

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der
Philipps-Universität Marburg/Lahn
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. G. Aumüller
Abteilung für Neurobiologie
Leiter Prof. Dr. K. Unsicker

**Einfluß des basischen
Fibroblastenwachstumsfaktors
(bFGF) auf den ontogenetischen
Neurontod im Ziliarganglion des
embryonalen Hühnchens**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität
vorgelegt von

DOROTHEA DREYER
aus Göttingen

Marburg/Lahn 1992

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der
Philipps-Universität Marburg/Lahn
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. G. Aumüller
Abteilung für Neurobiologie
Leiter Prof. Dr. K. Unsicker

**Einfluß des basischen
Fibroblastenwachstumsfaktors
(bFGF) auf den ontogenetischen
Neurontod im Ziliarganglion des
embryonalen Hühnchens**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität
vorgelegt von

DOROTHEA DREYER
aus Göttingen

Marburg/Lahn 1992

Meinen Eltern
gewidmet

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
am 03.06.1993

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. K. Voigt
Referent: Prof. Dr. K. Unsicker
Correferent: Prof. Dr. Mennel

Inhaltsverzeichnis

Liste der Abkürzungen

1. EINLEITUNG	4
1.1. Der ontogenetische neuronale Zelltod	4
1.2. Neurotrophe Wachstumsfaktoren	4
1.3. Nervenwachstumsfaktor (NGF)	5
1.4. Weitere mögliche neurotrophe Faktoren	5
1.4.1. Brain derived neurotrophic factor (BDNF)	5
1.4.2. Ciliary neurotrophic factor (CNTF)	6
1.5. Der basische Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF)	7
1.6. Fragestellung	9
2. MATERIAL UND METHODEN	11
2.1. Versuchstiere	11
2.2. Faktorapplikation	11
2.3. Präpariertechnik	12
2.4. Fixierung und Einbettung der Organe in Paraffin	12
2.5. Fixierung und Einbettung der Organe in Araldit	13
2.6. Färbungen	13
a) in Paraffin eingebettete Präparate	
b) in Araldit eingebettete Präparate	
2.7. Immunhistochemie	14
2.8. Autoradiographie	14
2.9. Zählung der Neurone	15
2.10. Auswertung der Autoradiogramme	16
2.11. Statistik	16
3. ERGEBNISSE	17
3.1. Makroskopische Aspekte	17
3.2. Zahl der Neurone	17
3.3. Morphologie des Ziliarganglions	18
3.4. Morphologie des Auges	18
3.5. Autoradiographie des Ziliarganglions	19
3.6. Autoradiographie des Auges	19
3.7. Immunhistochemie	20

4. DISKUSSION	21
4.1. Einfluß von bFGF auf den ontogenetischen Neuronotod	21
4.2. Direkte oder indirekte Wirkung von bFGF	23
4.2.1. Beeinflussung des Zielorgans durch bFGF	24
4.2.2. Beeinflussung der Gliazellen durch bFGF	25
4.2.3. FGF-Rezeptoren	26
4.3. Ausmaß der Reduktion des ontogenetischen Neuronotodes	27
4.4. Einfluß von bFGF auf die Transmittersynthese	27
4.5. Die Rolle von bFGF als NTF	28
4.6. Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren	31
5. ZUSAMMENFASSUNG	32
6. LITERATURVERZEICHNIS	34
7. ANHANG	41
7.1. Chemikalien und Antikörper	41
7.2. Lösungen	42
7.3. Abbildungen	43
8. DANKSAGUNG	50
9. TABELLARISCHER LEBENS LAUF	51
10. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	52
11. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	53

Liste der Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor = basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
BSA	Bovine Serum Albumine = Rinderserumalbumin
CDF	ChAT Development Factor
CG	Ganglion Ciliare
ChAT	Cholinacetyltransferase
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
Cyt C	Cytochrom C
E	Embryonaltag
HE	Hämatoxylin-Eosin
NGF	Nerve Growth Factor = Nervenwachstumsfaktor
NGS	Normal Goat Serum = Ziegenserum
NTF	Neurotropher Faktor
PAP	Peroxidase-Antiperoxidase
PBS	Phosphate Buffered Saline = phosphatgepufferte Kochsalzlösung
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG

1.1. Der ontogenetische neuronale Zelltod

Ontogenetischer neuronaler Zelltod ist ein weitverbreitetes Phänomen in der neuronalen Entwicklung (HAMBURGER 1975, HAMBURGER und OPPENHEIM 1982, OPPENHEIM 1981, 1985).

Der Zelltod findet meist nach Proliferation, Migration und Differenzierung statt (ROHRER und THOENEN 1987) und steht in engem zeitlichem Zusammenhang mit dem Erreichen des Zielgewebes durch die Axonterminalen und der Bildung von Synapsen (LANDMESSER und PILAR 1974, CUNNINGHAM 1982).

In den meisten neuronalen Geweben beträgt der Verlust 25-75% der zuvor im Überschuß angelegten Neurone. Das Ausmaß dieses physiologischen Neurontodes variiert zwischen den Spezies und zwischen den verschiedenen Regionen des Nervensystems.

1.2. Neurotrophe Wachstumsfaktoren

Bei der Regulation des neuronalen Zelltodes hat das Zielorgan maßgeblichen Einfluß. Die Neurone befinden sich im Wettbewerb um neurotrophe Wachstumsfaktoren (NTFs). NTFs sind definiert als Proteine, die von den Zielorganen in begrenzter Menge synthetisiert und sezerniert werden. Sie werden über spezifische Rezeptoren von den Neuronen aufgenommen und retrograd axonal zu den Perikaryen transportiert. Dort üben sie dann ihre Überlebens- und wachstumsfördernde Wirkungen aus.

Gegen neurotrophe Faktoren gerichtete Antikörper vermögen hingegen das Ausmaß des neuronalen Zelltodes noch zu steigern (CUNNINGHAM 1982, CLARKE 1985, BARDE 1989, WALICKE 1989, OPPENHEIM 1989).

1.3. Nervenwachstumsfaktor NGF

Der am besten erforschte Wachstumsfaktor ist der Nervenwachstumsfaktor (NGF), dessen Wirkung von LEVI-MONTALCINI und HAMBURGER (1951) erstmals beschrieben wurde. Anhand der Merkmale des NGF wurden die obigen Eigenschaften eines NTFs formuliert. NGF fördert das Überleben peripherer sensorischer und sympathischer Ganglienzellen sowie das Auswachsen von Neuriten dieser Neurone (LEVI-MONTALCINI und HAMBURGER 1951, LEVI-MONTALCINI 1966, HAMBURGER et al. 1981).

Im zentralen Nervensystem wirkt NGF auf magnozelluläre cholinerge Neurone überlebensfördernd (THOENEN et al. 1987). Antikörper gegen NGF und Unterbrechung des retrograden Transports steigern das Ausmaß des neuronalen Zelltodes (BARDE 1989).

Da NGF nur auf bestimmte Nervenzellpopulationen wirkt, kann man postulieren, daß der neuronale Zelltod anderer Neuronpopulationen von weiteren NTFs reguliert wird.

1.4. Weitere mögliche neurotrophe Faktoren

Mögliche Kandidaten als NTFs sind der brain derived neurotrophic factor (BDNF) und der ciliary neurotrophic factor (CNTF).

1.4.1. Brain derived neurotrophic factor (BDNF)

BDNF fördert das Überleben peripherer sensorischer Ganglienzellen. Dazu gehören auch solche Zellpopulationen, die nicht von NGF beeinflußt werden, wie zum Beispiel Nervenzellen des Ganglion nodosum und propriozeptive Neurone des Spinalganglions (HOFER und BARDE 1988, BARDE 1989). Daneben übt BDNF überlebensfördernde Wirkung auf retinale Ganglienzellen in vitro aus. Dabei beschränkt sich diese Fähigkeit nicht auf embryonale retinale Ganglienzellen,

auch retinale Ganglienzellen adulter Ratten überleben in Kultur länger und zeigen verstärktes axonales Wachstum unter dem Einfluß von BDNF (BARDE 1989).

BDNF erfüllt aufgrund dieser neurotrophen Eigenschaften und des limitierten Vorkommens einige NTF-Anforderungen. Noch nicht nachgewiesen sind hingegen retrograder axonaler Transport und die Beeinflussung der Wirkung durch gegen BDNF gerichtete Antikörper. Über das Vorkommen im zentralen Nervensystem ist bisher wenig bekannt. Der Nachweis der für dieses Protein codierenden mRNA durch in situ Hybridisierung spricht für ein Vorkommen in Neuronen des Hippocampus, des Claustrums und des Cortex (WETMORE et al. 1990).

1.4.2. Ciliary neurotrophic factor (CNTF)

CNTF zeigt neurotrophe Wirkung auf Neurone des Ganglion ciliare in vitro (BARBIN et al. 1984). LEHWALDER et al. (1989) fanden eine überlebensfördernde Wirkung von CNTF auf kultivierte retinale Ganglienzellen. Des weiteren beeinflusst CNTF das Überleben spinaler Motoneurone. So wiesen ARAKAWA et al. (1990) einen überlebensfördernden Effekt auf spinale Motoneurone in vitro nach. WEWETZER et al. (1990) fanden neurotrophe Wirkung in vivo. Auch in Läsionsmodellen konnte eine überlebensfördernde Wirkung von CNTF nachgewiesen werden:

So verhindert CNTF die Degeneration von Motoneuronen nach Axotomie des N. facialis der Ratte (SENDTNER et al. 1990). BLOTTNER et al. (1989) wiesen eine überlebensfördernde Wirkung auf Neurone der intermediolateralen Säule des Rückenmarks nach selektiver Zerstörung des dazugehörigen Zielorgans, dem Nebennierenmark, nach. Diese Beispiele weisen auf eine mögliche Rolle von CNTF als NTF hin, jedoch sind auch hier die Wirkung von Antikörpern gegen CNTF und die Frage des retrograden axonalen Transports noch ungeklärt.

1.5. Der basische Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF)

Ein weiteres Protein mit NTF-Eigenschaften ist der basische Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF, basic fibroblast growth factor). Es handelt sich um ein Polypeptid aus 146 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 15,8 kD und einem isoelektrischen Punkt von $pI = 9,6$ (BAIRD et al. 1986). Basischer FGF wird in einer Vielzahl von Geweben gefunden, so z.B. im Gehirn, in der Hypophyse, in Nebennieren, Corpus luteum und Retina sowie im Muskel (KARDAMI et al. 1985, BAIRD et al. 1986, GOSPODAROWICZ et al. 1986, LOBB 1988, VACA et al. 1989). Im Nervensystem ist bFGF in Neuronen nachweisbar (PETTMANN et al. 1986, PETTMANN et al. 1987). Über das Vorkommen von bFGF in Gliazellen herrscht keine einheitliche Meinung. Einige Autoren fanden eine Expression von bFGF durch Astrozyten (FERRARA et al. 1988). Pettmann et al. (1986) und Janet et al. (1987) andererseits wiesen bFGF immunhistologisch ausschließlich in Neuronen nach. Basischer FGF ist als Mitogen für Fibroblasten, Myoblasten und Endothelzellen bekannt. Basischer FGF fördert Angiogenese und Wundheilung (THOMAS und GIMENEZ-GALLEGO 1986, FERRARA et al. 1988).

