Preisverleihung 1979

STIFTUNG PROFESSOR DR. MAX CLOËTTA

Heft Nr. 7

Die strukturelle Organisation des genetischen Apparates höherer Organismen

Hormonal Control of the Differentiation of the Mammary Gland

STIFTUNG
PROFESSOR DR. MAX CLOËTTA

Sechste Preisverleihung

12. Dezember 1979
Zürich

Heft Nr. 7 der Schriftenreihe
Stiftung Professor Dr. Max Cloëtta
Kurhausstrasse 28, 8032 Zürich

INHALT

Begrüssung durch den Präsidenten des Stiftungsrates, Dr. Hans W. Kopp 5

Laudatio des ersten Preisträgers, Herrn Professor Dr. Theodor Koller, durch Herrn Professor Dr. Heinrich Ursprung 7

Urkunde für Herrn Professor Dr. Theodor Koller 9

Kurzbiographie von Herrn Professor Dr. Theodor Koller 11

Festvortrag von Herrn Professor Dr. Theodor Koller mit dem Thema: «Die strukturelle Organisation des genetischen Apparates höherer Organismen» 13

Laudatio des zweiten Preisträgers, Herrn Professor Dr. Jean-Pierre Kraehenbuehl, durch Herrn Professor Dr. Henri Isliker 39

Urkunde für Herrn Dr. Jean-Pierre Kraehenbuehl 43

Kurzbiographie von Herrn Professor Dr. Jean-Pierre Kraehenbuehl 45

Festvortrag von Herrn Professor Dr. Jean-Pierre Kraehenbuehl mit dem Thema: «Hormonal Control of the Differentiation of the Mammary Gland» 47

Übersicht über die bisher erschienenen Publikationen der Schriftenreihe Stiftung Professor Dr. Max Cloëtta 60

BEGRÜSSUNG ZUR PREISVERLEIHUNG VOM 12. DEZEMBER 1979

Hans W. Kopp

Namens des Stiftungsrats der Stiftung Professor Dr. Max Cloëtta begrüsse ich Sie zur sechsten Verleihung des Cloëtta-Preises.
Nachdem die letzten Preisverleihungsfeiern in Bern und in Genf sowie zweimal in Basel stattgefunden haben, kehrt mit dem heutigen Anlass die Stiftung an den Ort der ersten Feier und zugleich in die Stadt, in der sie gegründet wurde, zurück.
Ich bitte um das Verständnis aller Anwesenden dafür, dass wir in den letzten Jahren auf die namentliche Begrüssung einzelner Gäste und Ehrengäste zu verzichten begonnen haben und auch die Entschuldigungen, die uns zugekommen sind, nicht im einzelnen erwähnen.
Der herzliche Willkommgruss von uns allen gilt aber den beiden Preisträgern, den Herren Professor Dr. Jean-Pierre Kraehenbuehl und Dr. Theodor Koller. Wir beglückwünschen beide Herren und danken ihnen für die Leistungen, die sie in der medizinischen Forschung erbracht haben. Den Herren Professor Dr. Henri Isliker und Professor Dr. Heinrich Ursprung sind wir verbunden für ihre Bereitschaft, die Laudationes zu sprechen und uns also mit der Persönlichkeit und dem Werk der Preisträger näher vertraut zu machen. Wie immer sollen sowohl die Würdigungen als auch die Vorträge der Preisträger anschliessend in der Schriftenreihe der Stiftung Professor Dr. Max Cloëtta veröffentlicht werden. Dasselbe gilt für die Grussworte, die Herr Professor Isliker in Vertretung des Präsidenten des Forschungsrats des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Herrn Professor Olivier Reverdin, im Zusammenhang mit seiner Laudatio für Herrn Professor Krachenbuehl an uns richten wird.
In einer Beziehung unterscheidet sich das Jahr 1979 für uns heute von allen vorangegangenen Jahren. Erstmals werden von der Stiftung im selben Jahr zwei Preise verliehen. Lassen Sie mich diesem erfreulichen Umstand eine dreifache Deutung geben:

Zunächst möchten wir mit der Zuerkennung zweier Preise im selben Jahr, die aber voraussichtlich nicht zur Regel werden soll, den bevorstehenden schrittweisen Ausbau der Tätigkeit der Stiftung Professor Dr. Max Cloëtta andeuten. Gedacht ist in diesem Sinn beispielsweise an die Finanzierung von Forschungsprofessuren, womit im Rahmen einer sinnvollen Wissenschaftspolitik in einer Reihe ausgewählter Fälle wichtige und dringende Bedürfnisse befriedigt werden könnten.

Im weitern freuen wir uns ganz besonders darüber, dass die Preisträger, obschon sie beide währschafte deutschschweizerische Namen tragen, in verschiedenen Sprachgebieten der Schweiz tätig sind. Die Stiftung Professor Dr. Max Cloëtta hat sich von Anbeginn an als eine *nationale* Stiftung verstanden. Sie will und wird nach der Westschweiz, in der unser Stifter, Herr Dr. Antoine Cloëtta, einen grossen Teil seines Lebens zugebracht hat, offen sein und ihr genauso wie Persönlichkeiten und Institutionen in der deutschsprachigen Schweiz zu dienen versuchen.

Drittens erschien es dem Stiftungsrat, der wie in den Vorjahren die Preisverleihung eingehend und gründlich diskutiert hat, auch von den Persönlichkeiten der Preisträger her richtig, sie beide und gleichzeitig auszuzeichnen. Nachdem die beiden Kandidaten aus verschiedenen Richtungen mit gleichermassen überzeugenden Unterlagen nominiert worden waren, hätte es uns menschlich und fachlich leid getan, den einen der beiden Herren hinter den andern zurücktreten zu lassen. Beide Preise 1979 stehen für den Stiftungsrat auf genau derselben Stufe, die Reihenfolge der Würdigungen und der Preisübergabe heute abend schliesst keine Wertung oder Rangfolge ein.

Darf ich in diesem Sinn Herrn Professor Dr. Heinrich Ursprung bitten, uns nun zunächst seine Laudatio auf Herrn Professor Dr. Theodor Koller vorzutragen?

LAUDATIO FÜR PROFESSOR DR. THEODOR KOLLER

Professor Dr. H. Ursprung
Präsident der ETH Zürich

Biologen, vor allem unseres Jahrhunderts, haben die Wissenschaft des Lebens immer mehr von der Beschreibung zur Erklärung geführt. Der Motor dieses wissenschaftsgeschichtlichen Vorgangs findet sich vor allem in der philosophischen Grundhaltung vieler Biologen unserer Zeit, einem – mindestens was das Operationelle betrifft – Bekenntnis zum Reduktionismus. Das Komplizierte (die Zelle; der Organismus; das Zusammenwirken von Organismen mit ihrer Umwelt) lässt sich einfacher aus dem Einfachen (den Molekülen) erklären als umgekehrt. Zweiter Motor war und ist die Technik. Dem heutigen Biologen stellt die Technik ein Arsenal von Möglichkeiten zur Verfügung, von dem Kollegen noch vor wenigen Jahrzehnten kaum etwas ahnten.

Die sinnvolle Anwendung immer neuerer technischer Möglichkeiten fällt dem Biologen aber nicht in den Schoss. Er muss – das ist wohl der schwierigste Schritt – neue technische Möglichkeiten für die Lösung seiner Probleme *erkennen*. Er muss – und auch hier scheitern immer wieder Kollegen – neue technische Möglichkeiten anwenden *wollen*. Und schliesslich muss er – und hier sind viele gestrauchelt – sie anwenden *können*.

Professor Koller verdient hier mehrfaches Lob. Arzt von Hause aus, aber mit einem Drang, grundlegende biologische Vorgänge zu verstehen, hat er mit der Wahl seiner Untersuchungsobjekte ins Schwarze getroffen: Zellkerne, Chromosomen, Nukleinsäuren, Eiweisse – «where the business is», würde amerikanische Werbung davon sagen. Er hat sodann *erkannt*, dass Elektronenmikroskopie eine technische Möglichkeit bietet für tiefere Einsicht in sein Material; nicht Elektronenmikroskopie allein, aber Elektronenmikroskopie im Verbund mit präparativen und analytischen chemischen und physikalisch-chemischen Methoden und im Verbund mit

den modernsten Theorien und Praktiken elektronischer Bildauswertung. Er hat den *Willen* exerziert, diese Möglichkeiten anzuwenden, und er hat sich die nötigen *Kenntnisse* erworben, bei Lehrern zum Teil, im Inland und Ausland, und mehr noch allein und durch geschickte Auswahl von Mitarbeitern.

Die Ernte ist schon heute gross. Aus meiner Sicht gipfelt sie in grundlegenden Arbeiten zu jenem Vorgang, in welchem genetische Information kopiert und damit für das Leben der Zelle verwendbar gemacht wird. Sie umfasst aber zudem eigenständig-technische Arbeiten, die erst die methodische Voraussetzung für den Einsatz in biologischen Fragestellungen schaffen: die Entwicklung von störarmen Trägerfilmen, die selektive Markierung von Molekülen, Präparationsmethoden für Nukleinsäuren und ihre Verbindungen, digitale Auswertung elektonenmikroskopischer Bilder.

In Anerkennung dieser grundlegenden Arbeiten über den Einsatz elektronenmikroskopischer Methoden in der Molekularbiologie wird der Cloëtta-Preis 1979 Herrn Professor Theodor Koller verliehen.

DER CLOËTTA-PREIS 1979
WIRD

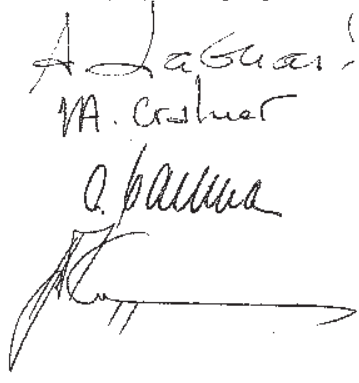
HERRN PROF. DR.

THEODOR KOLLER

GEBOREN 1936, DERZEIT PROFESSOR FÜR ZELLBIOLOGIE AM
INSTITUT FÜR ZELLBIOLOGIE DER
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH
IN ANERKENNUNG SEINER
GRUNDLEGENDEN ARBEITEN ÜBER DEN EINSATZ
ELEKTRONENMIKROSKOPISCHER
METHODEN IN DER MOLEKULARBIOLOGIE VERLIEHEN.

ZÜRICH, 12. DEZEMBER 1979

DER STIFTUNGSRAT



Professor Dr. Theodor Koller

KURZBIOGRAPHIE
VON HERRN PROFESSOR DR. THEODOR KOLLER

Geburtsdatum	23. März 1936
Heimatort	Zürich
Zivilstand	verheiratet, zwei Kinder (geb. 1963/1965)
Schule/Universität	Realgymnasium Basel, Matura 1955 Medizinische Fakultät, Basel Naturwissenschaftliche Prüfung: Sommer 1956 Anatom.-physiolog. Prüfung: Frühjahr 1958 Ärztliche Fachprüfung: Herbst 1961 Annahme der Doktorarbeit durch Fakultät: Herbst 1961
Arbeitsplätze	
1960	Physiologisches Institut der Universität Basel (Professor M. Monnier)
1962 bis 1963	Oberassistent am Physiologischen Institut der Universität Basel (Professor M. Monnier)
1963	Forschungsassistent an der Universitäts-frauenklinik Basel (Professor Theo Koller)
1963 bis 1964	Forschungsassistent am Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer, CNRS, Villejuif, Val de Marne, France (Dr. W. Bernhard)
1965 bis 1967	Forschungsassistent an der Universitäts-frauenklinik Basel (Professor Theo Koller)
1967 bis 1969	Forschungsassistent an der Johns Hopkins University, Dept. of Biophysics (Professor M. Beer)

1969 bis 1973	Oberassistent im Institut für Allgemeine Botanik der ETHZ, Laboratorium für Elektronenmikroskopie (Professor K. Mühletaler)
1971	Venia legendi für Biophysik, ETHZ
Seit 1974	Ordentlicher Professor für Zellbiologie, ETHZ

DIE STRUKTURELLE ORGANISATION DES GENETISCHEN APPARATES HÖHERER ORGANISMEN

Professor Dr. Theodor Koller

Das Nukleosom: die strukturelle Einheit des Chromatins

Jede Körperzelle enthält in ihrem Kern die Erbinformation für den Aufbau des gesamten Organismus. Jedoch für die Funktion der ausdifferenzierten Zelle ist nur ein kleiner Teil der gesamten Erbinformation notwendig. Der grösste Teil der Erbinformation liegt in einer inaktiven Form vor. In den einzelnen Entwicklungsstadien während der Reifung oder Differenzierung einer bestimmten Zellart sind sehr wahrscheinlich verschiedene Gene oder Gengruppen aktiv, respektive inaktiv. Um die Mechanismen der Aktivierung, respektive Inaktivierung von Genen zu verstehen, benötigen wir unter anderem eine detaillierte Kenntnis der strukturellen Organisation des genetischen Apparates.

