

## **5 Zusammenfassung**

In der Erforschung neuer Wege zur Bekämpfung des Morbus Parkinson spielen Untersuchungen neurotropher Faktoren für die dopaminergen Neurone in der Pars compacta der Substantia nigra eine bedeutende Rolle. Dabei wird an der Charakterisierung neurotropher Faktoren und der Analyse ihrer neurotrophen und protektiven Potenz verstärkt gearbeitet.

Der basische Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2) besitzt neurotrophe und protektive Wirkung. FGF-2 wird in verschiedenen Isoformen exprimiert, die während der Entwicklung und nach experimentellen Stimuli differentiell reguliert werden.

Untersuchungen zur neurotrophen Aktivität des FGF-2 basierten bisher auf der 18 kD-Isoform. Über die Rolle der höhermolekularen Isoformen des FGF-2, 21 kD und 23 kD (HMW) im Nervensystem gibt es bisher keine funktionellen Untersuchungen.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, diese HMW bezüglich ihrer biologischen Aktivität zu charakterisieren und sie mit dem kommerziellen 18 kD-FGF-2 zu vergleichen.

Die HMW wurden in der Abteilung für Neumanatomie der Medizinischen Hochschule Hannover von Frau Dr. Müller-Ostermeyer hergestellt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurde ein Ciliarganglienneuron-Assay am Embryonaltag 8 (CG 8-Assay) durchgeführt. Hiermit wurde die biologische Aktivität der HMW-Präparationen analysiert.

Weiterhin wurden mesencephale Kulturen von Rattenembryonen am Embryonaltag 14 angelegt und mit den HMW sowie mit 18 kD-FGF-2 behandelt, immunocytochemisch aufgearbeitet und ausgewertet. Die Anzahl der dopaminergen Neurone wurde ausgezählt.

Außerdem wurde ein Zell-ELISA durchgeführt, um zusätzlich Gesamtneurone und Glia-Zellen zu quantifizieren.

Die protektive Potenz der HMW wurde analysiert, indem den Kulturen das Neurotoxin 6-OHDA zugesetzt wurde.

Ein weiteres Experiment wurde unter Verwendung FGF-2-spezifischer Antikörper durchgeführt, um die Spezifität der beobachteten Effekte der HMW zu überprüfen.

Schließlich wurde die Morphologie der dopaminergen Neurone bestimmt, indem die TH<sup>+</sup>-Zellen mit Hilfe eines Computerprogrammes (AnalySis) vermessen wurden.

Die Versuche zeigten folgende Ergebnisse:

- Die HMW fördern das Überleben der CG-Neurone. Die biologische Aktivität der HMW ist hier stärker als die des 18 kD-FGF-2. Dieser Effekt ist dosisabhängig und FGF-2-spezifisch.
- In den nigralen Kulturen fördern die HMW das Überleben der dopaminergen Neurone und haben protektive Potenz. Hier unterscheidet sich die Aktivität der HMW nicht von der des 18 kD-FGF-2. Auch diese Beobachtungen sind dosisabhängig und FGF-2-spezifisch.
- Die Gesamtneuronenzahl ist von den HMW nicht beeinflusst. Ein starker Anstieg ist in der Zahl der Glia-Zellen zu verzeichnen. So scheint auch bei den HMW die neurotrophe Wirkung auf die dopaminergen Neurone nicht direkt, sondern Glia-vermittelt zu sein.

Die Morphologie der dopaminergen Neurone wird von den HMW wie folgt beeinflusst:

- Die Größe der Zellkörper ist bei den HMW größer als beim 18 kD-FGF-2
- die Gesamtlänge der Neuriten ist bei allen Faktoren größer als in der Kontrolle, beim 23 kD-FGF-2 größer als beim kommerziellen 18 kD-FGF-2
- die Anzahl der primären Neuriten ist von den Faktoren unabhängig
- die Anzahl der Neuritenverzweigungspunkte ist in den HMW-Kulturen kleiner als in den FGF-2-Kulturen.

Zusammenfassend läßt sich somit feststellen, daß die HMW neurotrophe und protektive Potenz besitzen, die sich aber in dem hier gewählten Testsystem nur wenig von den Effekten des kommerziellen 18 kD-FGF-2 unterscheiden.

## Summary

In the research to discover the latest methods to combat Parkinson Disease, investigations involving neurotrophic factors for the dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra play a significant role. A great emphasis is placed on the characterisation of neurotrophic factors and analyses of their neurotrophic and protective potency.

Basic fibroblast growth factor-2 (FGF-2) has both a neurotrophic and a protective influence. FGF-2 is expressed in different isoforms which are differentially regulated during development and following experimental stimuli.

Investigations to determine the neurotrophic activity of FGF-2 are based up till now on the 18 kD isoform. As yet, there are no functional investigations to clarify the role of the high molecular weight isoforms of FGF-2, 21 kD and 23 kD (HMW) in the nervous system.

The aim of this study was to characterize these HMW with regard to their biological activity and then compare them with the commercial 18 kD-FGF-2.

The HMW were produced and made available for the purpose of this study by Frau Dr. Müller-Ostermeyer in the Department of Neuroanatomy of the Hannover Medical School.

A ciliary ganglion neuron assay of the embryonal day 8 (CG 8-assay) was first carried out and the biological activity of HMW preparations analyzed.

Furthermore, mesencephalic cultures were taken from rat embryos at embryonal day 14 and treated with HMW as well as with 18 kD-FGF-2. These were then immunocytochemically examined and evaluated. The number of dopaminergic neurons was registered.

A cell-ELISA was also performed in order to quantify additionally the total number of neurons and glia cells. The protective potency of HMW in the cultures was analyzed after neurotoxic treatment using 6-OHDA.

A further experiment was carried out using FGF-2 specific antibodies in order to check the specificity of the observed effects of the HMW.

Finally, the morphology of the dopaminergic neurons was defined using a computer system.

The following results were obtained from the experiments.

The HMW promoted survival of the CG-neurons. The biological activity of HMW was found to be more pronounced here than those of the 18 kD-FGF-2. This effect is dose-dependent and FGF-2-specific.

In the nigral cultures, the HMW promoted survival of the dopaminergic neurons and show a protective potency. No difference was determined between the HMW activity and the 18 kD-FGF-2 activity. These observations were also dose-dependent and FGF-2-specific.

The total number of neurons was not influenced by HMW. A marked increase is seen in the number of glia cells. There was no direct neurotrophic effect on the dopaminergic neurons in HMW, rather this appeared to be induced by the glia-cells.

The morphology of the dopaminergic neurons is influenced by HMW as follows:

The size of the cell bodies is larger in the HMW than in 18 kD-FGF-2.

The total length of the neurites is greater in all the factors when compared to those of the controls and are greater in 23 kD-FGF-2 when compared to the commercial 18 kD-FGF-2.

The number of the primar neurites is not dependent on the factors.

The number of neurite branching sites are less significant in HMW cultures than in FGF-2 cultures.

In summary, it may be determined that HMW possess neurotrophic and protective potency which, by means of the chosen test, show only a slight differentiation from the effect of the commercial 18 kD-FGF-2.