Zahlreiche Untersuchungen weisen auf eine Rolle von bFGF als NTF hin: basischer FGF vermag *in vitro* das Überleben und Neuritenwachstum verschiedener Neurone zu fördern, so zum Beispiel Neurone des Striatums (WALLICKE et al. 1988), des Septums (GROTHER et al. 1989), Rückenmarksneurone und Ziliarganglienneurone (UNSICKER et al. 1987).

Unterbricht man in Läsionsmodellen die Verbindung vom Zielorgan zum Nervenzellkörper, kommt es als Folge eines Mangels an trophischer Wirkung des Zielorgans auf die innervierende Zelle zu beträchtlichem Neuronuntergang. Exogen applizierter bFGF reduziert diesen Zelltod:

So führt die Durchtrennung des N. ischiadicus zum Verlust sensorischer Neurone in Spinalganglien, was durch bFGF verhindert wird (OTTO et al. 1987). Das Absterben retinaler Ganglienzellen nach Durchtrennung des Nervus opticus wird ebenfalls durch bFGF reduziert (SIEVERS et al. 1987).

Ebenso wird der Zelltod medialer Septumneurone nach Unterbrechung der Fimbria-Fornix-Verbindung zum Hippocampus durch bFGF vermindert (ANDERSON et al. 1988, OTTO et al. 1989). Außerdem wird der nach Entfernung des Nebennierenmarks einsetzende Zelltod in der intermediolateralen Säule des Rückenmarks durch bFGF vollständig verhindert (BLOTTNER et al. 1989).

Des weiteren mildert bFGF den neurotoxischen Effekt von MPTP auf das nigro-striatale System im MPTP-Parkinsonmodell der Maus (OTTO und UNSICKER 1990).

Ein weiterer Aspekt, der Beachtung verdient, ist die Rolle, die bFGF im Transmitterstoffwechsel spielt. Unter dem Einfluß von bFGF wird die Cholinacetyltransferase (ChAT)-Aktivität im Rückenmark *in vitro* und *in vivo* (GROTHER et al. 1991) sowie in kultivierten Ziliarganglienneuronen (UNSICKER et al. 1987) gesteigert. Zusätzlich wirkt bFGF additiv hinsichtlich der Steigerung der ChAT-Aktivität durch den Chat Development Factors (CDF) an kultivierten embryonalen Motoneuronen (McMANAMAN et al. 1989).

1.6. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von bFGF während des ontogenetischen Neuronotodes im Ziliarganglion *in vivo* untersucht. Im Ziliarganglion (CG) des Hühnchens findet der Zelltod von Embryonaltag 8 (E8) bis E13 statt. Die Proliferation der neuronalen Präkursoren ist schon an E4,5 abgeschlossen (ROHRER und THOENEN 1987).

Zielorgan des parasymphatischen Ganglions sind der Musculus sphincter pupillae und der Ziliarmuskel des Auges. Das Absterben von CG8-Neuronen des Hühnchens konnte *in vitro* durch die Zugabe von bFGF weitgehend aufgehalten werden (UNSICKER et al. 1987). Da für das Ziliarganglion noch kein *in vivo* wirksamer neurotropher Faktor bekannt war, wurde die Wirkung von bFGF auf CG-Neurone des Hühnchens *in vivo* untersucht.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob bFGF direkt oder indirekt, d.h. durch Beeinflussung der umgebenden Glia oder des Zielorgans, den neuronalen Zelltod beeinflusst. Dazu wurde die Morphologie des Zielorgans, in diesem Fall des Ziliarkörpers im Auge des Hühnerembryos, mittels verschiedener Techniken untersucht.

Ferner wurde der Einbau von ^3H -markiertem Thymidin an Schnitten des Ziliarganglions und des Ziliarmuskels mit Hilfe der Autoradiographie untersucht, um proliferative Effekte von bFGF auf Glia und Zielorgan zu ermitteln. Schließlich wurde versucht, Gliazellen mit gegen O1/04, GFAP und Vimentin gerichteten Antikörpern zu markieren, um eine mögliche Vermehrung der Gliazellen und damit proliferative Effekte von bFGF auf Gliazellen sichtbar zu machen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Versuchstiere

Alle Experimente wurden mit weißen Leghorn Hühnerembryonen durchgeführt. Als Embryonaltag Null (E0) wurde der Tag bezeichnet, an dem die Eier in den Inkubator eingelegt wurden. Dort wurden sie bei 37°C und 75% Feuchtigkeit bebrütet und dabei in regelmäßigen Abständen gewendet.

Bei der Präparation wurde das jeweilige Entwicklungsstadium der Hühnerembryonen nach dem Verfahren von HAMBURGER und HAMILTON (1951) ermittelt.

2.2. Faktorapplikation

Die Hühnerembryonen wurden an den Tagen E8, E9, E11 und E13 mit bFGF oder der Kontrollösung behandelt.

Basischer FGF (Progen, Heidelberg) wurde in Phosphat-gepuffertes Kochsalzlösung (PBS, phosphate-buffered saline, Bichrom AG) mit Cytochrom C (1mg/ml; Sigma, München) in einer Konzentration von 3µg/50µl gelöst. Die Kontrolltiere erhielten nur Cytochrom C in PBS. Basischer FGF derselben Charge war zuvor auf seine Überlebensfördernde Wirkung an kultivierten Ziliarganglienneuronen von E8 überprüft worden. Halbmaximale Effekte wurden mit 300-600pg/ml bFGF erzielt (UNSICKER et al. 1987).

Mit einer sterilen Eppendorff-Pipette wurden jeweils 50µl Lösung (siehe oben) auf die Chorionallantoismembran gegeben. Anschließend wurde das Loch mit einem Klebestreifen verschlossen. Die so behandelten Eier wurden weiter bebrütet, allerdings konnten sie nicht mehr gewendet werden.

An E14 wurden dann die Hühnerembryonen getötet und die beiden Ziliarganglien sowie die Augen entnommen. Parallel dazu wurden unbehandelte Tiere an E8 und E14 präpariert.

2.3. Präpariertechnik

Am Tag E14 wurden die Hühnerembryonen aus dem Ei genommen und unter dem Operationsmikroskop präpariert.

Dazu wurden der retroorbitale Fettkörper entfernt, die äußeren Augenmuskeln durchtrennt und der Nervus opticus aufgesucht. Nach Durchtrennung afferenter und efferenter Nerven wurde das Ziliarganglion entfernt und sofort fixiert (siehe unten).

Anschließend wurde aus den Augen die Iris mit einem schmalen Saum der Bulbuswand zirkulär ausgeschnitten. Diese Scheibe wurde geachtelt und fixiert.

2.4. Fixierung und Einbettung der Organe in Paraffin

Nach mehrstündiger Fixierung in 3,7%iger Formaldehydlösung wurden die Organe in steigenden Konzentrationen Äthylalkohol entwässert und in Paraffin eingebettet.

Mit dem Mikrotom wurden 10µm dicke Schnitte hergestellt.

2.5. Fixierung und Einbettung der Organe in Araldit

Nach mehrstündiger Fixierung in Glutaraldehyd (3,5% in SÖRENSEN-Puffer, pH 7,8, Zusammensetzung siehe Anhang) wurden die Organe mehrfach in SÖRENSEN-Puffer gewaschen. Die Nachfixierung erfolgte in 4%iger Osmiumtetroxidlösung (OsO_4) für 30 Minuten.

Anschließend wurden die Organe in steigenden Konzentrationen Äthylalkohol entwässert und über Propylendioxid in Araldit eingebettet.

Von diesen Präparaten wurden mit Glasmessern Semidünnschnitte für die Lichtmikroskopie (Schnittdicke 1µm) und Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie (Schnittdicke ca. 0,1µm) angefertigt.

2.6. Färbungen

a) in Paraffin eingebettete Präparate:

Die Paraffinschnitte der Ziliarganglien wurden in 1%iger Kresylviolettlösung bei pH 3,5 gefärbt, in 4%igem Eisessig differenziert und in Corbitbalsam eingedeckelt. Die Augenabschnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE, je 0,1%) gefärbt.

b) in Araldit eingebettete Präparate:

Die semidünnen Aralditpräparate wurden mit Azur-II-Methylenblau nach RICHARDSON et al. (1960, Zusammensetzung siehe Anhang) gefärbt.

Die ultradünnen Aralditpräparate wurden auf unbefilmte Kupfernetze gegeben und 30 Minuten in gesättigter Uranylacetatlösung nachkontrastiert.

2.7. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde an Paraffin- und Gefrierschnitten sowie an kultivierten Zellen und unfixierten Geweben mit der Peroxidase-anti-peroxidase (PAP)-Methode und der indirekten Immunfluoreszenz-methode durchgeführt (PICKEL 1981, BOURNE, DAHL und BIGNAMI 1985). Folgende Antikörper wurden eingesetzt:

- anti-S100-Antikörper, Marker für Gliazellen (DAKO),
- anti-O1/O4-Antikörper, Oberflächenmarker für Schwannzellen und Oligodendrozyten (ROHRER und SOMMER 1983)
(freundliche Gabe von Frau Prof. M. Schachner, Heidelberg),
- anti-Vimentin, Marker für nichtneuronale Zellen
(Boehringer Mannheim).

Dabei wurden verschiedene Zweitantikörper verwendet und verschiedene Inkubationsbedingungen getestet. Als Puffer wurden verwendet: Tris water, Tris saline und Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS).

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde mit Ziegen Serum (NGS, normal goat serum) und Rinder Serum-Albumin (BSA, bovine serum albumine) vorinkubiert.

2.8. Autoradiographie

Nach dem oben beschriebenen Schema wurden die Embryonen an den Tagen E8, E9, E11 und E13 jeweils morgens entweder mit bFGF oder der Kontrollösung behandelt. Zusätzlich erhielten die Tiere an E12 und E13 abends jeweils 50µl einer wässrigen Lösung mit Methyl-³H-Thymidin der Aktivität 50µCi (Amersham int. plc, U.K.). So entfielen auf jedes Tier insgesamt 100µCi (HAHN 1983, SEMBA und FIBIGER 1988, CLARKE und HORNING 1989).