Unter Chromatin verstehen wir den im Zellkern verpakten DNA-Protein-Komplex. Die DNA speichert die genetische Information. Während der Zellteilung (in der Metaphase) wird der genetische Apparat in lichtmikroskopisch sichtbare Strukturen kondensiert, in die sogenannten Chromosomen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Struktur des genetischen Materials während der Interphase, das heisst in der sich nicht teilenden Zelle, in welcher die Chromosomen nicht sichtbar sind (mit Ausnahme der Riesenchromosomen bei Fliegen- und Mückenlarven). Auf einem Dünnschnitt durch einen Zellkern (Fig. 1, K) kann man im Elektronenmikroskop stärker und schwächer kontrastierte Regionen erkennen. Die dunklen Bereiche, vorwiegend entlang der Kernmembran und um das Kernkörperchen (Nukleolus) lokalisiert, nennt man das Heterochromatin. Es entspricht wahrscheinlich der Hauptmasse des Chromatins, dem inaktiven Teil. In den hellen, flockig erscheinenden Regionen des Zellkerns (Euchromatin) ist das aktive Chromatin lokalisiert. Es ist naheliegend, anzunehmen, dass dieses in einer lockerer

gebauten Form vorliegt als das stillgelegte Heterochromatin. Auch der Nukleolus (Fig. 1, n) besteht aus Chromatin. In ihm ist eine bestimmte Klasse von Genen lokalisiert (Gene für die ribosomale RNA), auf die in diesem Zusammenhang nicht näher eingegangen werden kann (als Übersicht siehe Lewin, 1974).

Wie man sich beim Betrachten der Fig. 1 vorstellen kann, ist es schwierig, mit rein morphologischen Methoden die strukturelle Organisation des Chromatins zu analysieren. Aus diesem Grunde gelangten vorwiegend biochemische Methoden zur Anwendung. Zellkerne lassen sich mit geringem Aufwand in genügend grossen Quantitäten reinigen. Das Problem beginnt bei der Extraktion des Chromatins: Die morphologische Zuordnung einzelner Komponenten (Heterochromatin, Euchromatin, Nukleolus) geht verloren (mit Ausnahme einiger Spezialfälle), und das aus dem Kern durch Zerstörung der Kernmembran herausquellende Chromatin bildet ein Gel. Ein Durchbruch in der Chromatinforschung wurde 1973/74 durch Hewish und Burgogne sowie die Gruppe von van Holde erzielt. Diese Autoren entdeckten, dass Chromatin auf sehr milde Art löslich gemacht (solubilisiert) werden kann, indem gereinigte Zellkerne einem Enzym ausgesetzt werden, welches DNA zerschneidet und DNase genannt wird. Durch diese Behandlung werden die langen Chromatinfibrillen, welche im Zellkern möglicherweise an einem Proteinskelett verankert sind, in kleinere und dadurch lösliche Stücke zerlegt. Die Grösse dieser Stücke ist variabel; sie hängt von der Intensität der enzymatischen Verdauung ab. Wenn die DNA einer solchen Chromatinprobe von den Proteinen getrennt wird (zum Beispiel durch Behandlung mit einem Detergens), so lassen sich die Fragmente mit Hilfe von Elektrophorese nach Grösse auftrennen (Fig. 2). Auf Fig. 2 erkennt man diskrete Längenklassen von DNA-Fragmenten. Die kürzesten Fragmente sind etwa 200 Basenpaare (BP) lang. Die übrigen Fragmente bestehen aus Vielfachen von 200 BP, nämlich etwa 400, 600, 800, usw. BP. Die diskreten DNA-Längen deuten darauf hin, dass bei der Einwirkung der DNase auf das Chromatin die DNA nur an bestimmten Stellen für das Enzym zugänglich ist; der Rest der DNA kann durch das Enzym nicht abgebaut

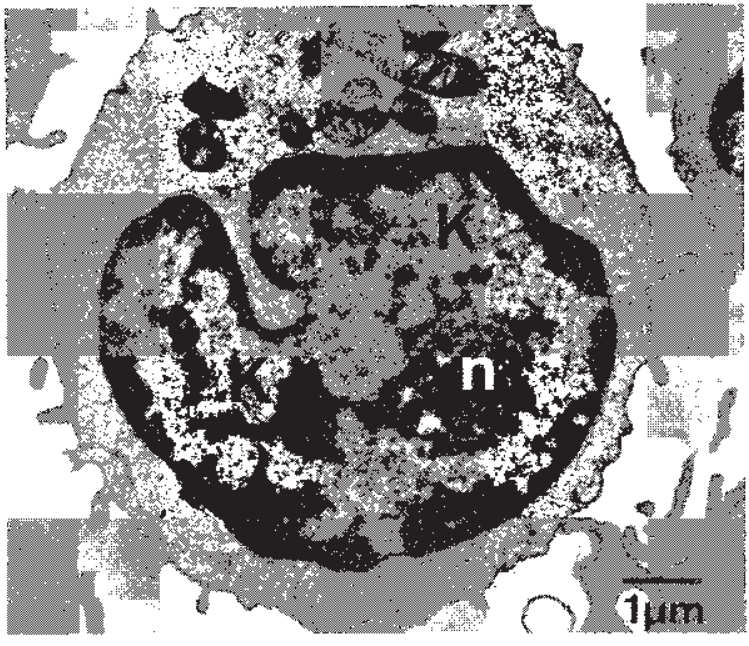


Fig. 1
Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Dünnschnittes durch eine menschliche Lymphozytenzelle. In der Mitte der Aufnahme ist der Zellkern (K) sichtbar, welcher durch eine Kernmembran gegen das Zytoplasma hin abgegrenzt ist. Man beachte unterschiedlich stark kontrastierte Regionen innerhalb des Kerns: Das stark dunkel erscheinende Heterochromatin längs der Kernmembran und um das Kernkörperchen (Nukleolus = n); das lockere, schwach kontrastierte, flockig erscheinende Euchromatin. (Aufnahme Dr. M. Müller).

werden. Da die DNA-Fragmente etwa 200 BP (oder deren Vielfache) lang sind, sind die DNase-zugänglichen Orte etwa 200 BP voneinander entfernt. Diese 200 DNA-Basenpaare umfassende Periodizität deutet darauf hin, dass Chromatin aus Einheiten aufgebaut ist: Die strukturelle Einheit wird Nukleosom genannt.

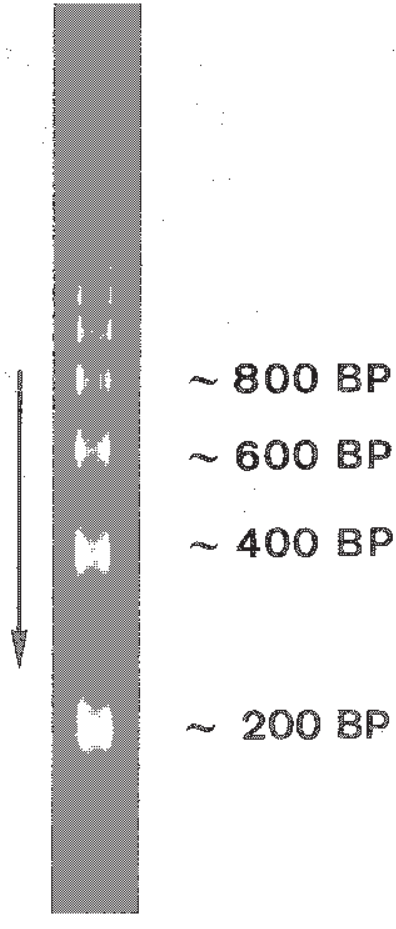


Fig. 2
Nachweis der Untereinheitsstruktur von Chromatin. Elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarose-Plattengel von DNA-Fragmenten, welche aus löslichem Chromatin extrahiert wurden. Man erkennt Banden, welche DNA-Längen von ~ 200 BP (entsprechend den monomeren Nukleosomen), ~ 400 BP (entsprechend den dimeren Nukleosomen), ~ 600 BP (entsprechend den trimeren Nukleosomen) usw. entsprechen. Der Pfeil gibt die Wanderungsrichtung an.

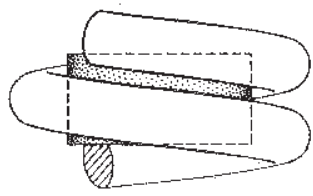


Fig. 3
Modell des «core particle», basierend auf den Daten von Finch et al. (1977) und Pardon et al. (1977). Der Proteinkern, bestehend aus je 2 Molekülen der Histone H 2A, H 2B, H 3 und H 4, ist als zentral gelegener Zylinder gezeichnet. Die 146 BP (Basenpaare) DNA sind in Form einer Superhelix 1¾ mal um den Proteinkern gewunden. Der Abstand zwischen den DNA-Windungen beträgt 28 Å.

Nukleosomen können gereinigt werden und sind dadurch einer biochemischen und biophysikalischen Analyse zugänglich. Das Nukleosom besteht aus einem DNA-Bruchstück von etwa 200 BP (variabel bei verschiedenen Zelltypen und Spezies) sowie fünf elektrophoretisch unterscheidbaren sogenannten Histon-Proteinen H 1, H 2A, H2B, H 3 und H 4 (Fig. 8) in einem molaren Verhältnis von 1 : 2 : 2 : 2 : 2. Werden lösliches Chromatin oder gereinigte Nukleosomen einer vollständigen DNase-Verdauung unterworfen, so entsteht als Endprodukt eine Lösung weitgehend DNase-resistenter Nukleosomen, die ihr Molekül H 1 verloren haben; die DNA in diesem sogenannten «core particle» besteht bei den meisten höheren Organismen aus 146 BP[1]. Die Gesamtheit der heute vorliegenden biochemischen und biophysikalischen Daten legt nahe, dass «core particles» Scheibchen darstellen, welche einen Durchmesser von 110 Å[2] und eine Höhe von 57 Å haben. Dabei bilden je 2 der Histonproteine H 2A, H 2B, H 3, H 4 zusammen einen Kern; die 146 BP lange DNA windet sich helikal 1¾mal um diesen Kern (Fig. 3). Im Zellkern oder in langen Chromatin-Fragmenten sind die «core particles» untereinander durch die kontinuierlich fortlaufende DNA

[1] Definition: «core particle» = Nukleosom – 1 Molekül H 1. [2] 1 Å = 10^{-7} mm.

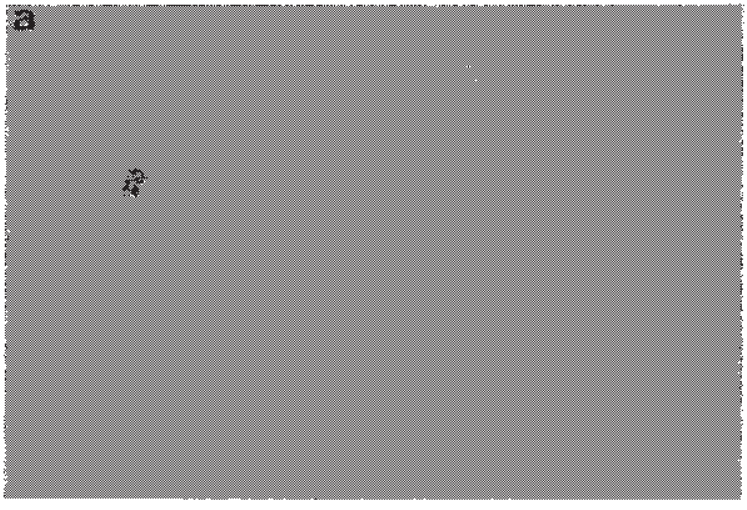
verbunden. Man vermutet, dass Histon H 1 mit den DNA-Brücken zwischen den «core particles» (linker DNA) assoziiert ist (als Übersicht siehe Felsenfeld, 1978).
Chromatin enthält nicht nur Histon-Proteine, sondern auch eine Klasse sehr verschiedenartiger Eiweisse, die sogenannten Nicht-Histone. Ein Teil dieser Proteine besitzt wahrscheinlich eine regulatorische Funktion bei der Genexpression. Ich gehe in der vorliegenden Arbeit nicht näher auf diese Gruppe von Eiweissen ein.

