similar to that observed with methamphetamine." Toxicol Appl Pharmacol **100**(2): 227-33.

Zheng, M., S. J. Zhang, W.-Z. Zhu, B. Ziman, B. K. Kobilka, R.-P. Xiao (2000). "beta 2-adrenergic receptor-induced p38 MAPK activation is mediated by protein kinase A rather than by Gi or gbeta gamma in adult mouse cardiomyocytes." J Biol Chem **275**(51): 40635-40.

9. Abbildungsverzeichnis

Cell Signaling Technology (2002). "Catalog & Technology Reference." Cell Signaling Technology, Inc., Beverley, MA 01915, USA

Chu, T., Y. Kumagai, E. W. DiStefano, A. K. Cho (1996). "Disposition of methylenedioxymethamphetamine and three metabolites in the brains of different rat strains and their possible roles in acute serotonin depletion." Biochem Pharmacol **51**(6): 789-96, Fig. 1.

Raught, B., A. C. Gingras, N. Sonenberg (2001). "The target of rapamycin (TOR) proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7037-44, Fig. 1.

Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis, M. E. Greenberg (1995). "Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis." Science **270**(5240): 1326-31, Fig. 6.

10. Danksagung

An Herrn Prof. Dr. Jürgen Schlegel richtet sich mein sehr herzlicher Dank für die Überlassung des Themas sowie für die wohlwollende Unterstützung, die er mir über die gesamte Arbeitszeit zuteil werden ließ. Mein Interesse an wissenschaftlichen Fragestellungen konnte sich dadurch wesentlich weiterentwickeln.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an Guido Piontek und Gudrun Durchschlag für die detaillierte Einweisung in molekularbiologische Arbeitsmethoden sowie für ihre unverzichtbaren und wertvollen Anregungen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Gabriele Stumm, deren konstruktiven Ratschläge wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.