An E14 wurden die Ziliarganglien und Augen präpariert und nach oben beschriebenen Verfahren in Paraffin eingebettet und 10µm dicke Schnitte hergestellt. Vom Auge wurden zusätzlich Araldit-Semidünnschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Chromalaun-Gelatine-beschichtete Objektträger gegeben (Zusammensetzung siehe Anhang).

Durch Xylol und Äthylalkohol in absteigenden Konzentrationen wurden die Schnitte entparaffiniert und gewässert. Im Dunklen wurden nun die Objektträger mit NTB-2-Emulsion (Kodak) befilmt. An die Trocknung im Exsikkator schloß sich eine Expositionszeit von 6 Wochen im Dunklen bei 4°C an.

Die Entwicklung erfolgte im Entwickler Kodak D19, danach wurden die Objekte fixiert, durch die aufsteigende Alkoholreihe entwässert und getrocknet.

2.9. Zählung der Neurone

Die kresylviolett gefärbten Ziliarganglien wurden im Lichtmikroskop betrachtet; bei 400facher Vergrößerung wurden die Neurone gezählt.

Als Kriterien für vitale Neurone gelten: Großer Kern mit mindestens einem gut abgrenzbaren Nukleus sowie Nachweis von Nissl-Substanz im Cytoplasma. Gezählt wurde jeder fünfte Schnitt, und das Ergebnis wurde mit 5 multipliziert.

Alle Angaben erfolgen jeweils als Mittelwert \pm SEM
(SEM=Standardabweichung des Mittelwertes, SEM = s/\sqrt{n}).

2.10 Auswertung der Autoradiogramme

Von den ^3H -Thymidin-markierten Schnitten des Ziliarganglions wurden pro Ganglion zehn Schnitte bei 400facher Vergrößerung ausgezählt. Die so erzielten Zahlen wurden auf die Fläche des Zählgitters ($0,0625 \text{ mm}^2$) bezogen. Auf diese Weise wurde nicht die absolute Zahl der Markierungen pro Ganglion, sondern die Dichte der Markierungen pro mm^2 ermittelt.

Von den ^3H -Thymidin-markierten Paraffinschnitten des Auges wurden pro Auge 3 Schnitte ausgewertet. Dazu wurden die Markierungen im Bereich des Ziliarmuskels (siehe Abbildung) gezählt und auf die Fläche bezogen.

2.11. Statistik

Zur Berechnung der Signifikanz der Ergebnisse wurde der Student-t-Test (HARMS 1982) eingesetzt. Um ein Ergebnis als signifikant zu betrachten, wurde $p < 0,05$ gefordert.

3. ERGEBNISSE

3.1. Makroskopische Aspekte

Bei der Präparation der Hühnerembryonen am Tag E14 sind makroskopisch und bei binokularer Betrachtung keine Unterschiede sichtbar zwischen unbehandelten, Cytochrom C-behandelten und bFGF-behandelten Tieren: Gleichaltrige Tiere entsprechen auch demselben Stadium nach HAMBURGER und HAMILTON (1951) und sind der Brutdauer entsprechend entwickelt. Auch die Vaskularisation der Chorionallantois und der Tiere selbst zeigt keine sichtbaren Unterschiede.

3.2 Zahl der Neurone

Die Zählung der Neurone des Ziliarganglions am Tag E8 ergibt folgende Werte (siehe Abb. 1): Es wurden 11 Ganglien gezählt, der Mittelwert beträgt 5970 ± 349 Neurone pro Ganglion.

Am Tag E14 wurden bei den unbehandelten Kontrolltieren (9 Ganglien) 3360 ± 186 Neurone pro Ganglion, bei den Cytochrom C-behandelten Kontrolltieren (12 Ganglien) 3368 ± 161 Neurone pro Ganglion gezählt. Die bFGF-behandelten Tiere (9 Ganglien) enthalten 4787 ± 292 Neurone pro Ganglion.

Zählungen durch weitere, unabhängige Personen ergaben vergleichbare Werte.

Setzt man die Zahl der Neurone an E8 als 100% an, so beträgt die Zahl überlebender Neurone an E14 von unbehandelten und Cytochrom C-behandelten Tieren je 56%, die der bFGF-behandelten Tiere jedoch 85%. Dies bedeutet, daß der physiologische Zelltod durch bFGF signifikant reduziert wird.

3.3 Morphologie des Ziliarganglions

Obwohl die Ziliarganglien gleich groß sind, zeigt das mikroskopische Bild in der Kresylviolett-färbung deutliche Unterschiede:

In den Ziliarganglien der Kontrolltiere liegen die Neurone weit verstreut, dazwischen befindet sich reichlich Bindegewebe. Die Ziliarganglien bFGF-behandelter Tiere weisen eine größere Neuronendichte, jedoch keine erkennbare Zunahme von Glia- und anderen nicht-neuronalen Zellen auf (Abb.2).

3.4 Morphologie des Auges

Der Ziliarmuskel des Auges von bFGF-behandelten Hühnerembryonen unterscheidet sich weder licht- noch elektronenmikroskopisch von dem der Kontrolltiere. Sowohl die HE-gefärbten Paraffinschnitte als auch die Methylenblau-gefärbten Semidünnschnitte zeigen den Ziliarmuskel in seinen drei Anteilen mit unterschiedlicher Verlaufsrichtung der Muskelbündel (Abb.3). Dichte und Durchmesser der Muskelfasern der verschieden behandelten Tiere unterscheiden sich nicht (Abb.4 und 5).

Auch ultramorphologisch zeigen sich zwischen bFGF-behandelten und den Kontrolltieren keine Unterschiede: Bei 7000-12000facher Vergrößerung sind Aktin- und Myosinfilamente in den Myocyten nachweisbar. Dazwischen finden sich vereinzelt Mitochondrien sowie reichlich endoplasmatisches Retikulum. Unterschiede in Anordnung und Dichte sind nicht nachweisbar. Im Bereich der Sklera findet sich bei allen betrachteten Schnitten erwartungsgemäß ein dichtes Netz kollagener Fasern.

Somit gibt auch das elektronenoptische Bild keinen Hinweis auf einen Einfluß von bFGF auf das Zielorgan.

3.5 Autoradiographie des Ziliarganglions

Die radioaktiven Markierungen in den Ziliarganglien ^3H -Thymidin-behandelter Tiere liegen deutlich im Bereich der Glia, Neurone sind ausgespart (Abb.6). Die Zählung der Markierungen ergab folgende Werte:

Die Ziliarganglien bFGF-behandelter Tiere enthielten 2446 ± 133 Markierungen pro mm^2 . Für die Ziliarganglien der Kontrolltiere wurden 2122 ± 129 Markierungen pro mm^2 ermittelt. Die Unterschiede zwischen den mit bFGF behandelten und den Kontrolltieren sind somit nicht signifikant.

3.6 Autoradiographie des Auges

Die quantitative Auswertung der radioaktiven Markierungen im Bereich des Ziliarmuskels ergibt für bFGF-behandelte Tiere 2125 ± 157 Markierungen pro mm^2 und für die Kontrolltiere 1825 ± 156 Markierungen pro mm^2 . Dieser Unterschied ist nicht signifikant. Damit ist autoradiographisch keine Steigerung der Mitoserate unter dem Einfluß von bFGF im Ziliarmuskel nachweisbar (Abb.7).

3.7 Immunhistochemie

Die Auswertung der Immunhistochemie am Ziliarganglion von E14 des Hühnerembryos erbrachte keine reproduzierbaren Ergebnisse. Eine spezifische Markierung konnte mit keinem der verwendeten Antikörper erzielt werden. Oft zeigten sich sowohl auf Antikörper-behandelten wie auf Kontrollschnitten unspezifische Markierungen, auch bei mehrfacher Wiederholung der Experimente unter unterschiedlichen Inkubationsbedingungen. Andererseits zeigte sich oft auch keinerlei Markierung. Für die jeweils verwendeten Antikörper war nicht gesichert, ob sie mit Hühnergewebe kreuzreagieren.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die in vivo Wirkung von bFGF auf den physiologischen Zelltod von Ziliarganglienneuronen untersucht. Der physiologische Zelltod der CG-Neurone des Hühnerembryos findet im Zeitraum von E8 bis E13 statt. Bisher war kein neurotropher Faktor bekannt, der in vivo den ontogenetischen Zelltod dieser Neuronpopulation verhindert.

Da in vorhergehenden Arbeiten eine Überlebensfördernde Wirkung von bFGF auf kultivierte CG-Neurone gezeigt wurde (UNSICKER et al. 1987), erscheint es denkbar, daß bFGF auch in vivo eine neurotrophe Wirkung auf diese Neuronpopulation ausübt.

4.1. Einfluß von bFGF auf den ontogenetischen Neurontod

Die Zählung der CG-Neurone zeigt, daß nach Abschluß der Phase des physiologischen Neurontodes die Ziliarganglien bFGF-behandelter Tiere signifikant mehr Neurone enthalten als die Ziliarganglien der Kontrolltiere. Die Gabe von bFGF erhöht die Anzahl Überlebender Neurone von 56% auf 85%. Dies ist der erste Nachweis einer Beeinflussung des neuronalen Zelltodes in einem parasymphatischen cholinergen Ganglion durch bFGF in vivo. Diese Überlebenssteigernde Wirkung könnte theoretisch auf eine gesteigerte Proliferation oder aber einen verminderten neuronalen Zelltod zurückzuführen sein. Ab dem Embryonaltag E6 sind jedoch keine Vorläufer-Zellen im Ziliarganglion mehr vorhanden, und die Proliferation ist vor Beginn der Differenzierung und des neuronalen Zelltodes abgeschlossen (ROHRER und THOENEN 1987). Eine mitogene Wirkung von bFGF auf neuronale Präkursorzellen ist somit zu diesem Zeitpunkt ausgeschlossen.

Bestätigt wird dies durch die Auswertung der Autoradiogramme: Ziliarganglien bFGF-behandelter Tiere und der Kontrolltiere weisen keine Markierungen der Neurone mit ^3H -Thymidin als Zeichen ablaufender Mitose auf.

Somit ist die höhere Neuronzahl am Embryonaltag E14 auf eine Reduktion des ontogenetischen neuronalen Zelltodes durch bFGF zurückzuführen.

Auch an Mäuseembryonen wird der neuronale Zelltod im Ziliarganglion durch bFGF-Applikation in vivo signifikant reduziert (HENDRY et al. 1990). Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von OPPENHEIM et al. (1990, 1992), die keinen überlebensfördernden Effekt von bFGF auf CG-Neurone des Hühnerembryos fanden. Dieses widersprüchliche Ergebnis läßt sich nicht durch Unterschiede in der Dosierung erklären: OPPENHEIM et al. (1990, 1992) testeten verschiedene Dosierungen von bFGF in vivo.