Nukleosomen und Chromatin im Elektronenmikroskop

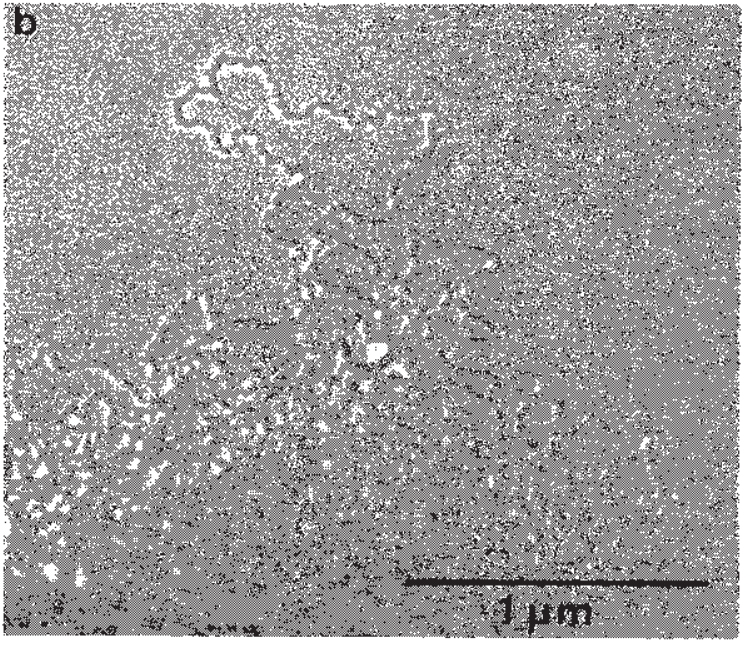
Unter verschiedensten Bedingungen kann lösliches Chromatin im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden. Eine grosse Anzahl von Publikationen sind zu diesem Thema in der Literatur zu finden. Jedoch folgende Fragen sind unbeantwortet: Wie sind die Nukleosomen strukturell im Chromatin innerhalb des Zellkerns organisiert? Wo ist das Histon H 1 auf dem Nukleosom lokalisiert, und welches ist seine strukturelle Aufgabe im Chromatin? Diese Fragen möchte ich anhand von Fig. 4 erklären. Fig. 4 a zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von langen Chromatinfragmenten, welche durch milde DNase-Einwirkung auf Zellkerne hergestellt worden sind. Bei der Präparation wurde bewusst eine Streckung der Chromatinfäden vorgenommen (ähnliche Präparation wie bei Olins und Olins [1974] beschrieben). Man erkennt lange Fäden, welche mehr oder weniger regelmässig mit Partikeln besetzt erscheinen.

Fig. 4 a
Lösliches Rattenleberchromatin, welches unter Bedingungen präpariert wurde, die eine Streckung der Chromatinfasern während der Adsorption an den elektronenmikroskopischen Objektträger bewirken. Die ausgerichteten Fasern sind durch etwa 100 Å grosse Partikel (Nukleosomen) charakterisiert, welche in mehr oder weniger regelmässigen Abständen an einen dünnen Faden, wahrscheinlich DNA, gebunden sind.

Fig. 4 b
Gereinigter Zellkern im Prozess der Lyse. Etwa 250 Å dicke, knotig erscheinende Chromatinfasern quellen aus dem Kerninnern.



g. 4a



g. 4b

Diese Partikeln sind die Nukleosomen, welche durch dünne Fäden, die sehr wahrscheinlich DNA (mit eventuell etwas Protein) darstellen, miteinander verbunden sind. Im Gegensatz dazu zeigt Fig. 4 b einen nicht mit DNase behandelten Zellkern im Prozess der Lyse. Für diese Präparation wurden gereinigte Kerne während des Herausquellens des Chromatins fixiert und für das Elektronenmikroskop präpariert. Diese Aufnahme legt nahe, dass das Chromatin im Zellkern in Form knotiger, möglicherweise helikal gewundener, etwa 250 Å dicker Fasern vorliegt. Ähnliche Beobachtungen wurden seit Jahren von Ris (siehe Ris, 1975) beschrieben. Die Frage stellt sich: Wie sind die in Fig. 4 a sichtbaren, Nukleosomen-besetzten Fäden im Zellkern organisiert, so dass eine Faser entsteht, wie sie in Fig. 4 b abgebildet ist? Zunächst jedoch will ich die Grenzen der elektronenmikroskopischen Strukturanalyse von Molekülen und Molekülkomplexen abstecken.

Die Grenzen der Elektronenmikroskopie

In der Mikroskopie werden Einzelereignisse beobachtet; deshalb verleitet die Mikroskopie dazu, Schlüsse auf Grund suggestiv und attraktiv wirkender Beobachtungen zu ziehen. Nur wenn die Beobachtungen statistisch gesichert sind, kann die Mikroskopie echte Information vermitteln.

Im Zusammenhang mit der oben dargelegten Problemstellung erhebt sich die Frage, ob das Elektronenmikroskop überhaupt Strukturen abbilden kann, wie sie in Lösung vorkommen. A priori muss angenommen werden, dass dies nicht der Fall ist. Es seien hier nur einige Gründe dafür aufgezählt: Labile, räumlich angeordnete Gebilde werden durch die meisten zur praktischen Anwendung gelangenden Präparationsverfahren abgeflacht, so dass die Struktur kollabiert erscheint. Durch Adsorbtion der Moleküle und Molekülkomplexe an den Objektträger werden im Objekt Konformationsänderungen induziert. Das Präparat wird getrocknet. Die ionalen Verhältnisse auf dem Objektträger sind nach Adsorbtion der Probe

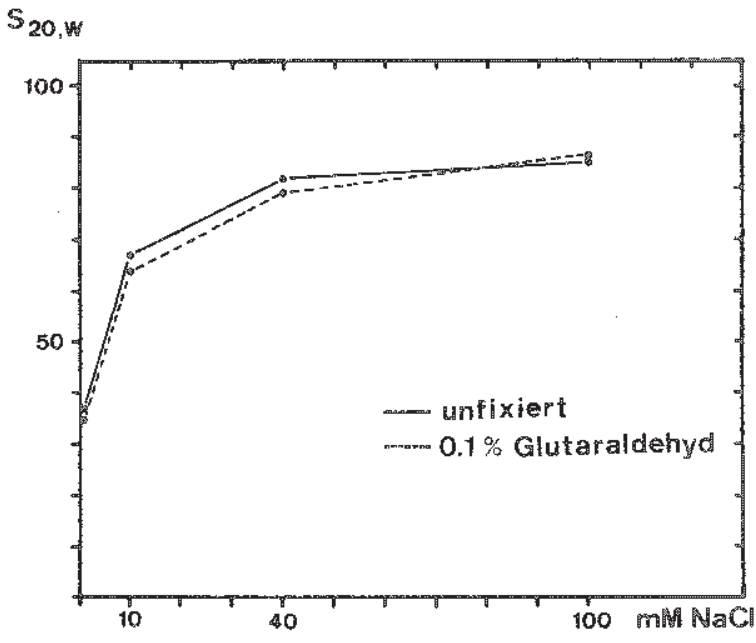


Fig. 5
Analyse des Sedimentationsverhaltens von löslichem Rattenleberchromatin ohne und nach Fixation in 0,1 % Glutaraldehyd. Auf der Ordinate ist die Sedimentationskonstante ($S_{20,w}$) angegeben, auf der Abszisse die Kochsalzkonzentration des Lösungsmittels. Man erkennt, dass die Sedimentationsgeschwindigkeit mit zunehmender Salzkonzentration zunimmt. Die Daten sind identisch für nicht-fixiertes und fixiertes Material, was darauf hindeutet, dass die Fixationsreaktion die Form von Chromatin in Lösung nicht wesentlich beeinflusst. (Abbildung aus Thoma et al., 1979)

und deren Trocknung nicht die gleichen wie in der Lösung, aus welcher die Probe entnommen wurde.
Falls Rückschlüsse auf die Struktur eines Moleküls in Lösung gezogen werden möchten, so müssen Präparationsverfahren angestrebt werden, welche konstante und im Verhältnis zur erreichbaren Auflösung geringe Formverzerrungen des Objektes bewirken, so

dass auf Grund der Morphologie Modelle der möglichen Struktur in Lösung entworfen werden können. Der Nachweis, dass die durch die Präparation induzierten Artefakte «gering» sind, ist nur schwer möglich. Die Strategie, welche wir verfolgen, besteht darin, durch Veränderung der Lösungsbedingungen verschiedene Strukturzustände des Chromatins zu erzeugen und diese gleichzeitig im Mikroskop und mit unabhängigen, biophysikalischen Methoden (zum Beispiel Ultrazentrifugation) unter vergleichbaren Bedingungen zu untersuchen.

Die Versuchsstrategie[3]

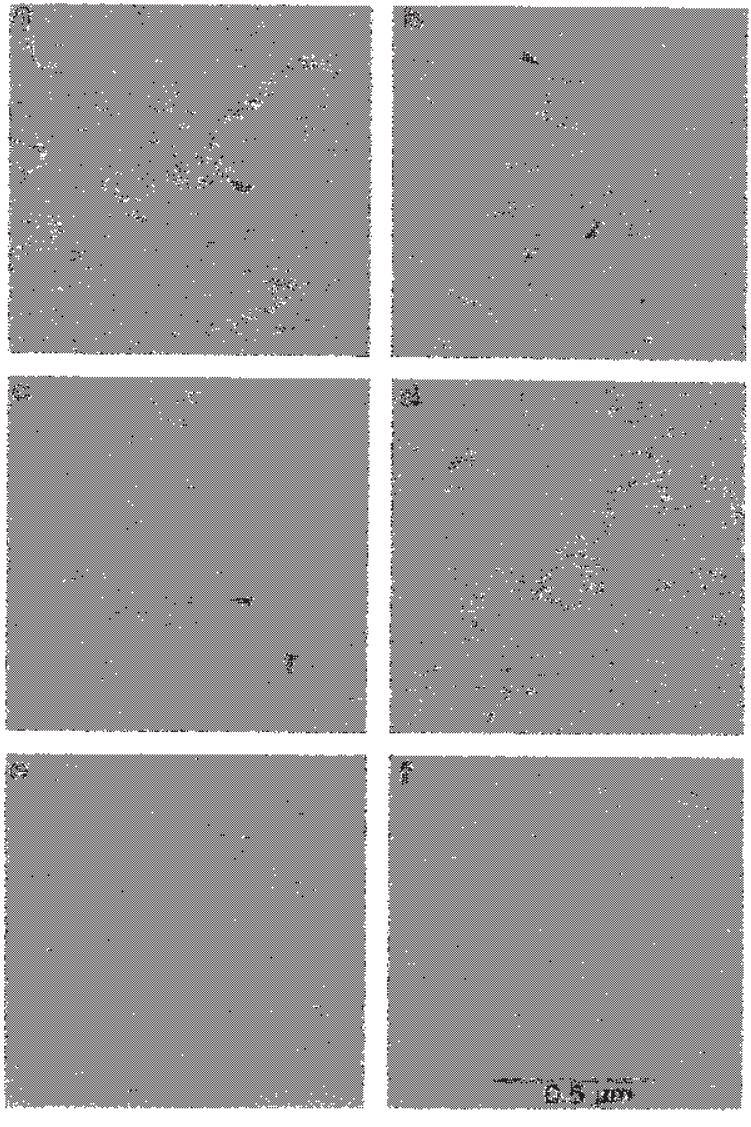
Es ist bekannt, dass Chromatin in Präsenz hoher Kochsalzkonzentrationen in der Ultrazentrifuge schneller sedimentiert als in Präsenz tiefer Salzkonzentrationen (Fig. 5). Diese Versuche lassen vermuten, dass bei sehr niedriger Ionenstärke das Chromatin in wesentlich offenerer und gelockerterer Form vorliegen muss als bei Salzkonzentrationen zwischen 60 und 100 mM. Um die verschiedenen, von der Ionenstärke abhängigen Strukturzustände zu erfassen, haben wir Chromatinproben bei verschiedenen Ionenstärken fixiert, und zwar unter Bedingungen, von denen bekannt ist (Chalkley and Hunter, 1975), dass benachbarte Proteine untereinander irreversibel verknüpft oder vernetzt werden. Bei der Adsorbtion der Proteine an den Objektträger sollten die nicht vernetzten Elemente oder Strukturkomponenten entfaltet oder gespreitet werden, die vernetzten Anteile jedoch ein rigides Gebilde darstellen. Da mit der von uns verwendeten elektronenmikroskopischen Präparationstechnik unfixiertes Chromatin zerstört wird, und um eine mögliche Formveränderung des Chromatins durch die Fixationsreaktion zu erfassen, haben wir das Sedimentationsverhalten fixierter (0,1% Glutaraldehyd) und nicht fixierter Proben miteinander verglichen. Fig. 5 zeigt, dass die Sedimentationskonstante von Chromatin durch die Fixationsreaktion nicht merklich beeinflusst wird.

[3] Die beschriebenen Versuche sind publiziert in Thoma, Koller und Klug (1979).

Die Morphologie des «nativen» Chromatins bei verschiedenen Ionenstärken

Fig. 6 illustriert übersichtsmässig die Morphologie von Chromatinfasern, wenn die Proben bei verschiedenen Ionenstärken (zwischen beinahe 0 und 100 mM) fixiert werden. In Übereinstimmung mit dem oben gezeigten Sedimentationsverhalten beobachten wir eine zunehmende Kondensation oder Kompaktierung bei ansteigender Ionenstärke. Fig. 7 zeigt selektionierte Aufnahmen bei stärkerer Vergrösserung.

