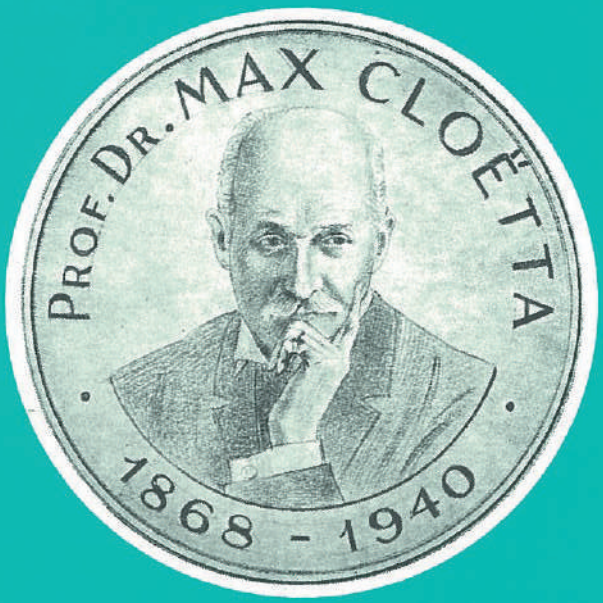


Preisverleihung 1985

STIFTUNG PROFESSOR DR. MAX CLOËTTA

Heft Nr. 13

«Entwicklungsneurobiologie; von der deskriptiven Analyse zum molekularen Verständnis»

«Cell-Extracellular Matrix Interactions in Organogenesis»

STIFTUNG
PROFESSOR DR. MAX CLOËTTA

Zwölfte Preisverleihung

25. November 1985
Zürich

Heft Nr. 13 der Schriftenreihe
Stiftung Professor Dr. Max Cloëtta
Kurhausstrasse 28, 8032 Zürich

INHALT

Vorwort des Präsidenten des Stiftungsrates, Herrn Dr. Hans W. Kopp 5

Laudatio von Herrn Professor Max M. Burger auf den ersten Preisträger, Herrn Professor Dr. Hans Thoenen 7

Urkunde für Herrn Professor Dr. Hans Thoenen 11

Kurzbiographie von Herrn Professor Dr. Hans Thoenen 13

Festvortrag von Herrn Professor Dr. Hans Thoenen mit dem Thema: «Entwicklungsneurobiologie; von der deskriptiven Analyse zum molekularen Verständnis» 15

Laudatio von Herrn Professor Lelio Orci auf den zweiten Preisträger, Herrn Dr. Roberto Montesano 51

Urkunde für Herrn Doktor Roberto Montesano 53

Kurzbiographie von Herrn Doktor Roberto Montesano 55

Festvortrag von Herrn Doktor Roberto Montesano mit dem Thema: «Cell-Extracellular Matrix Interactions in Organogenesis» 56

Übersicht über die bisher erschienenen Publikationen der Schriftenreihe Stiftung Professor Dr. Max Cloëtta 81