Bei der Planung der vorliegenden Experimente am Ziliarganglion wurde eine Dosierung von bFGF gewählt, die an Experimente von HAMBURGER et al. (1981) mit NGF am Spinalganglion angelehnt war und zu einer deutlichen Verringerung des neuronalen Zelltodes geführt hatte. Auch HOFER und BARDE (1988) hatten bei ihren Experimenten mit BDNF am Ganglion nodosum mit vergleichbaren Mengen eine signifikante Reduktion des neuronalen Zelltodes erzielt.

Unterschiedliche Fixierungsmethoden kommen ebenfalls als Begründung dieser abweichenden Ergebnisse nicht in Frage.

Da sich Unterschiede bzw. Mängel in der Fixierung sowohl auf bFGF-behandelte als auch auf Kontrolltiere auswirken müßten, ist es zwar denkbar, daß die absolut gezählten Zahlen differieren; die Relation der gezählten Neurone in den Ziliarganglien behandelter und unbehandelter Tiere zueinander bliebe jedoch gleich. Hinzu kommt, daß die an E8 bzw. E14 ermittelten Neuronenzahlen der unbehandelten Tiere den in der Literatur über den ontogenetischen Zelltod angegebenen Zahlen entsprechen (LANDMESSER und PILAR 1974, HAMBURGER und OPPENHEIM 1982, OPPENHEIM 1985). Zählfehler sind unwahrscheinlich, da die vorgelegten Zahlen durch eine zweite Person kontrolliert wurden, die ebenfalls blind, d.h. ohne Kenntnis der jeweiligen Behandlung, die Ziliarganglien auszählte.

4.2. Direkte oder indirekte Wirkung von bFGF

Neben einer direkten Wirkung von bFGF auf die Neurone ist ein indirekter Wirkmechanismus durch Beeinflussung des Zielorgans Ziliarmuskel oder der Glia im Ziliarganglion möglich.

Basischer FGF ist in weiten Bereichen des zentralen und peripheren Nervensystems (JANET et al. 1987, PETTMANN et al. 1986, WESTERMANN et al. 1990) und auch in den Zielorganen, wie zum Beispiel der quergestreiften Muskulatur, nachweisbar (LOBB 1988). Das Protein besitzt ein vielfältiges Wirkungsspektrum, wie zum Beispiel mitogene und angiogene Aktivität (THOMAS und GIMENEZ-GALLEGO 1986). Deshalb sind verschiedene indirekte Wirkmechanismen denkbar:

So könnte bFGF die Menge anderer endogener trophischer Faktoren erhöhen, die von der Glia oder vom Zielorgan produziert werden. Des Weiteren könnte bFGF aufgrund seiner mitogenen Wirkung über die Vergrößerung des Zielorgans oder Vermehrung der Glia einen Einfluß auf den neuronalen Zelltod ausüben.

4.2.1. Beeinflussung des Zielorgans durch bFGF

Bei der morphologischen Untersuchung des Zielorgans, also des Ziliarmuskels im Auge, finden sich keine Unterschiede hinsichtlich der Größe und des Gefüges der Muskulatur zwischen bFGF-behandelten und den Kontrolltieren. Auch ist in den histologischen Autoradiogrammen kein vermehrter ³H-Thymidin-Einbau als Zeichen vermehrter DNA-Synthese bzw. verstärkter Mitosetätigkeit im Ziliarmuskel erkennbar.

Daß anhand der oben genannten Versuche keine sichtbaren Veränderungen des Ziliarmuskels vorhanden sind, macht einen indirekten Mechanismus über Veränderungen am Zielorgan bei der überlebensfördernden Wirkung von bFGF auf Ziliarganglienneurone unwahrscheinlich, schließt ihn jedoch nicht mit Sicherheit aus. Zwar können keine Zeichen gesteigerter Proteinsynthese im Muskel, wie z.B. die Zunahme von Ribosomen im elektronenmikroskopischen Bild, gefunden werden, biochemische Veränderungen in den Wechselbeziehungen zwischen Zielorgan und neuronaler Struktur werden allerdings mit den vorliegenden Versuchen nicht erfaßt.

4.2.2. Beeinflussung der Gliazellen durch bFGF

Die morphologische Untersuchung der Glia im Ziliarganglion zeigt keine Unterschiede zwischen bFGF-behandelten und Kontrolltieren. Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der Ziliarganglien ist zwar eine deutlich erhöhte Neuronendichte, jedoch keine Zunahme von Gliazellen nachweisbar. Die Autoradiographie des Ziliarganglions weist keine vermehrte Markierung im Bereich der Glia und somit ebenfalls keine vermehrte Gliaproliferation auf.

So geben auch diese Ergebnisse keinen Hinweis auf einen indirekten Wirkungsmechanismus, sie sprechen vielmehr für eine direkte Wirkung von bFGF auf CG-Neurone.

Untersuchungen zum Vorkommen von bFGF in Gliazellen erbrachten bisher widersprüchliche Ergebnisse: Einige Autoren weisen bFGF allein in Neuronen, nicht aber in Glia nach (PETTMANN et al. 1986, JANET et al. 1987). Andere zeigen durchaus bFGF-Expression in Gliazellen (FERRARA et al. 1988).

So sind zwei Mechanismen hinsichtlich der Wirkung von bFGF auf Glia und Neurone denkbar:

- a) Basischer FGF kommt in Gliazellen vor und beeinflusst die Wechselbeziehungen zwischen Gliazellen und Neuronen.
- b) Basischer FGF kommt zwar nicht in Gliazellen vor, übt aber verschiedene Effekte auf diese aus, so daß z.B. die Gliazellen ihrerseits Faktoren produzieren und sezernieren, die als physiologische NTFs wirken oder die bFGF-Wirkung auf Neurone modifizieren bzw. verstärken.

In vitro wurden zahlreiche Belege für bFGF-Effekte an Gliazellen erbracht, die vorwiegend Proliferation und Differenzierung betreffen (WESTERMANN et al. 1990).

So fand VACA (1989) eine gesteigerte Proliferation von Schwann-Zellen in bFGF-behandelten Kulturen dissoziierter Ziliarganglien. OPPENHEIM et al. (1990, 1992) berichteten von gesteigerter Mitose nichtneuronaler Zellen des Ziliarganglions in vivo nach bFGF-Applikation.

Diese Untersuchungen lassen jedoch nicht den Schluß zu, daß die Gliaproliferation für die Überlebensfördernde Wirkung von bFGF auf CG-Neurone zwingend verantwortlich ist. Zum einen finden OPPENHEIM et al. (1990, 1992) trotz gesteigerter Proliferation nichtneuronaler Zellen unter dem Einfluß von bFGF keine gesteigerte Überlebensrate von Neuronen.

UNSICKER et al. (1987) konnten hingegen die Überlebensfördernde Wirkung von bFGF in vitro an praktisch gliafreien Kulturen beobachten. Zu vergleichbaren Resultaten kommt WALICKE (1988), die an Kulturen verschiedener ZNS-Neurone trophische Wirkungen von bFGF beobachtete, wobei die Kontamination der Kulturen durch Astrozyten weniger als 2% betrug.

Sie fand eine von Gliazellen unabhängige Wirkung von bFGF auf kultivierte Neurone des Hippocampus (WALICKE und BAIRD 1987).

4.2.3. FGF-Rezeptoren

Für FGF sind früher zwei Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität zu bFGF beschrieben worden (GOSPODAROWICZ et al. 1986). Der Nachweis dieser Rezeptoren bzw. der für ihre Synthese erforderlichen Rezeptor-mRNA an Neuronen spräche für einen eher direkten Wirkungsmechanismus von bFGF.

Durch in situ Hybridisierung wurde in der Tat ein weit verbreitetes Vorkommen der Rezeptor-mRNA innerhalb des ZNS nachgewiesen. Dabei scheint das Vorkommen der Rezeptor-mRNA in der

erwachsenen Ratte vorwiegend auf neuronale Zellen beschränkt zu sein (WANAKA et al. 1990).

Im Ziliarganglion der embryonalen Ratte fanden WANAKA et al. (1991) allerdings keine Hinweise auf ein Vorkommen von Rezeptor-mRNA. In dieser Arbeit wurde hinsichtlich des Ziliarganglions leider nur der Embryonaltag 17 berücksichtigt. Die Frage des Vorkommens von Rezeptor-mRNA im embryonalen Hühnchen und insbesondere zum Zeitpunkt des ontogenetischen Neurontodes muß hingegen noch geklärt werden.

4.3. Ausmaß der Reduktion des ontogenetischen Neurontodes

Es stellt sich die Frage, warum der physiologische Zelltod nicht völlig aufgehalten werden kann. So ist es denkbar, daß die beiden Subpopulationen der CG-Neurone, die ziliaren und die choroidalen Neurone (LANDMESSER und PILAR 1974), in unterschiedlichem Ausmaß durch bFGF gerettet werden. Unterschiede in Rezeptorausstattung und Metabolismus könnten hierbei eine Rolle spielen.

Eine Immunisierung der Hühnerembryonen gegen den verwendeten rekombinanten bFGF kann nicht völlig ausgeschlossen werden. Der hohe Anteil geretteter Neurone macht dies jedoch unwahrscheinlich und spielt bei anderen Experimenten mit neurotrophen Faktoren bisher keine Rolle (HOFER und BARDE 1988).

Eine Dosissteigerung hätte evtl. zu einer noch höheren Zahl überlebender Neurone geführt.

4.4. Einfluß von bFGF auf die Transmittersynthese

Neben der Überlebens- und wachstumsfördernden Wirkung von bFGF verdient noch ein weiterer Aspekt Beachtung: basischer FGF vermag die ChAT-Aktivität mehrerer cholinergischer Populationen zu steigern.

So fanden McMANAMAN et al. (1989) eine Steigerung der ChAT-Aktivität an kultivierten Rückenmarksneuronen, was durch GROTHE et al. (1992) in vivo bestätigt werden konnte. Schon 1987 konnten UNSICKER et al. eine Steigerung der ChAT-Aktivität an kultivierten CG-Neuronen beobachten. Der Aspekt der Transmittersynthesebeeinflussung ist in der bisherigen NTF-Definition nicht explizit enthalten. Auch für andere NTFs bzw. für Proteine, die als NTF in Frage kommen, konnten Effekte am Transmittermetabolismus festgestellt werden (THOENEN und BARDE 1980, HAYASHI et al. 1985, McMANAMAN et al. 1989 und 1990).

4.5. Die Rolle von bFGF als NTF

Der Nachweis, daß bFGF neben der in vitro-Wirksamkeit auch in vivo den ontogenetischen neuronalen Zelltod signifikant verhindert, ist ein wichtiger Schritt zur Etablierung von bFGF als NTF.