Bei sehr niedriger Ionenstärke sind die Chromatinfasern locker gebaut und etwa 1 bis 2 Nukleosomen breit (Fig. 7a). Wir nennen diese Faser das Nukleosomenfilament. Da die Nukleosomen meistens rund erscheinen, sind sie sehr wahrscheinlich mit ihrer flachen Seite an den Trägerfilm adsorbiert. Die Nukleosomen sind untereinander durch dünne Filamente verbunden, welche wahrscheinlich weitgehend proteinfreie DNA darstellen. Bei genauer Inspektion erkennt man, dass die DNA oft an der gleichen Stelle ins Nukleosom eintritt, an der sie dieses wieder verlässt (Pfeil Fig. 7b). Deshalb erscheint die Chromatinfaser an manchen Stellen zickzackförmig (Fig. 6 a, 7a). Bei leichter Zunahme der Ionenstärke (Fig. 7c) zeigen die Fasern einen Durchmesser von 200 bis 250 Å. Die rund erscheinenden Nukleosomen liegen jedoch nahe beieinander, so dass kaum mehr DNA erkannt werden kann, welche die Nukleosomen untereinander verbindet. Die offene Zickzack-Faser bei sehr niedriger Ionenstärke (Fig. 7a und 7b) hat sich in eine geschlossene zickzackförmige Faser verwandelt (Fig. 7c). Der Pfeil in Fig. 7d gibt Stellen an, an denen Nukleosomen dicht nebeneinander mehr oder weniger senkrecht zur Faserachse angeordnet sind. Solche Beobachtungen deuten darauf hin, dass in Lösung die Nukleosomen in helikalen Windungen angeordnet sein könnten; auf dem Objektträger besteht jedoch die Tendenz, dass die Nukleosomen auf ihre flache Seite fallen, so dass das Bild der zickzackförmigen Faser entsteht. Wir postulieren deshalb, dass die Nukleosomen helikal angeordnet sind, mit etwa 2 bis 3 Nukleosomen pro Windung.


a
b
c
d
e
f
0.5 μm

In Präsenz von 10 (Fig. 6 c, 7e), respektive 20 (Fig. 6 d) mM Kochsalz verschwindet das zickzackförmige Erscheinungsbild zugunsten einer kompakteren Faser von ebenfalls etwa 250 Å im Durchmesser. An vielen Orten sind die Nukleosomen in Reihen mehr oder weniger senkrecht zur Faserachse angeordnet (Pfeil in Fig. 7e), so dass der Eindruck einer lockeren helikalen Struktur mit 3 bis 4 Nukleosomen pro helikale Windung entsteht. Die kleinste Distanz zwischen zwei solchen aufeinanderfolgenden Windungen beträgt etwas über 100 Å (entsprechend dem Durchmesser eines Nukleosoms).

Bei 40 mM NaCl ist eine weitere Kondensation zu beobachten (Fig. 6 e). Die Fasern sind unregelmässig und inhomogen. Individuelle Nukleosomen können nur noch ausnahmsweise erkannt werden. Verglichen mit ihrem Aussehen bei niedriger Ionenstärke haben die Fasern ein deutlich dreidimensionales Erscheinungsbild. Oft sind Querstreifungen in einem Abstand von etwa 100 bis 150 Å zu erkennen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass in Lösung bei dieser Ionenstärke eine helikale Struktur mit dicht gepackten Nukleosomen vorliegt.

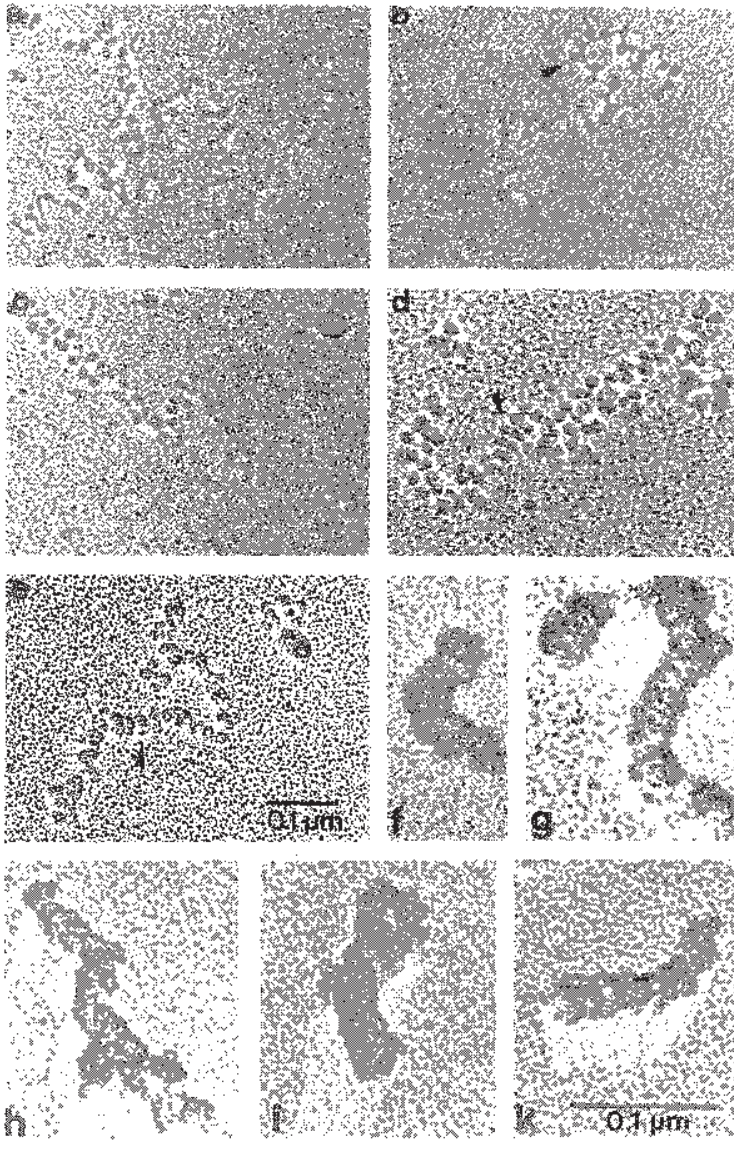
Zwischen 40 und 100 mM Kochsalzkonzentration findet eine weitere Kondensation statt (Fig. 6 f, Fig. 7 f bis k). In ihrer ganzen Länge sind

Fig. 6

Die Abhängigkeit der Morphologie von löslichem Chromatin von der Ionenstärke des Lösungsmittels. Die Proben wurden in folgenden Lösungen mit 0,1% Glutaraldehyd fixiert und für die Elektronenmikroskopie gespreitet:

a) 0,2 mM EDTA (= Äthylendiamintetraacetat), (pH 7) = sehr niedrige Ionenstärke
b) 5 mM Triäthanolaminchlorid (pH 7) und 0,2 mM EDTA = niedrige Ionenstärke
c) 10 mM NaCl, 5 mM Triäthanolaminchlorid (pH 7) und 0,2 mM EDTA
d) 20 mM NaCl, 5 mM Triäthanolaminchlorid (pH 7) und 0,2 mM EDTA
e) 40 mM NaCl, 5 mM Triäthanolaminchlorid (pH 7) und 0,2 mM EDTA
f) 60 mM NaCl, 5 mM Triäthanolaminchlorid (pH 7) und 0,2 mM EDTA

Man beachte die progressive Kondensation der Chromatinfasern mit zunehmender Ionenstärke. Dieses Verhalten ist vereinbar mit dem entsprechenden Verhalten von Chromatin in Lösung während der Ultrazentrifugation (siehe Fig. 5). (Abbildung aus Thoma et al., 1979)


a
b
c
d
e
0.1 µm
f
g
h
i
k
0.1 µm

die Fasern jetzt kompakt. Sie besitzen einen Durchmesser von rund 250 Å. Sie sind in ihrer Morphologie nicht zu unterscheiden von den Fasern, welche wir in Fig. 4 bei der Lyse ganzer Kerne kennengelernt haben, mit der einen Ausnahme, dass die Fasern des solubilisierten Chromatins wesentlich kürzer sind (infolge der DNase-Einwirkung für die Solubilisierung). Die Nukleosomen können in dieser Faser mit der verwendeten Technik nicht sichtbar gemacht werden. Jedoch ist eine deutliche Querstreifung zu beobachten (Fig. 7 f bis k), was wiederum ein starkes Indiz darstellt, dass diese Fasern in Lösung eine helikale Struktur besitzen. Wie bei den Fasern in Lösungen mit niedriger Ionenstärke beträgt auch hier die Distanz zwischen den Windungen etwa 100 bis 150 Å entsprechend dem Durchmesser eines Nukleosoms.

Bei weiterer Erhöhung der Ionenstärke (über 100 mM NaCl) kann kein Wechsel der Morphologie der Chromatinfaser mehr beobachtet werden. Jedoch beginnt die Lösung trübe zu werden, was darauf hindeutet, dass unter diesen Bedingungen das Chromatin präzipitiert.

Fig. 7

Selektionierte Aufnahmen von löslichem Chromatin bei verschiedenen Ionenstärken. Die Proben wurden in folgenden Lösungen fixiert und für die Elektronenmikroskopie präpariert:

a) respektive b) 1 mM Triäthanolaminchlorid (pH 7) und 0,2 mM EDTA
c) respektive d) 5 mM Triäthanolaminchlorid (pH 7) und 0,2 mM EDTA
e) 10 mM NaCl, 5 mM Triäthanolaminchlorid (pH 7) und 0,2 mM EDTA
f) bis k) 100 mM NaCl, 5 mM Triäthanolaminchlorid (pH 7) und 0,2 mM EDTA

Pfeil in b: Die DNA tritt am gleichen Ort ins Nukleosom ein, an dem sie dieses auch wieder verlässt. Pfeile in d und in e: Reihen von Nukleosomen senkrecht zur Faserachse deuten auf eine helikale Struktur der Fasern. (Abbildung aus Thoma et al., 1979)

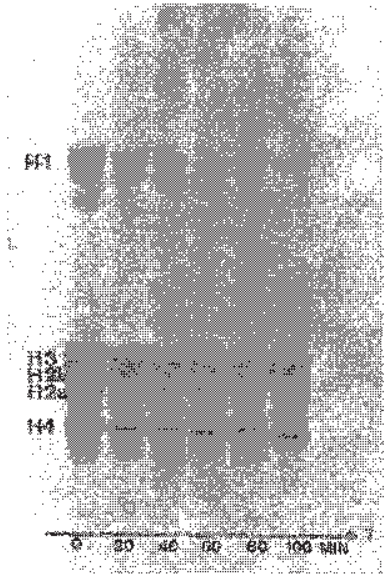


Fig. 8
Elektrophoretische Auftrennung der Histonproteine auf einem Acrylamidplattengel. Natives Chromatin wurde während 100 Minuten mit einem Ionentauscherharz (AG 50W-X2) behandelt. Man erkennt die progressive und selektive Elimination von Histon H1.

Morphologie von Chromatin ohne Histon H1

Das Molekül von Histon H1 ist zu klein, um innerhalb der Chromatinfaser direkt sichtbar zu sein. Um Auskunft über die strukturelle Rolle von Histon H1 zu erhalten, haben wir in parallelen Experimenten die salzabhängige Morphologie von H1-freiem Chromatin verglichen mit dem soeben beschriebenen Verhalten von nativem, H1-enthaltendem Chromatin. Fig. 8 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der chromosomalen Proteine. Nach Behandlung von nativem Chromatin mit einem Ionentauscherharz verschwindet Histon H1 recht selektiv, wobei die übrigen Histonproteine nicht merklich beeinflusst werden.

Die Extraktion von Histon H1 verändert die Morphologie von Chromatin erheblich. Wenn H1-freies Chromatin bei ganz tiefer Ionenstärke fixiert wird, so sind nur vereinzelt Nukleosomen zu beobach-

ten (Fig. 9 a, 10 a). Die Fasern sind unregelmässig dick und zeigen keine Anzeichen einer zickzackförmigen Morphologie. Es scheint, dass sich unter diesen Bedingungen die Nukleosomen in Lösung entfalten, wobei die Proteine ohne sichtbare strukturelle Ordnung die DNA unregelmässig bedecken. Da unter identischen Bedingungen natives Chromatin Nukleosomen zeigt, so schliessen wir aus diesem Befund, dass Histon H 1 die Nukleosomenstruktur stabilisiert.
Bei sehr leichter Erhöhung der Ionenstärke (Fig. 9 b und 10 b) sind Nukleosomen auch im H 1-freien Chromatin sichtbar. Die Feinstruktur der Nukleosomen ist jedoch verschieden von derjenigen der H 1-enthaltenden Partikel. Im H 1-enthaltenden Chromatin tritt die DNA am gleichen Ort ins Nukleosom ein, wo sie dieses wieder verlässt (Fig. 7 a, 7 b), und dadurch entsteht die Zickzack-Morphologie dieser Fasern bei tiefer Ionenstärke. Nach Elimination von H 1 jedoch ist kein Zickzack sichtbar (Fig. 10 b), und der Ein- und Austrittsort der DNA ist an gegenüberliegenden Seiten des Nukleosoms gelegen. (Dieses Bild ist sehr ähnlich demjenigen von Fig. 4 a, welches jedoch durch bewusste mechanische Streckung des Materials während der elektronenmikroskopischen Präparation erzeugt wurde). Auf Grund dieser Beobachtung schliessen wir, dass Histon H 1 dort auf dem Nukleosom lokalisiert sein muss, wo die DNA ins Nukleosom eintritt und dieses wieder verlässt.
Bei höheren Ionenstärken zeigt auch H 1-freies Chromatin eine Kondensation (Fig. 9 c, 9 d). Dort wo Nukleosomen im Faserknäuel sichtbar sind, zeigen sie die gleiche Morphologie der «Kügelchen auf einem Faden». Im Gegensatz zum nativen Chromatin zeigt das H 1-freie Chromatin eine unregelmässige Kondensation ohne Bildung einer strukturell organisierten Faser. Das bedeutet, dass Histon H 1 verantwortlich ist für die Organisation der Nukleosomen in definierte Chromatinsuperstrukturen, wie sie auf den Bildern der Fig. 6 und 7 sichtbar sind.
Die Folgen der H 1-Elimination sind reversibel: Nach Zugabe von H 1 (und einigen leicht vom Chromatin dissoziierbaren Nicht-Histonen) entsteht ein Produkt, das sich morphologisch nicht vom nativen Chromatin unterscheidet.