Ehrentafel der Preisträger 83

VORWORT

In letzter Zeit wurden Fragen um die Forschung vermehrt in der Öffentlichkeit diskutiert. Neue Akzentsetzungen blieben am Rand. Zur Hauptsache scheinen wir uns im Zeichen längst bekannter Tendenzen und zum Teil Irrtümer weiter zu streiten. Nicht zuletzt prägen eine immer noch recht naive Überbewertung auf der einen, Ablehnung auf der andern Seite das widersprüchliche Verhältnis der Öffentlichkeit zur Wissenschaft. Wir erwarten vom Wissenschafter und erst recht vom Forscher, dass von ihnen für alle Schwierigkeiten des Menschen Lösungen gefunden und uns aufgezeigt werden. Gegenläufig dazu ist unser Unbehagen gegenüber naturwissenschaftlichen Entwicklungen immer grösser geworden, denken wir nur an die für viele in Misskredit geratene Arzneimittelforschung oder an die starke Gegnerschaft, die den Tierversuchen erwachsen ist.
Die Vernachlässigung naturwissenschaftlicher Ergebnisse ebenso wie etwa der Verzicht auf technologische Anwendungen können für die Industrienationen existenzbedrohende Formen annehmen.
Als eine Schwierigkeit völlig anderer Art ergänzt die auf absehbare Zeit schlechte Finanzlage der öffentlichen Hand das Bild. Auf der einen Seite wird der an sich mit guten Gründen in der Schweiz hart praktizierte Personalstopp beklagt und darauf aufmerksam gemacht, dass auch durch ihn Lehre und Forschung gefährdet seien; auf der andern Seite verlangen Politiker gebieterisch eine Konzentration der Kräfte und Prioritätenordnungen, ohne immer zu sehen oder zu sagen, wie Anliegen solcher Art mit dem gesellschaftlichen, wirtschaftlichen und politischen Umfeld sich vertragen sollen.
Der Konflikt zwischen naturwissenschaftlichen Erkenntnissen und unsern individuellen oder kollektiven Wertvorstellungen ist nicht neu. Es gibt ihn, seit die Menschen sich um Durchblicke mühen, zugleich aber ihre Nahrung beschaffen und sich für ihr Überleben abrackern müssen, neuerdings freilich in mancherlei Beziehungen auch den Überfluss zu organisieren haben. Es ist nun die vornehme Aufgabe gerade auch des Naturwissenschafters, die Irrationalität des Menschen durch rationales Handeln zügeln zu helfen, dabei aber die nichtberechenbare Seite des Menschen im Auge zu behalten. Schon Goethe schrieb: «Das schönste Glück des denkenden Menschen ist,

das Erforschliche erforscht zu haben und das Unerforschliche ruhig zu verehren.»

Der genannten und mancher weitern Herausforderungen müssen wir uns bewusst sein, wenn wir nicht Abhängige einer irrational bestimmten Gesellschaft werden wollen.

Zwei Forschern, die sich ihrer Aufgabe mit besonderem Erfolg gestellt haben, wird dieses Jahr der Cloëtta-Preis verliehen. Es gibt viele preiswürdige Anwärter, aus denen sich der Stiftungsrat jährlich zwei Preisträger aussucht. Mit Dr. Montesano kommt das romanische Element zum Zug. Dr. Thoenen ist ein Schweizer, der im Ausland arbeitet.

Die Stiftung Professor Dr. Max Cloëtta beglückwünscht ihre Preisträger. Es tut deren Ehre und Würdigung keinen Abbruch, wenn wir gleichzeitig all jener gedenken, die in stiller und stummer Zurückhaltung Ergebnisse nicht oder noch nicht vorzeigen können, die vielleicht auch nie genügend anerkannt worden sind; Wissenschaft und Forschung sind eine weite Heimat mit vielen Schicksalen.

Ich möchte mit einem Satz von K. W. Deutsch schliessen, den er anlässlich eines Vortrags an der Hochschule St. Gallen geprägt hat: «Wir im Westen wissen und können viel. Aber es ist nicht genug, um die nächsten dreissig bis fünfzig Jahre zu überleben. Das Ergebnis unserer Bemühungen jetzt und in den nächsten zwanzig Jahren, mehr an Wissen und Können zu erwerben, wird für unser Schicksal entscheidend sein.»

Hans W. Kopp

LAUDATIO
AUF PROFESSOR DR. HANS THOENEN

Professor Dr. Max M. Burger

Einer molekularen Erklärung des Denkprozesses und insbesondere des Gedächtnisses näher zu kommen gehört zu den Wunschzielen, die viele Molekulargenetiker seit bald einer Generation, d. h. bald 25 Jahren, dazu bewegen, aus ihrer angestammten Domäne in die konzeptionell grüner scheinenden Gefilde der Neurobiologie überzutreten. Der schnelle und durchschlagende Durchbruch ist bis heute in diesem Gebiet ausgeblieben genauso wie in der Krebsforschung. Deswegen diese Gebiete zu plafonieren und sie jungen Forschern weniger zu empfehlen, wäre einer jener forschungspolitischen Fehlentscheide, wie sie leider mehr und mehr vorkommen, seitdem Forschungssteuerung am Zunehmen ist.

Zähes Ringen nur, Schritt für Schritt, Seillänge um Seillänge, so wie Sie es aus Ihren geliebten Bergen gewohnt sind, Herr Thoenen, wird in diesen Gebieten langsam, aber mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit zum Ziel führen.