Basischer FGF kommt in Neuronen des ZNS, und zwar sowohl in den Perikaryen als auch in den Zellfortsätzen (PETTMANN et al. 1986, JANET et al. 1987) vor. Zusammen mit dem Nachweis von bFGF in quergestreifter Muskulatur (SILVERSTEIN et al. 1989), aus der auch der Ziliarmuskel besteht, entspricht dies den Modellvorstellungen über die Produktion neurotropher Faktoren im Zielorgan mit Transport zum innervierenden Neuron.

Ein weiterer wichtiger Punkt für die Etablierung von bFGF als NTF besteht im Nachweis des retrograden axonalen Transports. So konnten GROTHE und UNSICKER (1992) radioaktiv markierten bFGF im Kerngebiet des N. hypoglossus nach Applikation des Faktors in die Zunge lokalisieren. Auch im zentralen Nervensystem konnten FERGUSON et al. (1990) retrograden axonalen Transport von bFGF zeigen.

Jedoch bleiben zur endgültigen Einordnung von bFGF als NTF noch einige Fragen offen. Zum Beispiel müssen noch Auswirkungen der Anwendungen von gegen bFGF gerichteten Antikörpern untersucht werden. Allerdings könnte die in vivo-Applikation eines entsprechenden Antikörpers auf die Chorionallantois-Membran des Hühnerembryos - analog zur bFGF-Applikation - Schwierigkeiten in der Interpretation bergen.

Aufgrund der Blockade der vielfältigen Wirkungen des bFGF würde der Hühnerembryo so ausgeprägte degenerative Veränderungen zeigen, daß spezifisch neuronale Vorgänge nicht eindeutig davon zu trennen wären. In der Tat fanden LIU et al. (1988) eine Reduktion von Körpergewicht, Proteingehalt und DNA in mit anti-bFGF behandelten Rattenembryonen.

In einem Punkt steht die Betrachtung von bFGF als NTF in eindeutigem Widerspruch zur gängigen NTF-Definition: Gefordert ist, daß die Neurone im Wettbewerb um einen NTF stehen, der vom Zielorgan in limitierter Menge produziert wird. Basischer FGF ist jedoch in zahlreichen Organen in größeren Mengen vorhanden (WESTERMANN et al. 1990, LOBB 1988).

Die Forderung der limitierten NTF-Produktion durch das Zielorgan erfüllt bisher jedoch nur NGF. Deshalb wurde eine Modifikation dieses Aspekts in der Hinsicht vorgeschlagen, daß nicht die Produktion, sondern allgemein die Verfügbarkeit eines NTFs für Neurone limitiert ist (OPPENHEIM 1989).

Dies kann durch verschiedene Mechanismen bedingt sein: Neben der begrenzten Produktion können auch eingeschränkte Freisetzung durch das Zielorgan oder geringe Aufnahme durch das betreffende Neuron die Verfügbarkeit einschränken.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß bFGF kein klassisches Exkretionsprotein darstellt, da die dafür typische Signalsequenz am N-terminalen Ende fehlt, wodurch eine Freisetzung aus dem Zielorgan limitiert werden könnte. Eine geringe Aufnahme von bFGF im Bereich der Synapsen kann durch eingeschränkte Kollateralenbildung oder noch unbekannte Vorgänge an den Rezeptoren verursacht werden.

Unterschiede in der Verfügbarkeit könnten außerdem erklären, daß bFGF trotz der nahezu ubiquitären Verteilung selektiv das Überleben ausgewählter Neuronengruppen fördert (MORRISON et al. 1988). Einige, wie z.B. Rückenmarksmotoneurone, werden trotz des Vorkommens von bFGF im Zielorgan Muskel zwar in vitro, nicht jedoch in vivo durch exogen applizierten bFGF hinsichtlich ihrer Überlebensrate beeinflusst (OPPENHEIM et al 1990, GROTHE et al. 1991, ARAKAWA et al. 1990).

Die NTF-Definition wurde anhand der Eigenschaften des NGF aufgestellt. Obwohl mittlerweile einige Faktoren mit neurotropher Wirkung bekannt sind, ist NGF bisher der einzige, der alle Punkte der Definition erfüllt. Mittlerweile wurden für zahlreiche Proteine eindeutige neurotrophe Wirkungen bzgl. des physiologischen Zelltodes, in Läsionsmodellen und in Hinsicht auf die Transmittersynthese nachgewiesen - dazu gehören BDNF, CNTF und nicht zuletzt bFGF (BARDE und THOENEN 1985, BARDE 1989, WEWETZER et al. 1990). Sie alle erfüllen jedoch jeweils nur Teilaspekte der NTF-Definition.

Aus diesem Grunde erscheint es sinnvoll, die NTF-Definition so zu erweitern, daß zwar einerseits nicht die Kompetitionshypothese aufgegeben wird, andererseits aber Faktoren mit eindeutiger NTF-Wirkung auch als solche betrachtet werden können.

Dieses ist zu erreichen, indem statt begrenzter Produktion durch das Zielorgan begrenzte Verfügbarkeit des Faktors für das Neuron gefordert wird.

Des Weiteren sollte überlegt werden, ob - zusätzlich zu den etablierten Kriterien für NTFs - eine nachweisbare Wirkung auf den Transmitterstoffwechsel mit zu berücksichtigen ist.

4.6. Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren

Die Wirkung der Peptidwachstumsfaktoren im einzelnen können sicher nicht isoliert betrachtet werden. Interessant sind in diesem Zusammenhang Beobachtungen, die zeigen, daß zwei Peptidfaktoren mit neurotropher Wirkung, an bestimmten Nervenstrukturen gemeinsam appliziert, additiv wirken können.

Beispielsweise wirken NGF und BDNF an sensorischen Ganglien hinsichtlich der Überlebensfördernden Wirkung synergistisch (BARDE 1989). Auch steigern bFGF und CNTF additiv die Cholinacetyltransferaseaktivität (ChAT) im Rückenmark in vitro (McMANAMAN et al. 1990), und nicht zuletzt verhindern bFGF und CNTF das Absterben kultivierter Motoneurone des Rückenmarks in stärkerem Ausmaß als ein Faktor alleine (ARAKAWA et al. 1990). Das System der vielfältigen agonistischen und antagonistischen Wechselwirkungen bedarf somit noch weiterer Untersuchungen.

5. ZUSAMMENFASSUNG:

Im Verlauf der Entwicklung des Nervensystems kommt es nach einer Proliferations- und einer Differenzierungsphase auch zu einem Absterben von im Überschuß angelegten Neuronen. Dieser ontogenetische Neurontod ist an zahlreichen Neuronpopulationen des zentralen und peripheren Nervensystems nachweisbar und variiert hinsichtlich Ausmaß und Zeitpunkt.

Reguliert wird der neuronale Zelltod durch neurotrophe Faktoren (NTFs), die vom Zielorgan der betreffenden Neurone produziert und spezifisch retrograd axonal zu den Neuronen transportiert werden, wo sie dann ihren überlebensfördernden Einfluß ausüben. Der zuerst entdeckte und bisher am besten untersuchte neurotrophe Faktor ist der Nervenwachstumsfaktor (NGF). Der ontogenetische Neurontod des Ziliarganglions wird durch NGF jedoch nicht beeinflusst.

Im Ziliarganglion des embryonalen Hühnchens findet der ontogenetische Neurontod zwischen den Embryonaltagen E8 und E14 statt. Dabei gehen ca. 50% der zuvor angelegten Neurone wieder verloren. Ein neurotropher Faktor war bisher für diese Neuronpopulation nicht bekannt.

Basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) fördert das Überleben kultivierter Ziliarganglienneurone.

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß der basische Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) nicht nur an kultivierten Neuronen des Ziliarganglions einen überlebensfördernden Einfluß ausübt, sondern auch in vivo, zum Zeitpunkt des ontogenetischen Zelltodes appliziert, den physiologischen Zelltod signifikant reduziert. Dabei werden 66% der normalerweise absterbenden Neurone gerettet.

Des weiteren wird gezeigt, daß diese Reduktion des ontogenetischen Zelltodes am ehesten auf direktem Wege erfolgt und nicht indirekt über eine Beeinflussung der Proliferation der Glia oder des Zielorgans.

So zeigen Untersuchungen des Zielorgans, in diesem Fall des Ziliarmuskels im Auge, und der Glia des Ziliarganglions, keine Unterschiede hinsichtlich der Morphologie und Proliferationsrate zwischen bFGF-behandelten Hühnerembryonen und Kontrolltieren. Eine direkte Wirkung des Faktors auf die CG-Neurone ist somit wahrscheinlich.

Abschließend wird über die Zuordnung von bFGF in die Gruppe der neurotrophen Faktoren diskutiert und mit anderen als NTF in Frage kommenden Proteinen verglichen.

Hiermit wird gezeigt, daß bFGF nicht nur ein weites mitogenes und angiogenetisches Wirkungsspektrum besitzt, sondern neben neurotrophen Wirkungen bei Reparationsvorgängen in Läsionsmodellen auch bei der Regulation des physiologischen Neurontodes eine wichtige Rolle spielen kann.

6. LITERATURVERZEICHNIS:

- ANDERSON, K.J., DAM, D., LEE, S., COTMAN, C.W. (1988):
Basic fibroblast growth factor prevents death of lesioned cholinergic neurons in vivo
Nature 332: 360-361
- ARAKAWA, Y., SENDTNER, M., THOENEN, H. (1990):
Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines
J. Neurosci. 10: 3507-3515
- BAIRD, A., ESCH, F., MORMEDE, P., UENO, N., LING, N., BÖHLEN, P., YING, S.-Y., WEHRENBURG, W.B., GUILLEMIN, R. (1986):
Molecular characterization of fibroblast growth factor: distribution and biological activities in various tissues
Recent Progr. Hormone Res. 42: 143-205
- BARBIN, G., MANTHORPE, M., VARON, S. (1984):
Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor
J. Neurochem. 43: 1488-1478
- BARDE, Y.A., THOENEN, H. (1985):
Neurotrophic factors
Hormones and Cell Regulation 9: 385-390
- BARDE, Y.A. (1989):
Trophic factors and neuronal survival
Neuron 2: 1525-1534
- BLOTTNER, D., WESTERMANN, R., GROTHE, C., BÖHLEN, B., UNSICKER, K. (1989):
Basic fibroblast growth factor in the adrenal gland: possible trophic role for preganglionic neurons in vivo
European J. Neurosci. 1: 471-478
- BOURNE, J.A.
Handbook of immunoperoxidase staining methods
Immunochemistry laboratory DAKO corp.
- CLARKE, P.G.H. (1985):
Neuronal death in the development of the vertebrate nervous system
Trends in Neurosci. 8: 345-349
- CLARKE, P.G.H., HORNUNG, J.P. (1989):
Changes in the nuclei of dying neurons as studied with thymidine autoradiography
J. Comp. Neurol. 283: 438-449
- CUNNINGHAM, T.J. (1982):
Naturally occurring neuron death and its regulation by developing neural pathways
Int. Rev. Cyt. 74: 163-186