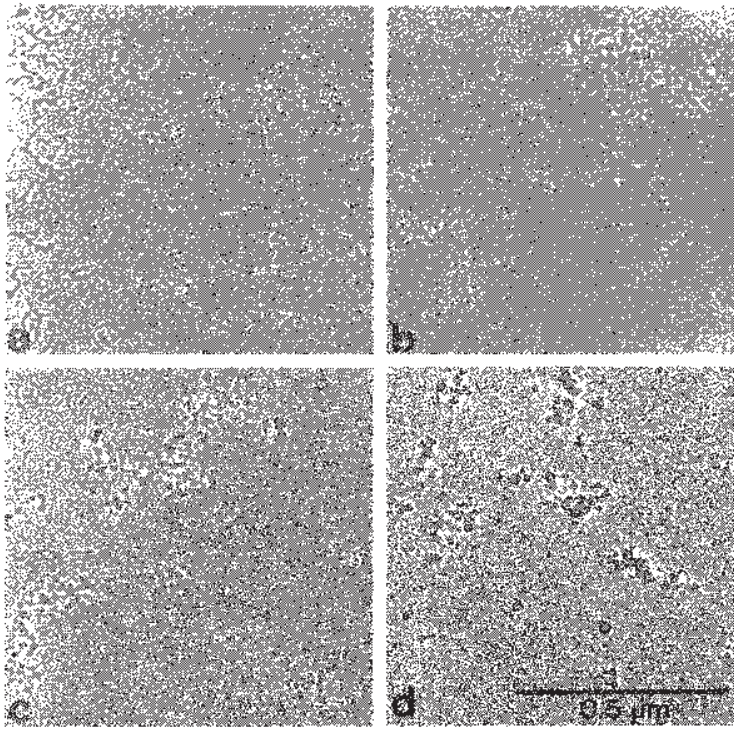


Fig. 9

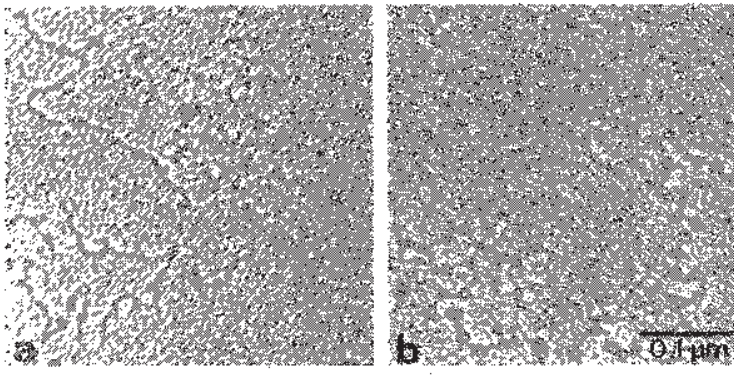


Fig. 10

Das Modell

Das systematische Verfolgen des Kondensationsprozesses des Nukleosomenfilamentes in Chromatinsuperstrukturen erlaubt uns, ein Modell über die Anordnung der Nukleosomen in den Chromatinfasern vorzuschlagen. Fig. 11 zeigt eine schematische, idealisierte Darstellung, wie wir uns die Fasern bei verschiedenen Ionenstärken vorstellen. Dabei ist zu beachten, dass in vivo die Chromatinfasern wahrscheinlich nicht so regelmässig geordnet vorliegen, wie das im Schema ersichtlich ist; unsere elektronenmikroskopischen Bilder zeigen eher unregelmässige, knotige Fasern, mit dem generellen Bauprinzip einer helikalen Anordnung der Nukleosomen.

Fig. 9
Die Abhängigkeit der Morphologie von Histon H 1-freiem Chromatin von der Ionenstärke des Lösungsmittels. Die Proben wurden in folgenden Lösungen fixiert und für die Elektronenmikroskopie präpariert:
a) 1 mM Triäthanolaminchlorid (pH 7) und 0,2 mM EDTA = sehr niedere Ionenstärke
b) 10 mM NaCl, 5 mM Triäthanolaminchlorid (pH 7) und 0,2 mM EDTA
c) 40 mM NaCl, 5 mM Triäthanolaminchlorid (pH 7) und 0,2 mM EDTA
d) 100 mM NaCl, 5 mM Triäthanolaminchlorid (pH 7) und 0,2 mM EDTA.

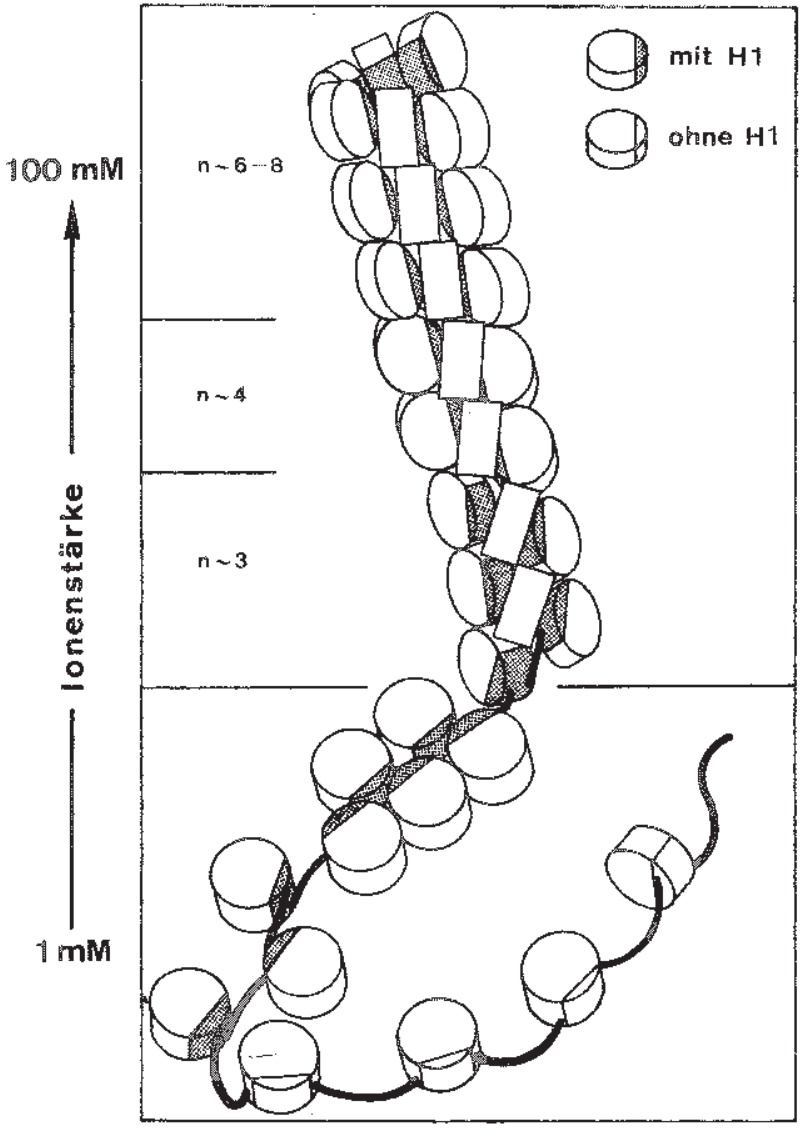
Man beachte, dass bei sehr niedriger Ionenstärke die Nukleosomen fehlen. Die Kondensation bei hoher Ionenstärke (c und d) führt nicht zu einer Faser mit charakteristischer Morphologie, wie dies bei H 1-enthaltendem Chromatin der Fall ist.

Fig. 10
Selektionierte Aufnahmen von H 1-freiem Chromatin bei sehr niedriger und bei niedriger Ionenstärke. Die Proben wurden in folgenden Lösungen fixiert und für die Elektronenmikroskopie präpariert:
a) 1 mM Triäthanolaminchlorid (pH 7) und 0,2 mM EDTA
b) 10 mM NaCl, 5 mM Triäthanolaminchlorid (pH 7) und 0,2 mM EDTA

Man beachte die Abwesenheit von Nukleosomen in a. In b sind Partikel sichtbar. Der Ein- und Austritt der DNA ist an gegenüberliegenden Seiten der Nukleosomenpartikel lokalisiert, im Gegensatz zum H 1-enthaltenden Chromatin, bei welchem die DNA am gleichen Ort ins Nukleosom eintritt, wo sie dieses wieder verlässt (siehe Fig 7a und 7b).

Die Parameter der Helix, wie Windungsabstand und Anzahl Nukleosomen pro Windung, können aus der Anordnung der Nukleosomen und deren Sichtbarkeit auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen abgeleitet werden. Die zickzackförmig erscheinende Faser mit ihren auf der flachen Seite adsorbierten Nukleosomen ist vereinbar mit einer Helix mit 2 bis 3 Nukleosomen pro Windung und einem Windungsabstand von etwa 110 bis 150 Å. Bei zunehmender Ionenstärke sind die Nukleosomen immer weniger deutlich erkennbar, doch bleiben die Abstände der Querstreifungen, welche auf eine helikale Struktur hindeuten, konstant bei 110 bis 150 Å. Wir glauben deshalb, dass die Chromatinfaser eine Helix darstellt mit konstantem Abstand zwischen den Windungen. Die morphologischen Veränderungen mit zunehmender Ionenstärke würden dadurch zustande kommen, dass die Anzahl Nukleosomen pro Windung zunimmt. Aus diesem Grund wird der freie Raum zwischen den Nukleosomenscheibchen zunehmend kleiner, und deren flache Seiten rücken näher aneinander. Dies erklärt, dass die individuellen Nukleosomen auf den elektronenmikroskopischen Bildern zunehmend schlechter unterscheidbar werden.

Fig. 11
Idealisierte Zeichnung der helikalen Superstrukturen, welche bei zunehmender Ionenstärke im Lösungsmittel von Histon H1 enthaltendem Chromatin gebildet werden. Das offene, zickzackförmige Nukleosomenfilament (unten links) wird zu einer geschlossenen, zickzackförmigen Faser. Dabei werden die Nukleosomen mit ihrer flachen Seite an den Objektträgerfilm adsorbiert. In Lösung entspricht diese Faser einer Helix mit 2 bis 3 Nukleosomen pro helikale Windung. Bei weiterer Erhöhung der Ionenstärke nimmt die Anzahl Nukleosomen pro Windung zu, bis diese bei 60 bis 100 mM NaCl etwa 6 bis 8 beträgt. Infolge der progressiv dichteren Packung können die Nukleosomen nicht mehr mit ihrer flachen Seite an den Trägerfilm adsorbiert werden; auf den Mikrographien sind nur selten einzelne Nukleosomen, jedoch deutlich dreidimensional erscheinende Fasern sichtbar. Der Einfachheit halber sind die Helices regelmässig gezeichnet. Die Beobachtungen legen jedoch nahe, dass diese eher unregelmässig sind.
Bei Abwesenheit von Histon H1 (unten rechts) sind keine zickzackförmigen Fasern und Superstrukturen zu beobachten. n = Anzahl Nukleosomen. (Abbildung aus Thoma et al., 1979)


mit H1
ohne H1
100 mM
n ~ 6 – 8
n ~ 4
n ~ 3
Ionenstärke
1 mM

Das vorgeschlagene Modell steht im Einklang mit physikochemischen Daten von Chromatin in Lösung (Laser-Lichtstreuung, Campbell et al., 1978; Neutronenstreuung, Suan et al., 1979), deren Interpretation bis heute nicht eindeutig möglich war.