Bei der embryonalen und frühkindlichen Entwicklung der richtigen Verzweigungen der Nervenbahnen wie auch bei der Etablierung gedächtnisähnlicher Prozesse und kognitiver Funktionen müssen sich langsame Informations-Übertragungsprozesse, z. B. von der Nervenendigung zum Nervenzellkern und von dort eventuell wieder zurück zur Synapse, abspielen. In gewissen Fällen werden sich solche Prozesse sogar über mehrere Nervenzellen hinwegziehen müssen.

Nach einer soliden Ausbildung in Pathologie und innerer Medizin haben Sie in derselben Firma, aus der auch der Stifter hervorkam, sich mit der Funktion des sympathischen Nervensystems zu beschäftigen begonnen. Dank Ihrer wissenschaftlichen Kuriosität sowie Ihrer eleganten Entdeckung der chemischen Sympathektomie ermöglichte Ihnen die Firma einen Gastaufenthalt in Prof. Julius Axelrods Gruppe am National Institute of Health in den USA. Dort begannen dann die Arbeiten über die Induktion der Enzyme wie Tyrosinhydroxylase, die den Neurotransmitter Noradrenalin herstellen.

Als einer der wenigen Preisträger, der Pharmakologe ist, wie es der Namensträger der Stiftung Prof. Max Cloëtta war, verbinden Sie nicht unerwarteterweise Gemeinsamkeiten in der Art, mit der Sie die Forschung konzipieren, wie Sie sie anpacken und wie Sie sie interpretieren, ja bis hinein in gewisse, z. T. oberflächliche Details. Sie studierten beispielsweise die Kälteexposition, die zur Tyrosinhydroxylase-Induktion führt. Die Wärmeregulation beim höheren Tier war ein zentrales Forschungsthema von Prof. Max Cloëtta. Sie publizierten, wie er, einen Grossteil Ihrer Arbeiten im «Naunyn-Schmiedebergs Archiv», jener Zeitschrift, die den Namen Oswald Schmiedebergs trägt, des geliebten Lehrers Prof. Max Cloëttas aus seiner ersten Assistentenzeit in Strassburg.

Mit dem Übertritt ans Biozentrum in Basel begannen Sie unser Verständnis über den ersten Nervenwachstumsfaktor auszuweiten. Bekannt war, dass Tiere, denen Antikörper gegen dieses Eiweiss verabreicht wurden, ihr sympathisches Nervensystem nicht entwickeln konnten. Sie zeigten, dass dieses Eiweiss durch nur in diesen Zellmembranen spezifisch vorhandene Rezeptoren aufgenommen wurde und dann von der Nervenendigung über riesige Distanzen zum Zellkern transportiert wird. Im Unterschied zu Giften, wie Tetanus Toxin, das dann in weitere Nervenzellen im Zentralnervensystem übertragen wird, zeigten Sie, dass nun neue Signale, durch den Nervenwachstumsfaktor ausgelöst, die nächste, gegen das Zentralnervensystem zurückliegende Station anregen.

Ihr Beitrag zur Aufbauphase des Basler Biozentrums und insbesondere Ihre kompromisslose Einstellung zur Förderung qualitativ höchster Ansprüche in der Forschung sowie Ihre persönlich höchste Integrität in dieser Phase sei Ihnen an dieser Stelle verdankt.

Beiträge zur genaueren Abklärung der Kaskade der Stimulation der Enzyminduktion und des Wachstums der Nervenzelle vom Nervenzellzielorgan ausgehend sind Ihnen seit Ihrer Wahl zum Direktor am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München auch weiterhin gelungen. Trotz dieser neuen, ehrenvollen Aufgabe im Nachbarland und der damit verbundenen administrativen Belastungen haben Sie mit Ihrer Gruppe neue Nervenwachstumsfaktoren gefunden und gezeigt, dass in verschiedenen Organen die Konzentration des Faktors mit der Dichte der Nervenfaserendigungen einhergeht, was die These nun bestens untermauert, dass der Faktor, vom Zielorgan produ-

ziert, das Einwachsen und Überleben von Nervenfasern im Zielorgan garantiert. Diese und ähnliche Konzepte unterstützen die berechtigte Hoffnung, dass solche Faktoren eventuell einmal bei traumatischen oder viralen Nervenläsionen ihre therapeutische Anwendung finden könnten.