- DAHL, D., BIGNAMI, A. (1985):
Intermediate filaments in nervous tissue
ed. SHAY, J.W.
Cell and muscle motility
Plenum publishing corporation 6: 75-96
- FERGUSON, I.A., WANAKA, A., JOHNSON, E.M. Jr. (1990):
BFGF undergoes receptor-mediated retrograde transport in CNS neurons
Neurosci. Soc. Abstr. 16: 824
- FERRARA, N., OUSLEY, F., GOSPODAROWICZ, D. (1988):
Bovine brain astrocytes express basic fibroblast growth factor, neurotrophic and angiogenic mitogen
Brain Res. 462: 223-232
- GOSPODAROWICZ, D., NEUFELD, G., SCHWEIGERER, L. (1986):
Molecular and biological characterization of fibroblast growth factor, an angiogenic factor which also controls the proliferation and differentiation of mesoderm and neuroectoderm derived cells
Cell Diff. 19: 1-17
- GROTHE, C., OTTO, D., UNSICKER, K. (1989):
Basic fibroblast growth factor promotes in vitro survival and cholinergic development of rat septal neurons: comparison with the effects of nerve growth factor
Neurosci. 31: 649-661
- GROTHE, C., WEWETZER, K., LAGRANGE, A., UNSICKER, K. (1991):
Effects of basic fibroblast growth factor on survival and choline acetyltransferase development of spinal cord neurons
Dev. Brain Res. 62: 257-261
- GROTHE, C., UNSICKER, K. (1992):
Basic fibroblast growth factor in the hypoglossal system: specific retrograde transport, trophic and lesion-related responses
im Druck
- HAHN, E.J. (1983):
Autoradiography, a review of basic principles
American laboratory
- HAMBURGER, V., HAMILTON, H.L. (1951):
A series of normal stages in the development of chick embryo
J. Morphol. 88: 49-92
- HAMBURGER, V. (1975):
Cell death in the development of the lateral motor column of the chick embryo
J. Comp. Neurol. 160: 535-546
- HAMBURGER, V., BRUNSO-BECHTHOLD, J.K., YIP, J.P. (1981):
Neuronal death in the spinal ganglia of the chick embryo and its reduction by nerve growth factor
J. Neurosci. 1: 60-71
- HAMBURGER, V., OPPENHEIM, R.W. (1982):
Naturally occurring neuronal death in vertebrates
Neurosci. Com. 1: 39-55

- HARMS, V. (1982):
Statistische Testverfahren
Biomathematik, Statistik und Dokumentation 128-136
- HAYASHI, M., EDGAR, D., THOENEN, H. (1985):
Nerve growth factor changes the relative levels of neuropeptides
in developing sensory and sympathetic ganglia of the chick embryo
Dev. Biol. 108: 49-55
- HENDRY, I. A., BELFORD, D. A., CROUCH, M. F., HILL, C. E. (1990):
Parasympathetic neurotrophic factors
Int. J. Dev. Neurosci., Abstr. 8th Bienn. Meeting ISDN: 43
- HOFER, M. M., BARDE, Y.-A. (1988):
Brain derived neurotrophic factor prevents neuronal death in vivo
Nature 331: 261-262
- JANET, T., MIEHE, M., PETTMANN, B., LABOURDETTE, G.,
SENSENBRENNER, M. (1987):
Ultrastructural localization of fibroblast growth factors in
neurons of rat brain
Neurosci. Letters 80: 153-157
- JOSEPH-SILVERSTEIN, J., CONSIGLI, S. A., LYSER, K. M.,
PAUDT, C. V. (1989):
Basic fibroblast growth factor in the chick embryo:
Immunolocalization to striated muscle cells and their precursors
J. Cell. Biol. 108: 2459-2466
- KARDAMI, E., SPECTOR, D., STROHMANN, R. D. (1985):
Myogenic growth factor present in skeletal muscle is purified by
heparin affinity chromatography
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8044-8047
- LANDMESSER, L., PILAR, G. (1974):
Synaptic transmission and cell death during normal ganglionic
development
J. Physiol. 241: 737-749
- LEHWALDER, D., JEFFREY, P. L., UNSICKER, K. (1989):
Survival of purified embryonic chick retinal ganglion cells
in the presence of neurotrophic factors
J. Neurosci. Res. 24: 329-337
- LEVI-MONTALCINI, R., HAMBURGER, V. (1951):
Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the
sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo
J. Exp. Zool. 116: 321-362
- LEVI-MONTALCINI, R. (1966):
The nerve growth factor: its mode of action on sensory and
sympathetic nerve cells
Harvey Lect. 60: 217-259
- LIU, L., NICOLL, C. S. (1988):
Evidence for a role of basic fibroblast growth factor in rat
embryonic growth and differentiation
Endocrinology 123: 2027-2031

- LOBB, R. R. (1988):
Clinical applications of heparin-binding growth factors
Europ. J. Clinical Invest. 18: 321-336
- McMANAMAN, J., CRAWFORD, F., CLARK, R., RICHKER, J., FULLER, F. (1989):
Multiple neurotrophic factors from skeletal muscle: demonstration
of effects of basic fibroblast growth factor and comparisons with
the 22-kilodalton choline acetyltransferase development factor
J. Neurochem. 53: 1763-1771
- McMANAMAN, J. L., OPPENHEIM, R. W., PREVETTE, D., MARCHETTI, D. (1990):
Rescue of motoneurons from cell death by a purified skeletal
muscle polypeptide: effects of the CHAT development factor, CDF
Neuron 4: 891-898
- MORRISON, R. S., KEATING, R. F., MOSKAL, J. R. (1988):
Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor exert
differential trophic effects on CNS neurons
J. Neurosci. Res. 21: 71-79
- OPPENHEIM, R. W. (1981):
Neuronal cell death and some related regressive phenomena during
neurogenesis: a selective historical review and progress report
(COWAN, W. M., ed) New York 1981, 74-133
- OPPENHEIM, R. W. (1985):
Naturally occurring cell death during neural development
Trends in Neurosci. 11: 487-493
- OPPENHEIM, R. W. (1989):
The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death
Trends in Neurosci. 12: 252-255
- OPPENHEIM, R. W., PREVETTE, D., FULLER, F. H. (1990):
In vivo treatment with basic fibroblast growth factor during
development does not alter naturally occurring neuronal death
Abstr. Soc. Neurosci. 16: 1135
- OPPENHEIM, R. W., PREVETTE, D., FULLER, F. H. (1992):
The lack of effect of basic and acidic fibroblast growth factors
on the naturally occurring death of neurons in the chick embryo
J. Neurosci. 12: 2726-2734
- OTTO, D., UNSICKER, K., GROTHE, C. (1987):
Pharmacological effects of nerve growth factor and fibroblast
growth factor applied to the transected sciatic nerve on neuron
death in adult rat dorsal root ganglia
Neurosci. Letters 83: 156-160
- OTTO, D., FROTSCHER, M., UNSICKER, K. (1989):
Basic fibroblast growth factor and nerve growth factor
administered in gel foam rescue medial septal neurons after
fimbria fornix transection
J. Neurosci. Res. 22: 83-91
- OTTO, D., UNSICKER, K. (1990):
Basic FGF reverses chemical and morphological deficits in the
nigrostriatal system of MPTP treated mice
J. Neurosci. 10: 1912-1921

PETTMANN, B., LABOURDETTE, G., WEIBEL, M., SENSENBRENNER, M. (1986):
The brain fibroblast growth factor (FGF) is localized in neurons
Neurosci. Letters 68: 175-180

PETTMANN, B., GENSBURGER, C., WEIBEL, M., PERRAUD, F.,
SENSENBRENNER, M., LABOURDETTE, G. (1987):
Isolation of two astroglial growth factors from bovine brain:
comparison with other growth factors: cellular localization.
NATO ASI Series H2: 451-478

PICKEL, V.M. (1981):
Immunocytochemical methods
ed. HEIMER, L., ROBARDS, M.J
Neuroanatomical tract tracing methods
Plenum press, New York, London 483-508

RICHARDSON, K.C., JARRET, C., FINKE, E.H. (1960):
Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron
microscopy
Stain Technol. 35: 313-323

ROHRER, H., SOMMER, I. (1983):
Simultaneous expression of neuronal and glial properties by chick
ciliary ganglion cells during development
J. Neurosci. 3: 1683-1693

ROHRER, H., THOENEN, H. (1987):
Relationship between differentiation and terminal mitosis: chick
sensory and ciliary neurons differentiate after terminal mitosis
of precursor cells, whereas sympathetic neurons continue to divide
after differentiation
J. Neurosci. 7: 3739-3748

SEMBA, K., FIBIGER, H.C. (1988):
Time of origin of cholinergic neurons in the rat basal forebrain
J. Comp. Neurol. 269: 87-95

SENDTNER, M., KREUTZBERG, G.W., THOENEN, H. (1990):
Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor
neurons after axotomy
Nature 345: 440-441

SIEVERS, J., HAUSMANN, B., UNSICKER, K., BERRY, M. (1987):
Fibroblast growth factors promote the survival of adult rat
retinal ganglion cells after transection of the optic nerve
Neurosci. Letters 76: 157-162

THOENEN, H., BARDE, Y.A. (1980):
Physiology of nerve growth factor
Physiol. Rev. 60: 1284-1335

THOENEN, H., BANDTLOW, C., HEUMANN, R. (1987):
The physiological function of nerve growth factor in the central
nervous system: comparison with the periphery
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 109: 145-148

THOMAS, K.A., GIMENEZ-GALLEGO, G. (1986):
Fibroblast growth factors: broad spectrum mitogens with potent
angiogenic activity
Trends Biochem. Sci. 11: 1-4

UNSICKER, K., REICHERT-PREIBSCH, H., SCHMIDT, R., PETTMANN, B.,
LABOURDETTE, G., SENSENBRENNER, M. (1987):
Astroglial and fibroblast growth factors have neurotrophic
functions for cultured peripheral and central nervous system
neurons
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5459-5463

VACA, K., STEWART, S.S., APPEL, S.H. (1989):
Identification of basic fibroblast growth factor as a cholinergic
growth factor from human muscle
J. Neurosci. Res. 23: 55-63

VACA, K. (1989):
Developmental interactions of basic FGF and SCHWANN Cell
extracellular matrix with ciliary ganglion neuronal survival in
culture
Abstr. Soc. Neurosci. 15: 1260

WALICKE, P.A., BAIRD, A. (1987):
Neurotrophic effects of bFGF and aFGF are not mediated through
glial cells
Dev. Brain. Res. 40: 71-79

WALICKE, P.A. (1988):
Basic and acidic fibroblast growth factors have trophic effects on
neurons from multiple CNS regions
J. Neurosci. 8: 2618-2627