Das Nukleosomenfilament zeigt bei ganz niedriger Ionenstärke einzelne Nukleosomen, welche durch dünne Fäden, wahrscheinlich DNA, untereinander verbunden sind. Charakteristischerweise tritt die DNA am gleichen Ort ins Nukleosom ein, wo sie dieses wieder verlässt. Dieser Ort, welcher in der zickzackförmigen Faser gegen die Faserachse zu gelegen ist, entspricht der Lokalisation von Histon H1. Bei leichter Erhöhung der Ionenstärke beobachten wir eine Faser mit aneinanderliegenden, zickzackförmig angeordneten Nukleosomen. In der Nähe des Berührungspunktes der Nukleosomen in der Faserachse ist mit grosser Wahrscheinlichkeit Histon H1 lokalisiert. Wir stellen uns vor, dass die Nukleosomen durch H1-Kontakte miteinander verbunden würden. Dies würde erklären, warum nach Vernetzung (Chalkley and Hunter, 1975) von nativem Chromatin in Zellkernen Polymere von H1 entstehen. Wir postulieren deshalb, dass ein H1-Polymer das Grundgerüst der helikalen Chromatinfaser darstellt und dass die Nukleosomen radikal an diesem Polymer anhaften. Da die Nukleosomen scheibenförmig gebaut sind, so erhebt sich die Frage, ob deren Ebene senkrecht oder parallel zur Faserachse angeordnet ist. Da wir nie Windungsabstände von unter 100 Å beobachtet haben, und da die Nukleosomen einen Durchmesser von 110 und eine Dicke von 57 Å besitzen, so vermuten wir, dass die Ebenen der Nukleosomen parallel zur Faserachse angeordnet sind (Fig. 11).

Bei Abwesenheit von Histon H1 ist keine Organisation der Nukleosomen in Fasern sichtbar. Bei Zunahme der Ionenstärke entstehen unregelmässige Klumpen und Knäuel. Diese werden am leichtesten dadurch erklärt, dass bei Reduktion der elektrostatischen Repulsion der Ladungen auf der DNA eine unspezifische Aggregation der Fäden untereinander stattfindet.

Wir haben Histon H1 an der Stelle lokalisiert, wo die DNA ins Nukleosom ein- und austritt. In Übereinstimmung mit anderen

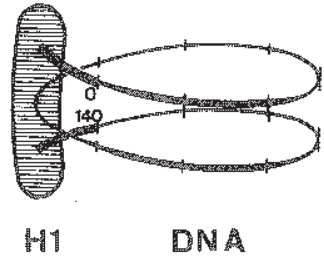


Fig. 12
Schema der Beziehungen zwischen der Nukleosomen-DNA und Histon H 1. Die 146 Basenpaare lange DNA wird an beiden Enden um je 10 Basenpaare verlängert. Damit entsteht ein Partikel mit 166 Basenpaaren DNA, welche zwei vollständige helikale Windungen um den Proteinkern des Nukleosoms bilden (vergleiche mit Fig. 2). Histon H 1 bindet dort an die DNA, wo diese ins Nukleosom ein- und austritt.

Autoren (Simpson, 1978) postulieren wir deshalb, dass im Nukleosom 166 BP DNA zwei vollständige helikale Windungen um einen Proteinkern bilden, welcher aus je zwei Molekülen der Histone H 2A, H 2B, H 3 und H 4 zusammengesetzt ist. Wie in Fig. 12 schematisch dargestellt, würde H 1 an die ein- und austretende DNA binden. Dies würde unsere Beobachtung erklären, dass H 1 die Struktur des Nukleosoms stabilisiert und verhindert, dass sich dieses öffnet, wenn die Ionenstärke drastisch reduziert wird, wie dies beim H-1-freien Chromatin der Fall ist.

Ausblick

Wie eingangs erwähnt, stellt die Hauptmasse des Chromatins differenzierter Zellen genetisches Material dar, welches stillgelegt ist. Wir glauben deshalb, dass die in dieser Arbeit beschriebenen Resultate repräsentativ sind für inaktives Chromatin. Die nächste Frage, die wir uns stellen müssen, heisst: Wie ist die strukturelle Organisation von aktiviertem oder aktivem Chromatin, welches für die Genexpression

verantwortlich ist? Wir hoffen, dieses Problem durch Verwendung spezieller Zellen oder Kernkomponenten (Nukleolen) angehen zu können. Die Resultate der vorliegenden Arbeit ermöglichen uns, in Zukunft das Elektronenmikroskop als biochemische Nachweismethode zu verwenden. Wir können damit verschieden behandelte Chromatinproben (zum Beispiel in Rekonstitutionsexperimenten) prüfen auf Präsenz oder Abwesenheit von Nukleosomen, Stabilität von Nukleosomen bei sehr niedriger Ionenstärke, Präsenz oder Abwesenheit von Histon H1 und Präsenz oder Abwesenheit geordneter Superstrukturen.

Ich danke meinen Kollegen und Freunden an der ETH und an der Universität Zürich und meinen Mitarbeitern der letzten 8 Jahre für bereitwillige und anregende Zusammenarbeit, für Rat und Hilfeleistungen sowie für harte und konstruktive Kritik. Besonders möchte ich hier erwähnen:

A. Arcidiacono
M. Bächi
Professor E. Bas
Dr. K. Downing
Professor H. Eppenberger
Dr. M. Frey
Dr. H. Gross
Dr. H. Hofstetter
Professor W. Känzig
Professor O. Kübler
P. Labhart
PD Dr. M. Lezzi
H. Mayer-Rosa
Professor H. Moor
Professor K. Mühletaler
Dr. M. Müller
Dr. J. Parello
Dr. R. Portmann
P. Ruchti
Dr. P. Scherrer
Dr. U. Stettler
Dr. J. E. Sogo
S. Sütterlin
Dr. F. Thoma
Professor H. Ursprung
Dr. H. J. Vollenweider
PD Dr. H. Weber
Dr. E. Wehrli
Professor Ch. Weissmann

Literatur

Campbell, A. M., Cotter, R. I., Pardon, I. F. (1978) Nucleic Acids Research *5*, 1571 – 1580.

Chalkley, R. und Hunter, C. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA *72*, 1304 – 1308.

Felsenfeld, G. (1978) Nature *271*, 115 – 122.

Finch, J. T., Lutter, L. C., Rhodes, D., Brown, R. S., Rushton, B., Levitt, M., Klug, A. (1977) Nature *269*, 29 – 36.

Hewish, D. R. und Bourgoyne, L. A. (1973) Biochem. Biophys. Res. Comm. *52*, 504 – 510.

Lewin, B. (1974) Gene Expression – 2, Eucariotic Chromosomes (John Wiley and Sons).

Olins, A. L. und Olins, D. E. (1974) Science *183*, 330 – 332.

Pardon, J. F., Worcester, D. L., Wooley, J. C., Cotten, R. I., Lilley, D. M. J., Richards, B. M. (1977) Nucleic Acids Res. *4*, 3199 – 3214.

Ris, H. (1975) Chromosomal structures as seen by electron microscopy. In: The Structures and Function of Chromosomes. Ciba Foundation Symposium 28 (Associated Scientific Publishers, Amsterdam) pp. 7 – 23.

Sahasrabuddhe, C. G., Van Holde, K. E. (1974) J. Biol. Chem. *249*, 152 – 156.

Simpson, R. T. (1978) Biochemistry *17*, 5524 – 5531.

Suau, P., Bradbury, M. und Baldwin, J. P. (1979) Eur. J. Biochem. *97*, 593 – 602.

Thoma, F., Koller, Th., Klug, A. (1979) J. Cell Biol. *83*, 403 – 427.

LAUDATIO FÜR PROFESSOR DR. JEAN-PIERRE KRAEHENBUEHL

Professor Henri Isliker
Professor für Biochemie an der Universität Lausanne

Vor rund 15 Jahren wandten sich zwei junge Medizinstudenten mit dem Anliegen an mich, eine wissenschaftliche Arbeit in Biochemie an meinem Institut durchführen zu können. Einer der beiden, Jean-Pierre Kraehenbuehl, fiel mir seines ungewöhnlichen Enthusiasmus und Einsatzes wegen auf. Er arbeitete Tag und Nacht im Labor, und es bleibt mir noch heute ein Rätsel, wie er mit einem Minimum an Vorlesungen sein Staatsexamen in Medizin so erfolgreich bestehen konnte.

Mein Mitarbeiter, Bernhard Blanc, befasste sich damals mit Milcheiweissen, und Herr Kraehenbuehl war von Beginn an vom Mechanismus der Resorption der Immunglobuline aus der Milch durch die Darmwand des Neugeborenen fasziniert. Er experimentierte an verschiedenen Tierarten und versuchte die Resorption mit der Ferritin-Methode elektronenmikroskopisch nachzuweisen. Sehr bald zeigte er die Schwächen dieses Verfahrens, die er durch die Einführung origineller neuer Methoden zu meistern verstand. – Die Milch, ihre Bildung, Sekretion, Resorption und Regulation hat also seit jeher im Mittelpunkt des Interesses unseres Preisträgers gestanden: so frönte er seit dem zartesten Kindesalter zuerst der Mutter- und der Kuhmilch, dann als Forscher der Kaninchen-, Ratten- und Mäusemilch. Jean-Pierre Kraehenbuehl liebte schon früh klare Konzepte: er hatte stets ein Grauen vor biochemischen Arbeiten, die sich ausschliesslich mit Wechselwirkungen in Gewebsextrakten befassten. Es lag ihm vor allem daran, den Einzelvorgang und dessen Lokalisation und Regulation innerhalb der Zelle zu erfassen. Das Elektronenmikroskop und die Immunologie blieben dabei wichtige Werkzeuge seiner Arbeit, aber immer nur Mittel zur Erforschung der Beziehungen zwischen Struktur und Funktion. – In den darauffolgenden Jahren blieb nicht nur der Enthusiasmus unseres Freundes erhalten, sondern er

bewies auch seine Fähigkeit, andere damit anzustecken und für seine Arbeit zu gewinnen: so Herrn M. Campiche, der bei unserem Kollegen Christoph Hedinger in der Lausanner Pathologie arbeitete und der ihm auch bald nach Abschluss seiner Dissertation eine Stelle anbot.

Ich selbst war wärend dieser Zeitspanne intensiv mit dem Aufbau des Schweizerischen Instituts für experimentelle Krebsforschung beschäftigt und konnte für die Arbeiten von Jean-Pierre Kraehenbuehl zunächst nicht genügend Mittel aufbringen. Dieser Tatsache wohl bewusst, verstand es der unternehmerische Doktorand, auch Laien für seine Arbeiten zu begeistern. Ein sonst nicht allzu freigebiger Industriemagnat gründete eigens für Herrn Kraehenbuehl eine Stiftung für Ernährungsforschung und trug damit wesentlich zum Erfolg seiner Arbeiten bei.

Anlässlich einer Reise im Jahr 1968 erfolgte eine für Herrn Kraehenbuehls weitere Entwicklung wichtige Begegnung mit dem grossen Meister der Ultrastruktur der Zelle, Nobelpreisträger George Palade. Der Entschluss, mit letzterem zu arbeiten, war sogleich gefasst. Obwohl der Meister sich für den jungen Forscher begeisterte, musste dieser zuerst einmal herausfinden, dass Herr Palade kein Meister im Beantworten der Korrespondenz ist. So waren etwa 12 Briefe und zwei Telefonanrufe nach New York erforderlich, bis endlich das lang erwartete Telegramm von Herrn Palade eintraf, in dem er unseren heutigen Preisträger an die Rockefeller-Universität einlud. Dieser wird Ihnen selbst über die spannenden fünf Jahre in New York und in Yale, wohin er Herrn Palade folgte, berichten.

Ich möchte hier nur noch erwähnen, dass die Assistentenzeit des Doktoranden Kraehenbuehl in der Lausanner Biochemie nicht vergessen wurde. Deshalb offerierte ihm dieses Institut nach seinem USA-Aufenthalt die erste Assistenz-Professur, welche frei wurde, eine Position, die jetzt stabilisiert wird.

Herr Kraehenbuehl wird wegen seiner scharfen, aber konstruktiven Kritik und seiner stets originellen Vorschläge im In- und Ausland geschätzt. Die vier Institute in Epalinges/Lausanne, für deren Koordination ich verantwortlich bin, tauschen laufend ihre Versuchs-

resultate aus, um sie einer gründlichen Qualitätskontrolle zu unterziehen.
Jean-Pierre Krachenbuehl hat dazu wesentlich beigetragen und in diesem Sinne auch der zunehmenden Spezialisierung entgegengewirkt. – Die Verleihung des Cloëtta-Preises wird die welsche Schweiz um so mehr ehren, als diese Auszeichnung bisher nur einmal an einen ihrer Söhne verliehen wurde.
Wie Sie gehört haben, konnte der Präsident des Nationalen Forschungsrates, Herr O. Reverdin, wegen anderweitiger Verpflichtungen an dieser Kundgebung nicht teilnehmen, und er hat mich gebeten, den Nationalfonds hier zu vertreten.
Beide Preisträger sind Gesuch- oder Mitgesuchsteller beim Nationalfonds, dessen finanzielle Lage sehr angespannt ist. Um auch jungen Forschern eine angemessene Startchance zu geben, drängt sich eine noch verschärfte Qualitätskontrolle der laufenden Gesuche auf, nicht nur im Nationalfonds, sondern vor allem an den Instituten und Hochschulen selbst. Interdisziplinäre Forschungsprojekte wie diejenigen unserer beiden jungen Preisträger sind besonders zu fördern, und ich wurde beauftragt, sowohl Herrn Koller wie Herrn Krachenbuehl die herzlichen Glückwünsche des Forschungsrates entgegenzubringen.

LE PRIX CLOËTTA 1979
EST DECERNE A

MONSIEUR

JEAN-PIERRE KRAEHENBUEHL

DOCTEUR EN MEDECINE

NE EN 1941, PROFESSEUR ASS. A L'INSTITUT DE BIOCHIMIE DE
L'UNIVERSITE DE LAUSANNE
POUR SES TRAVAUX SUR LE CONTROLE HORMONAL
DU DEVELOPPEMENT DE LA GLANDE
MAMMAIRE ET DE LA SECRETION DE LAIT

ZURICH, LE 12 DECEMBRE 1979

LE CONSEIL DE FONDATION

Professor Dr. Jean-Pierre Kraehenbuehl

KURZBIOGRAPHIE
VON HERRN PROFESSOR DR. JEAN-PIERRE KRAEHENBUEHL

Date de naissance	20 mars 1941 à Vevey
Lieu d'origine	Konolfingen BE
Etat-civil	marié, deux enfants (nés en 1965 et 1968)

Scolarité/Etudes

1948–1950	Ecole primaire à Vevey
1951–1958	Collège secondaire à Vevey
1958	Certificat d'études secondaires
1958–1960	Gymnase classique cantonal à Lausanne
1960	Baccalauréat B (latin-anglais) et maturité fédérale
1960–1967	Etude de médecine à la Faculté de médecine de Lausanne
1966	Examination of the Educational Council for Foreign Medical Graduates
1967	Diplôme fédéral de médecin
1968	Thèse pour le grade de docteur en médecine (acceptée en 1969)

Formation post-universitaire

1967–1968	Assistant-médecin. Institut de biochimie de l'Université de Lausanne (Professeur H. Isliker) Recherche et enseignement
1968–1969	Médecin-assistant. Service de médecine interne, hôpital de la Chaux-de-Fonds (Professeur B. Courvoisier)
1969–1970	Associé de recherche, Institut de pathologie de l'Université de Lausanne (Professeur C. Hedinger). Recherche et enseignement

1971–1973	Research Associate. Department of Cell Biology (Professor G. E. Palade), Rockefeller University, New York. Recherche
1973–1975	Assistant-Professor. Yale University School of Medicine, Section of Cell Biology (Professor G. E. Palade), New Haven, Conn. Recherche et enseignement
1975–1980	Professeur-assistant. Institut de biochimie (Professeur H. Isliker). Université de Lausanne. Enseignement et recherche.
1980	Professeur associé. Institut de biochimie. Université de Lausanne

HORMONAL CONTROL OF THE DIFFERENTIATION OF THE MAMMARY GLAND

Professor Dr. J. P. Kraehenbuehl

Introduction

The mammary gland is a unique specialization of mammals, which differentiated approximately a hundred million years ago and enabled mammals to adapt more readily than reptiles to changing weather conditions on earth. This specialization of skin glands to secrete milk, a form of nourishment to immature offsprings reduced the need for long incubation periods of large vulnerable eggs. Two species, the ornithorhynx and a spiny anteater, still survive today to provide evidence for the gradual transition from reptiles to mammals. They are egg-laying mammals which feed their young with milk. In eutherian mammals, highly developed placentas differentiated at the same time as skin gland specializations on the ventral aspect of the animals intensified resulting in a complex lobulo-alveolar organ, the mammary gland. Such a concept of ontogenesis of the mammary gland is consistent with the early development of mammary primordial features, i.e. the mammary line and the buds in the embryo.

In the last decades, biology of the mammary glands has been extensively studied by cell and molecular biologists, clinicians and dairy scientists mainly for the following reasons:

First milk and products manufactured from milk play an important role in the world supply of food. Thus, in 1968 approximately 40 million tons of milk were produced by the main producing countries, out of which 4 million tons were used for cheese, 6 for concentrated milk and 6 for milk powder (1).

Second, it has been shown that breast feeding plays an important role in protecting the newborn against infections. In some species, survival of the offspring is absolutely dependent on transmission of passive humoral immunity from the mother to the young via milk. In this context the mammary gland and its secretion are of prime

immunologic importance to the suckling for a variety of reasons, some of which are well known, whereas others are now emerging.
Third, breast cancers represent approximately 15 % of all cancers and one third of all cancers in females. They are the leading cause of death in females between the age of 40 and 45 (2). As stated by M. J. Brennan, the mammary cancer has in terms of its process-description a full congruity with the numerous other malignant tumors which affect mankind and together are responsibile for up to one fifth of all deaths from disease among the technologically advanced people of the world (3).
Finally, the mammary gland provides cell and molecular biologists with an ideal model to study gene regulation, hormonal control of gene expression, and the process of secretion.
My interests in the field of mammary gland biology have been to elucidate the mechanism of transport of immunoglobulin across the mammary epithelium and more recently to investigate the role of lactogenic hormones in the induction of milk protein synthesis and secretion.
I shall now briefly review the hormonal control of early development of the mammary gland, as well as the differentiation which occurs at puberty, during pregnancy and lactation. Then I shall describe the attempts we have made to dissect the mammary gland in order to analyse early events induced by lactogenetic hormones on mammary cells, to characterize the initial steps in the uptake of secretory immunoglobulins and finally to reconstitute in vitro functional mammary epithelial monolayers.

Differentiation of the mammary gland

From in vivo and in vitro studies performed in various mammals, a general pattern of differentiation has emerged and classically five stages are described.
Embryonic and foetal development. The first visible evidence of mammary gland development is a faint thickening in the ventrolateral ectoderm of the embryo, the mammary line. The time of appear-

ance varies from one species to the other. The mammary line differentiates in turn into mammary buds, from which primary ducts are formed as a result of intense cell proliferation. The number of primary ducts will determine the number of openings eventually arising from each nipple or teat. These early development steps are under the control of poorly characterized factors produced by the mesenchyme underlying the mammary ectodermic structures. In males testosterone, a steroid produced by Leydig cells in the testicles, stops growth of the mammary anlage and in some species induces the regression of part of the mammary gland, i.e. the nipples in mice. In females, secondary ducts differentiate during foetal life and/or at birth. Mammary growth from birth to the approach of puberty parallels body growth. The location, the number of glands, the number of openings per nipple or teat, the presence or absence of udder structures and the time sequence varies greatly from one species to the other.

Development at puberty. At some time prior to the appearance of other external signs of puberty in females, growth in all tissues of the mammary gland accelerates and the duct system proliferates through the connective tissue and the fat pad. Sexual steroids with the onset of ovarian cycles induce DNA synthesis and cell division. The relative importance of oestrogens versus progesterone is species-dependent. Very little is known about the molecular mechanisms by which these hormones regulate DNA replication, mitosis and cell division.

Development during pregnancy and lactation. During pregnancy, ductal elongation and branching resumes, and lobuloalveolar development fills the stroma between ducts. Epithelial cell proliferation continues through pregnancy and into lactation. When first formed, alveolar cells resemble those of small ducts. But rapidely they differentiate into secreting cells, with a concomittant development of rough endoplasmic reticulum, Golgi complexes and secretory vacuoles. Rise in synthetic enzyme levels involved in fat, lactose and protein synthesis as well as accumulation of secretory products in cells and lumina, occur in different sequences and at different relative times during the gestation span in various species. Milk available to

the suckling during the first day is mainly that accumulated before birth and is termed colostrum; its antibody content is extremely high. Soon after parturition, the rates of all secretory activites rises rapidly and typical milk appropriate for the need of the young is secreted. Mammary growth, milk synthesis and secretion is controled by several hormones, i.e. mitogenic, morphogenic and lactogenic hormones. In order to elucidate the mechanism by which these hormones regulate the activities of the mammary gland, it was necessary to develop in vitro systems which allow the analysis of the effect of each hormone individually in a chemically well defined medium. Two such systems have been widely used, namely organ explants and dispersed mammary cell cultures. Whereas organ explant culture provides a mini mammary gland, in which the original topography and the relationship between the various cells is respected, it suffers from cell heterogeneity which makes it difficult to relate a given biological response to a given cell type. This is the reason why I developed a procedure for the preparation of viable dispersed cells, free of interstitial and myoepithelial cells (4). Such homogenous cell populations made it possible to study the relationship between hormone binding to cell membrane receptors and the triggering of events leading to expression of biological activity.

I shall now briefly review some of the properties of each group of hormones which act on mammary cells during gestation and lactation.

Mitogenic hormones. Several hormones including progesterone and oestrogens, insulin and insulin-like hormones, epidermal growth factors have been shown to stimulate DNA synthesis mitosis and cell division in vivo. So far, however, no appropriate in vitro system allows the study of the metabolism of these hormones in mammary cells and the molecular mechanism responsible for DNA replication, since primary cultures of normal mammary cells do not proliferate in response to hormone stimulation.

Morphogenic hormones. Recently it has been shown that thyroid hormones (5) play an important role in the lobuloalveolar differentiation of the mammary gland. So far, however, only the phenotypic expression of this process has been analysed and very little is known

on the molecular events which are elicited by thyroid hormones. It has been demonstrated in organ explants that glucocorticoids are responsible for a marked increase in rough endoplasmic reticulum and it has been postulated that thereby they stabilize messenger RNA coding for milk proteins (6).

Lactogenic hormones. Genetic expressions of milk proteins is controled by a group of hormones which exhibit sequence homology and probably evolved from a common ancestral gene. They include prolactin (Mr 24,000) with an amino acid sequence of 198, placental lactogens and growth hormones of some species (human growth hormone). The molecular mechanism whereby lactogenic hormones regulate the expression of specific genes has been extensively investigated (6). Very little is known, however, on the cellular events which allow lactogenic hormones to exert their effect on gene expression. Lactogenic hormones do not appear to act through the classical peptide hormone pathway, involving an initial binding of the hormone to a membrane receptor followed by the activation of nucleotide cyclase. The binding of prolactin to a receptor on membrane preparations was first described by Friesen and his colleagues (8), but little information was available on the binding to intact mammary cells.

Binding properties of lactogenic hormones to dispersed mammary cells

Yolande Suard, a graduate student in my laboratory, in collaboration with Michel Aubert at the University of Geneva, has characterized the initial events in hormone action on mammary cells. The number and affinity of binding sites for lactogenic hormones on mammary cells at different stages of differentiation were determined. Mammary cells bind lactogenic hormones in a relative slow, saturable and reversible process. The number of exposed receptors varies throughout gestation and lactation in an inverse relation to the serum progesterone concentration. The mechanism by which progesterone down-regulates prolactin receptors remains unknown. We intend to examine in mammary primary monolayers the effect of progesterone on prolactin receptor metabolism. Our study also provided kinetic and

morphological evidences that prolactin can enter mammary cells upon interaction with surface receptors. Prolactin rapidly concentrates in the Golgi complex, which could mediate hormone action inside the cells and/or be involved in the process of hormone degradation. At further time points, prolactin can be visualized in nuclear and in lysosomal-like structures. Degradation in the lysosomal system does not seem to play an important role in prolactin-receptor metabolism, at least during the first hour of incubation, since the hormone can be recovered from the cells chemically and functionally intact. Nuclear localization suggests that lactogenic hormones act directly on genetic constituants. The kinetics of uptake and nuclear translocation parallel the rapid increase in rate of casein gene transcription by lactogenic hormones. It will now be of great importance to characterize the binding of lactogenic hormones to isolated nuclei and to correlate such a binding with initiation of transcription in cell free systems.

Milk protein synthesis and secretion in primary monolayer cultures of rabbit mammary cells

Since dispersed mammary cells are able to bind specifically lactogenic hormones and internalize them, it was of interest to analyse whether such cells are able to reconstitute functional epithelial monolayers in culture. It was the task of another graduate student in my laboratory, Marie Thérèse Häuptle, to work out culture conditions allowing mammary cells to remain viable and respond to hormonal stimulation. A published procedure (9) was modified and adapted to our cell system.

In parallel, several milk proteins from rabbit milk were purified to homogeneity. Antibodies against 4 milk proteins were raised in goats and used as probes for immunocytochemistry and radioimmunoassays. The following proteins were isolated: caseins and α-lactoalbumin, which are specific gene products of the mammary gland, transferrin which is immunologically undistinguishable from serum transferrin produced by the liver; and secretory component, a glycoprotein

secreted by epithelial cells from mucous surfaces lining the digestive, respiratory and urogenital tracts as well as exocrine glands, including the mammary gland. To test whether all these proteins were the gene product of the mammary gland and were not present in milk as a result of transsudation, total polyadenylated messenger RNA was isolated from lactating mammary glands. After purification on sucrose gradients, the mRNA populations were translated in a cell free reticulocyte lysate system and the translation products immunoprecipitated by specific antisera. All proteins mentioned were translated and recovered by precipitation with the corresponding antibody. Recently, the genes coding for caseins have been cloned into E. Coli Hb 101, using PBR 322 as a vector. These cDNA probes will now be used to titrate mRNA in the mammary monolayers using cDNA excess hybridization techniques, in order to analyse early transcriptional events in response to lactogenic hormones.