WALICKE, P.A. (1989):
Novel neurotrophic factors, receptors and oncogenes
Ann. Rev. Neurosci. 12: 103-126

WANAKA, A., JOHNSON, E.M., MILBRANDT, J. (1990):
Localization of FGF receptor mRNA in the adult rat central nervous
system by in situ hybridization
Neuron 5: 267-281

WANAKA, A., MILBRANDT, J., JOHNSON, E.M. (1991):
Expression of FGF receptor gene in rat development
Devel. 11: 455-468

WESTERMANN, R., GROTHE, C., UNSICKER, K. (1990):
Basic fibroblast growth factor (bFGF), a multifunctional growth
factor from neuroectodermal cells
J. Cell. Sci. 13: 97-117

WETMORE, C., ERNFORS, P., PERSSON, H., OLSON, L. (1990):
Localization of brain-derived neurotrophic factor mRNA to neurons
in the brain by in situ hybridization
Exp. Neurol. 109: 141-152

WEWETZER, K., MacDONALD, J. R., COLLINS, F., UNSICKER, K. (1990):
 CNTF rescues motoneurons from ontogenetic cell death in vivo, but
 not in vitro
 Neuro Report 1: 203-206

7. ANHANG

7.1 Chemikalien und Antikörper

anti-S100-Antikörper (aus Kaninchen)	(DAKO)
anti-O1/04-Antikörper (aus Maus)	(Prof. M. Schachner)
anti-Vimentin-Antikörper (aus Maus)	(BOEHRINGER, Mannheim)
anti-Kaninchen IgG (aus Schaf)	(SIGMA)
anti-Maus IgG (aus Ziege)	(SIGMA)
Araldit	(SERVA)
BFGF (basischer Fibroblastenwachstumsfaktor)	(PROGEN)
BSA (Rinderserumalbumin)	(SIGMA)
Corbitbalsam	(I. HECHT)
Cytochrom C	(SIGMA)
DAB (Diaminobenzidintetrahydrochlorid)	(SIGMA)
Entwickler D19	(KODAK)
Eosin	(CHROMA)
Essigsäure	(MERCK)
FITC (fluoreszierender Antikörper)	(SIGMA)
Formalin	(MERCK)
Gelatine	(MERCK)
Glutaraldehyd	(MERCK)
Glycerin	(MERCK)
Hämatoxylin	(MERCK)
H ₂ O (demineralisiert, Milli-Q System)	(Millipore)
KV (Kresylviolett)	(MERCK)
Methyl ³ H-Thymidin	(AMERSHAM, U.K.)
NTB-2-Emulsion	(KODAK)
PAP (Peroxidase-Antiperoxidase)	(SIGMA)
Paraplast	(MONOJECT SCI.)
PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)	(BICRHOM)
Paraplast	(MONOJECT SCI.)
Pikrinsäure	(MERCK)
Propylenoxid	(MERCK, SERVA)
Sacharose	(MERCK)
Tissue Tek	(MILES LAB.)
Tris-Puffer	(ROTH)
Triton X 100	(SIGMA)

7.2. Lösungen

Pufferlösung nach SÖRENSEN, pH 7,8:

10ml 0,1M KH₂PO₄

90ml 0,1M Na₂HPO₄

Aralditgemisch:

91 Teile Araldit M

84 Teile DDSA

Methylenblau nach RICHARDSON:

100ml Aqua dest. mit 1g Natriumtetraborat
und 1g Methylenblau

100ml Aqua dest. mit Azur II

Chromalaun Gelatine

1,5% Gelatine in A.dest

0,1% KCr(SO₄)₂ in A.dest

7% Eisessig in A.dest

30% Äthanol in A.dest

7.3. Abbildungen

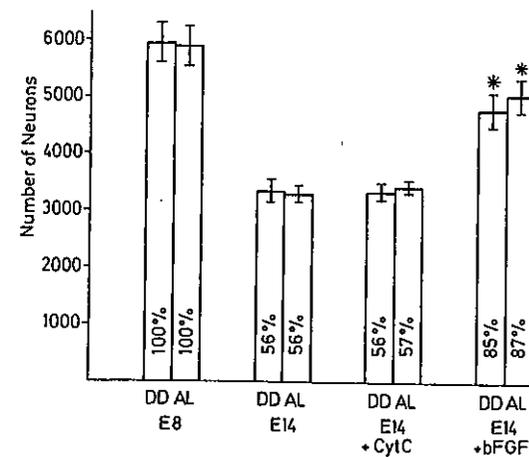


Abbildung 1:

Anzahl der CG-Neurone von Tieren an E8 und an E14 mit und ohne bFGF-Behandlung. Die Zählungen wurden von zwei Untersuchern durchgeführt (DD und AL).

P < 0,01 bzgl. E14+Cytochrom C und E14+bFGF

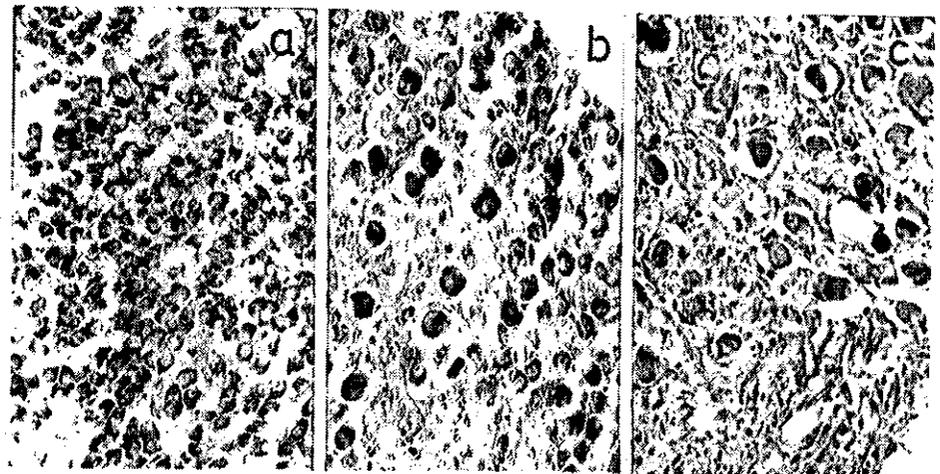


Abbildung 2:

Repräsentativer Querschnitt des Ganglion ciliare des Hühnerembryos an

a) E8

b) E14+bFGF

c) E14+Cytochrom C

Vergrößerung 125fach, Färbung Kresylviolett

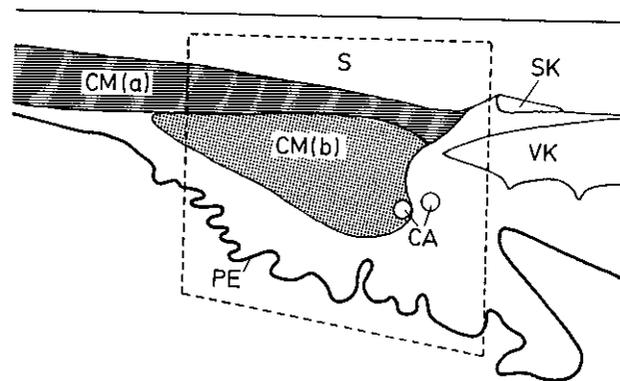
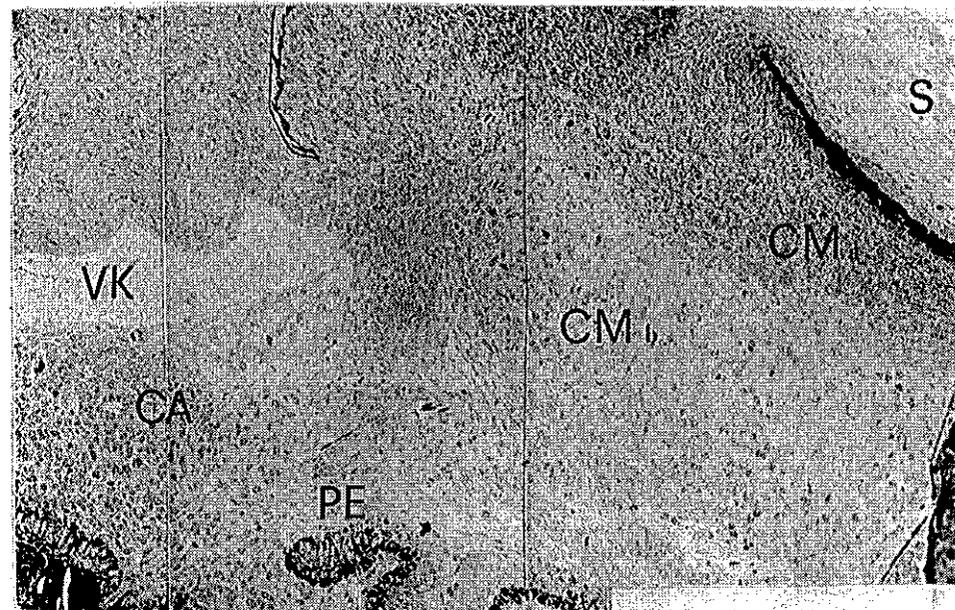
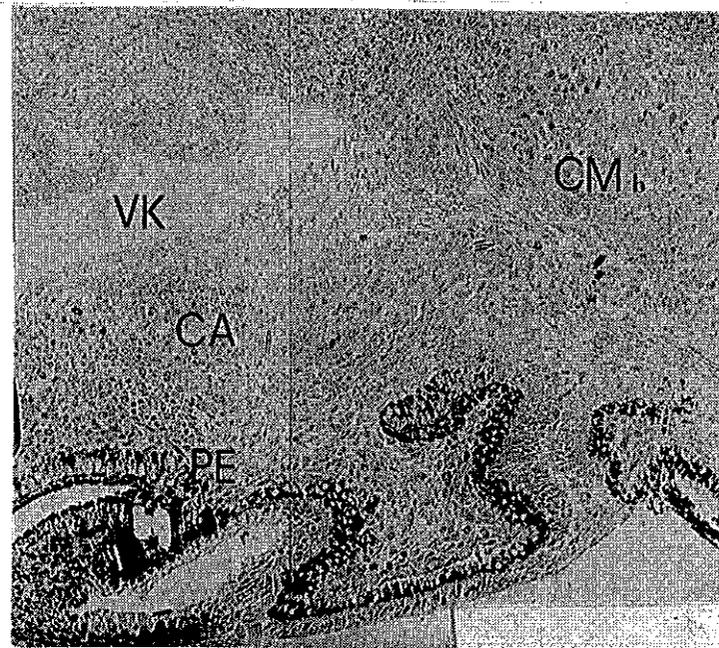


Abbildung 3:
Längsschnitt durch den Ziliarkörper und die Kammerwinkelregion des Auges.