Our data indicate that caseins and α-lactalbumin synthesis is induced by lactogenic hormones. The shape of the cells and the substrate on which the cells are grown determine the importance of the biological response. If cells are grown as monolayers on attached collagen gels as a substrate, no induction is observed. However, if the collagen gels are detached from the Petri dishes, after confluency is achieved, protein synthesis increases rapidly. Casein and α-lactalbumin synthesis and secretion is induced only in response to lactogens. The response is dose-dependent with a surprising inhibition of synthesis and secretion at superoptimal concentration of the hormone. Although transferrin synthesis and secretion is stimulated by collagen gel detachment, the response is hormone independent. On the other hand, SC secretion which rises upon collagen gel detachment is inhibited by prolacin. Morphologically at confluency, mammary monolayers form thin epithelial sheets with flattened cells. The surface occupied by the luminal membrane is almost identical to the area associated with the basolateral membrane. Upon detachment of the collagen gels the cells very rapidly shrink and contract with a drastic increase in the basolateral cell surface. The low synthetic activity of cells on attached gels could result from the incapac-

ity of flattened cells to maintain optimal monovalent cation gradients. In order to test whether high intracellular Na^+ is responsible for the low synthetic activity, we intend to measure Na^+ efflux from cells cultured on attached or detached collagen gels.

Work is now in progress to determine which cells process the milk proteins. Using immunocytochemical procedures I have developed over the years (11–13), with the excellent technical assistance of Liliane Racine, we intend to examine both at the light and the electron microscope whether all cells process all proteins or whether the differential hormonal regulation reflects processing heterogeneity. In each cell, it is possible now to map the secretion pathway for 2 milk proteins by using double labeling techniques and quantitative information can be obtained by combining immunocytochemistry and morphometry (14–17), which will enable to see whether biochemical data obtained on average cell populations pertain to individual cells.

In conclusion, lactogenic hormones bind to dispersed mammary cells as a saturable, reversible, temperature-dependent process. Variation of receptor concentration occurs throughout gestation and lactation and could represent an essential parameter modulating prolactin activity. Internalization of lactogenic hormone could represent a mean by which the hormone regulates gene expression in a manner similar to steroid hormones (18). When cultured as primary monolayers, mammary cells form thin epithelial sheets on attached collagen gels, which upon detachment retract and become functional and hormone-responsive.

Transport of immunoglobulins across mammary epithelial cells

In vertebrates, the defense of mucous surfaces and of secretory epithelia such as salivary, lacrimal, or mammary glands is determined by complex interaction of both immune and non immune mechanisms. Immune reactions are mediated by the secretory immunologic system characterized by local production of 11 S immunoglobulin A antibody termed secretory IgA found in the secretions. In mammals transfer of secretory immunity from the mother to the young in the

form of secretory immunoglobulin secreted into colostrum and milk is of great importance since the newborn is unable to build up its own secretory immune response due to a lack of previous experience and because the mucous surfaces, particularly those of the intestinal and respiratory tracts, are the first sites to experience major antigenic challenge.

Much biologic and biochemical data in the literature have now been reported which suggested that 1) secretory IgA molecule has a unique structure in all species, 2) specific cell types are involved in the processing of this molecule, and 3) production of specific antibodies results from local antigenic stimulation (19, 20).

My contribution in this field has been to further characterize the structure of secretory IgA (sIgA) in the rabbit, to analyse the processing of sIgA in the rabbit mammary gland, and to determine the role of the hormonal environment on processing and transport of sIgA. The different subunits of sIgA have been isolated and purified to homogeneity; antibodies have been raised against the IgA dimer formed by heavy (α chains) and light chains and a small joining chain (J chain) responsible for dimerization, and a glycoprotein (Mr ~ 80,000), the so-called secretory component or transport piece. It was the thesis work of Lukas Kühn (21, 22) to characterize the sIgA subunits and analyse kinetically the parameters regulating reassociation. He has shown that IgA dimer and secretory component reassociate following Michaelis-Menten kinetics, with a fast association rate constant ($2.4 \times 10^5\ M^{-1}$) and dissociation rate constant ($1.8 \times 10^{-3}\ min^{-1}$) and an affinity constant of $\sim 10^8\ M^{-1}$. In addition, the thermodynamic parameters as well as temperature dependence were characterized. Using immunocytochemistry at the electron microscope, we have shown that the IgA dimer is produced in plasma cells located in the interstium of the mammary gland. IgA dimer is also detected in apical vacuoles of the mammary alveolar cell and in the gland lumen. In contrast, secretory component is found exclusively in the alveolar mammary cells, in the secretory apparatus, i.e. the rough endoplasmic reticulum, the Golgi complex and secretory granules, suggesting that SC is synthesized and processed by mammary epithelial cells

according to the classic pathway (23, 24). Further, evidence for mammary epithelial synthesis came from our cell free translation experiments using polyadenylated mRNA isolated form lactating glands (see above). SC is also found associated with the luminal and basolateral cell membrane and in the lumen. Since intercellular diffusion of IgA dimer secreted by local plasma cells is restricted by the presence of tight junctions which seal the mammary cells at their apical ends, one has to postulate a mechanism for uptake and transepithelial transport.

The presence of SC at the cell surface made this molecule an ideal candidate for specific recognition and uptake. Lukas Kühn has characterized the role of secreted SC isolated from rabbit milk in mediating uptake of IgA dimer. Using dispersed mammary cells or plasma enriched membrane fractions, he has first shown that SC binds specifically, rapidly and with a high affinity ($K \sim 5 \times 10^8\ M^{-1}$) to dispersed cells. Exogenously bound SC is then in turn able to interact with IgA dimer and the process is reversible, saturable, rapid, temperature-dependent, but pH-independent. These data demonstrate that secreted SC binds specifically to mammary cells which in turn acts as a receptor for the specific uptake of IgA dimer. In liver, a similar mechanism has been identified.

A model for specific uptake of IgA dimer can be proposed based on our immunocytochemical and kinetic data. SC destined to secretion binds to a membrane receptor at the luminal cell surface or intracellularly. The interaction is then stabilized. The mechanism and the cellular pathway by which membrane-bound SC appears at the basolateral cell surface facing the plasma cell which produces IgA dimer remains unknown but can be analysed in our reconstituted mammary epithelial monolayer culture system. Once exposed at the basolateral surface, membrane-bound SC interacts with IgA dimer. Again, the mechanism and the route of translocation across epithelial cells is not elucidated. At the luminal cell surface, or intracellularly, release of IgA dimer from membrane-bound SC results from competition with free SC.

Cooperativity of two cell types of different embryonic origin, such as

epithelial and lymphoid cells, in the processing of a single macromolecule is a unique biological problem of considerable interest. In addition, in view of the similarity of the secretory immunologic system in the rabbit and in man, the results of our study should provide basic information on the human secretory immune system and may relate to diseases of the human neonate, such as gastrointestinal and respiratory diseases, malabsorption syndrome or even autoimmune disease (25) or malignancy (26).

References

1. "Diary Produce". 1969. The Commonwealth Secretariat, London.
2. Cutler, S. J., and Young, J. L. Eds. 1975 "Third National Cancer Survey; Incidence Data". Nat. Cancer Inst. Bethesda, Maryland.
3. Brennan, M. J. 1978. Lactation and the breast cancer process. In: "Lactation" Vol. IV. Ed. B. L. Larson. Academic Press, New York.
4. Kraehenbuehl, J.P. 1977. Dispersed mammary gland epithelial cells. I. Isolation and separation procedures. J. Cell Biol. *72:* 406.
5. Vonderhaar, B. K., and Greco, A. E. 1979. Lobulo-alveolar development of mouse mammary glands is regulated by thyroid hormones. Endocrinology *104:* 409.
6. Devinoy, E., and Houdebine, L. M. 1977. Effects of glucocorticoids on casein gene expression in the rabbit. Eur. J. Biochem. *75:* 411–416.
7. Rosen, J. F., Guyette, W. A., and Matusik, R. J. 1978. Hormonal regulation of casein gene expression in the mammary gland. In "Ontogeny of receptors and mode of action of reproductive hormones". Eds. Hamilton, T. H., and Clark, J. L. Raven Press.
8. Shiu, R. P. C. and Friesen, H. G. 1976. Blockade of prolactin action by an antiserum to its receptors. Science *192:* 259.
9. Emerman, J. T., and Pitelka, D. R. 1977. Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. In vitro *13:* 316.
10. Kraehenbuehl, J. P., Racine, L., and Jamieson, J. D. 1977. Immunocytochemical localization of secretory proteins in bovine pancreatic exocrine cells. J. Cell Biol. *72:* 390.
11. Kraehenbuehl, J. P., and Jamieson, J. D. 1972. Solid phase conjugation of ferritin to Fabfragments of immunoglobulin G for use in antigen localization on thin sections. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) *69:* 1771.
12. Kraehenbuehl, J. P., and Jamieson, J. D. 1974. Localization of intracellular antigens by immunoelectron microscopy. Int. Rev. Exp. Pathol. *13:* 1.
13. Kraehenbuehl, J. P., and Jamieson, J. D. 1976. Enzyme-labeled antibody makers for electron microscopy. In "Methods in Immunology and Immunochemistry" vol. 5. Ed. Williams and Chase. Academic Press.
14. Papermaster, D. S., Schneider, B. G., Zorn, M. A., and Kraehenbuehl, J. P. 1978. Immunocytochemical localization of opsin in outer segments and Golgi zones of frog photo-receptor cells. An electron microscope analysis of cross-linked albumin embedded retinas. J. Cell Biol. *77:* 196.
15. Papermaster, D. S., Schneider, B. G., Zorn, M. A., and Kraehenbuehl, J. P. 1978. Immunocytochemical localization of a large intrinsic membrane protein to the incisures and margins of frog rod outer segment. J. Cell Biol. *78:* 415.

16. Kraehenbuehl, J. P., Weibel, E. R., and Papermaster, D. S. 1978. Quantitative immunocytochemistry at the electron microscope. In: "Immunofluorescence and related staining techniques". Edt. Knapp, W., Holubar, K., and Wick, G. Elsevier, North Holland. p. 245 - 253.

17. Kraehenbuehl, J. P., Racine, L., Griffiths, G. W. 1980. Attempts to quantitate immunocytochemistry at the electron microscope. Histochem. J. *12:* 317 - 332.

18. Suard, Y., Aubert, M., and Kraehenbuehl, J. P. 1979. Dispersed mammary epithelial cells. II. Receptors of lactogenic hormones in virgin, pregnant and lactating rabbit. J. Biol. Chem. *254:* 10 466.

19. Kraehenbuehl, J. P., Bron, C., Sordat, B. 1979. Transmission of humoral secretory and cellular immunity from the mother to the offspring. Current Topics in Pathology. Vol. 66. Springer Verlag. pp. 105 - 107.

20. Kraehenbuehl, J. P., and Kühn, L. 1978. Transport of immunoglobulins across epithelia. In: "Transport of macromolecules in cellular systems". Dahlem Konferenzen. Berlin. p. 213.

21. Kühn, L., and Kraehenbuehl, J. P. 1979. Interaction of rabbit secretory component with rabbit IgA dimer. J. Biol. Chem. *254:* 11 066.

22. Kühn, L., and Kraehenbuehl, J. P. 1979. Role of secretory component, a secreted glycoprotein, in the specific uptake of IgA dimer by epithelial cells. J. Biol. Chem. *254:* 11 072.

23. Kraehenbuehl, J. P., Galardy, R. E., Jamieson, J. D. 1974. J. Exp. Med. *139:* 208.

24. Kraehenbuehl, J. P., Racine, L., Galardy, R. E. 1975. Localization of secretory IgA, secretory component and *a* chain in the mammary gland of lactating rabbits by immunoelectron microscopy. Ann. N.Y. Acad. Sci. *254:* 190.

25. Amman, A. J., and Hong. 1973. Medicine Balt.

26. Gatti, R. A., and Good, R. A. 1973. Cancer Res.

Übersicht über die bisher erschienenen Publikationen der Schriftenreihe Stiftung Professor Dr. Max Cloëtta

Heft Nr. 1:

Vorwort von Bundesrat Dr. Hans Hürlimann
Biographie von Professor Dr. Max Cloëtta
Übersicht über die Stiftung Professor Dr. Max Cloëtta
Ehrentafel der Preisträger

Heft Nr. 2

Preisverleihung 1974
Festvortrag des Preisträgers Dr. med. Urs A. Meyer:
«Klinische Pharmakologie – eine Herausforderung für interdisziplinäre Zusammenarbeit»

Heft Nr. 3

Preisverleihung 1975
Festvortrag des Preisträgers Dr. med. Hans Bürgi:
«Die Bekämpfung des Kropfes in der Schweiz. Ein Beispiel der Zusammenarbeit zwischen Grundlagenwissenschaftern, Klinikern und Behörden»

Heft Nr. 4:

Cérémonie de remise du prix 1976
Exposé du Dr Rui C. de Sousa, sur le thème:
«La membrane cellulaire: une frontière entre deux mondes»

Heft Nr. 5:

Preisverleihung 1977
Festvortrag des Preisträgers Professor Dr. Franz Oesch:
«Chemisch ausgelöste Krebsentstehung»

Heft Nr. 6

Preisverleihung 1978
Festvortrag des Preisträgers Dr. Susumu Tonegawa:
«Cloning of Immunoglobulin Genes»