- S Sklera
 SK SCHLEMMscher Kanal
 VK Vorderer Kammerwinkel
 CA Circulus arteriosus
 PE Pigmentepithel
 CM Ziliarmuskel:
 a) longitudinaler Anteil
 b) radiär und zirkulär verlaufender Anteil



Abbildungen 4:
Semidünnschnitte durch den Ziliarkörper des Auges nach Behandlung mit bFGF
 Färbung Methylenblau nach RICHARDSON
 Vergrößerung 326fach

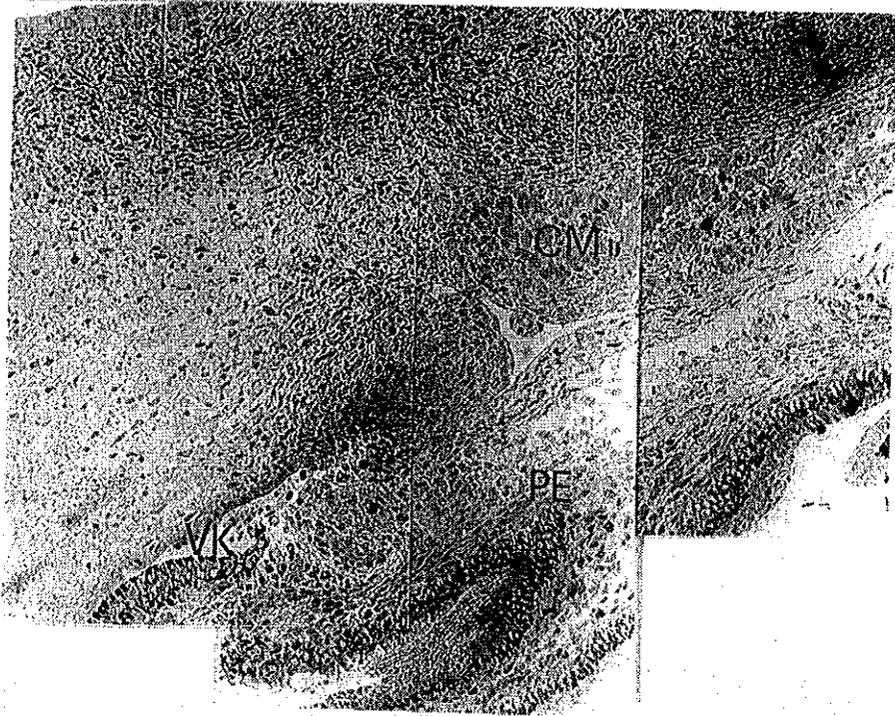


Abbildung 5:
Semidünnschnitt durch den Ziliarkörper des Auges eines
Kontrolltieres
Färbung Methylenblau nach RICHARDSON
Vergrößerung 400fach

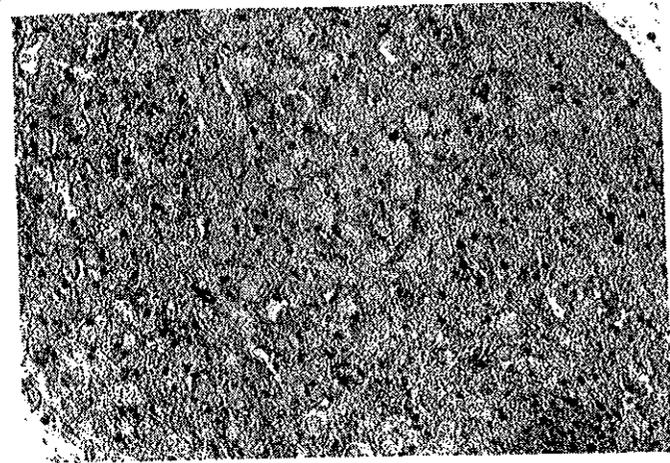


Abbildung 6a:
Autoradiographie des Ganglion ciliare am Tag E 14
eines Kontrolltieres
Vergrößerung 240 fach

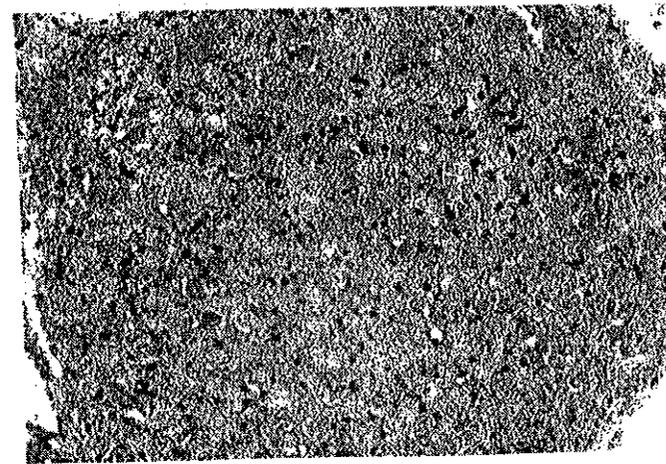


Abbildung 6b:
Autoradiographie des Ganglion ciliare am Tag E14
Behandlung mit bFGF
Vergrößerung 240 fach

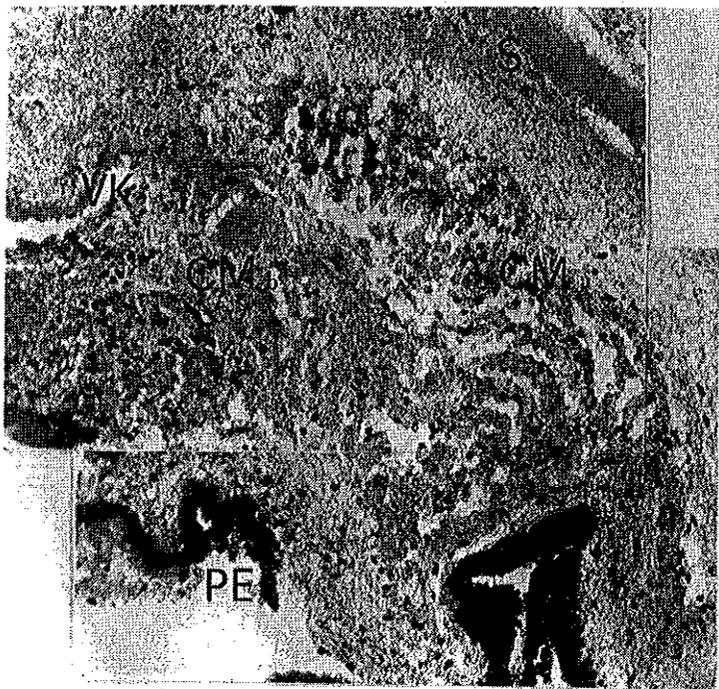


Abbildung 7a:
 Autoradiographie des Ziliarmuskels im Auge am Tag E14
 Behandlung mit bFGF, Vergrößerung 360 fach

- S = Sklera
 SK = SCHLEMMscher Kanal
 CA = Circulus arteriosus
 PE = Pigmentepithel
 CM = Ziliarmuskel:
 a) longitudinaler Anteil
 b) radiär und zirkulär verlaufender Anteil



Abbildung 7b:
 Autoradiographie des Ziliarmuskels im Auge am Tag E14
 Behandlung mit Cytochrom C, Vergrößerung 465 fach

8. DANKSAGUNG

Ich möchte mich herzlich bedanken bei Herrn Prof. Dr. Klaus Unsicker, Leiter der Abteilung für Neurobiologie am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg, der mir diese Arbeit überließ. Sein Interesse und seine Unterstützung haben sehr zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. habil. Claudia Grothe. Sie war bei anstehenden Problemen immer ansprechbar und äußerst hilfsbereit.

Des weiteren möchte ich meinen Dank gegenüber Herrn Christian Fiebiger aussprechen, der exzellente Zeichnungen und Grafiken anfertigte, sowie Frau Heidi Schneider, die wertvolle Hilfe bei den Fotoarbeiten leistete.

9. TABELLARISCHER LEBENSLAUF

Name:	Dorothea Luzia Dreyer
geboren:	30.08.1965 als Tochter von Ursel und Dr. Oskar Dreyer
Geschwister:	Matthias (geboren 1967) Michael (geboren 1970)
1971-1975	Besuch der Ludwig-Windhorst-Grundschule in Ostercappeln, Landkreis Osnabrück
1975-1977	Besuch der Orientierungsstufe in Ostercappeln
1977-1984	Besuch des Gymnasium Bad Essen
22.6.1984	Abitur
1984-1986	Studium der Humanmedizin an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
1986-1991	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg, Praktisches Jahr in Kassel und Dresden
24.4.1991	Beendigung des Studiums mit dem 3. Staasexamen
8/91-1/92	Ärztin im Praktikum am Tyrone County Hospital, Omagh, Nordirland
seit 2/92	Ärztin im Praktikum an den Städtischen Kliniken, Kassel

10. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren
Professor(inn)en und Dozent(inn)en

in Aachen:

Beier, Buse, Dallacker, Deuticke, Kammermeier, Kaufmann, Graf von
Keyserlingh, Schmidt, Schmidt-Schönbein

in Marburg:

Arnold, Bauer, Baum, Blankenburg, Brandis, Czekelius, Daume,
Dombrowski, Egbring, Friederich, Ganz, Gotzen, Gressner, Griss,
Grothe, Havemann, Hielscher, Hildebrandt, Hilgermann, Huffmann,
Kaffarnik, Kalbfleisch, Kleinsasser, Klenk, Kretschmer, Lange,
Lennartz, Maisch, Mannheim, Massarrat, Mennel, Netter, Oepen,
Remschmidt, Rodeck, Rothemund, Schüffel, Schulz, Straub, Stempel,
Schwerk, Thomas, v. Wichert, Ulshöfer, Unsicker, Zwisler

in Dresden:

Lauschke, Ludwig, Schubert

in Kassel:

Hirschmann, Lohrisch, Neuhaus, Pausch, Petres, Tönnis

11. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich
Humanmedizin Marburg zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem
Titel " Einfluß des basischen Fibroblastenwachstumsfaktors (bFGF)
auf den ontogenetischen Neurontod im Ziliarganglion
des embryonalen Hühnchens " im Institut für Anatomie und
Zellbiologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Unsicker mit
Unterstützung durch Frau Dr. rer. nat. habil C. Grothe ohne sonstige
Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine
andere als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel
benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen
Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch
die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation
vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit sind in folgendem Publikationsorgan
erschienen:

DREYER, D., LAGRANGE, A. GROTHE, C., UNSICKER, K. (1989):
Basic fibroblast growth factor prevents ontogenetic
neuron death in vivo
Neurosci. Letters 99: 35-38

Dorothea Dreyer

Marburg, den 10.12.1993