Ihnen, lieber Herrn Thoenen, möchte ich zum Cloëtta-Preis gratulieren und weiterhin bei der Verfolgung Ihrer Forschungsziele die auch immer wieder nötige Dosis Glück wünschen.

Ihnen, meine sehr geehrten Herren vom Stiftungsrat, möchte ich im Namen aller Auslandschweizer, zu denen ich auch viele Jahre zählte, danken, dass Sie durch diese Preisverleihung die Bande mit unseren für die Forschungsszene Schweiz so wichtigen Kollegen im Ausland enger weben.

DER GLOËTTA-PREIS 1985
WIRD

HERRN PROFESSOR DR. MED.

HANS THOENEN

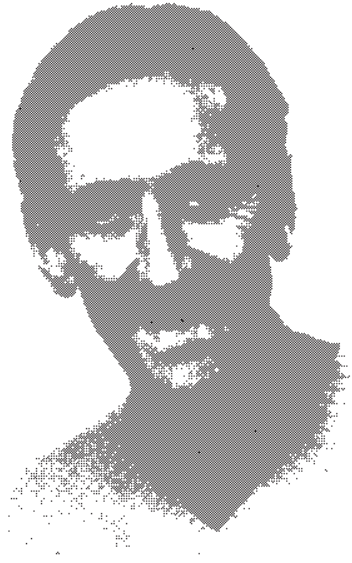
GEBOREN 1928 IN ZWEISIMMEN
DIREKTOR DES THEORETISCHEN INSTITUTS FÜR PSYCHIATRIE
DER MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT IN MÜNCHEN
IN ANERKENNUNG SEINER GRUNDLEGENDEN ARBEITEN
ZUM VERSTÄNDNIS DER FUNKTION DES SYMPATHISCHEN
NERVENSYSTEMS SOWIE DER WIRKUNG VON
NERVENWACHSTUMSFAKTOREN VERLIEHEN

ZÜRICH, 25. NOVEMBER 1985

FÜR DEN STIFTUNGSRAT:

DER PRÄSIDENT: DER VIZEPRÄSIDENT:

EIN MITGLIED:



Professor Dr. Hans Thoenen

CURRICULM VITAE

von Professor Dr. Hans Thoenen

Geburtsdatum:	5. Mai 1928
Geburtsort:	Zweisimmen, Kt. Bern, Schweiz
Heimatort:	Bern und Reutigen
Zivilstand:	verheiratet, zwei Kinder
Schulen:	Primar- und Sekundarschule Zweisimmen
	Gymnasium Burgdorf
	Maturität 1947
Studium:	Bern und Innsbruck
	Medizinisches Staatsexamen 1953

Bisherige Tätigkeit:

1954–1955:	Assistent am Pathologisch-Anatomischen Institut der Universität Bern (Prof. B. Walthard, Prof. H. Cottier)
1955–1959:	Medizinische Universitätsklinik Basel (Prof. H. Staub)
1960:	Institut für Experimentelle Gerontologie, Basel (Prof. F. Verzár)
1961:	Institut für Physiologie und Patho-Physiologie der Universität Gent, Belgien (Prof. I. Leusen)
1962–1968:	Abteilung für Experimentelle Medizin, F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel (Prof. A. Hürlimann)
1968–1969:	Laboratory of Clinical Sciences, Section on Pharmacology, National Institutes of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA (Dr. J. Axelrod)
1969–1971:	Abteilung für Experimentelle Medizin, F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel (Prof. A. Hürlimann)

1972–1978:	Forschungsgruppenleiter in der Abt. Pharmakologie, Biozentrum der Universität Basel
ab 1979:	Leiter der Abt. Neurochemie, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Martinsried

Promotionen und Berufungen:

1957:	Dr. med., Universität Bern
1969:	PD für Pharmakologie, Universität Basel
1970:	Berufung als Forschungsgruppenleiter an das Biozentrum der Universität Basel Ernennung zum a. o. Professor
1972:	Ernennung zum o. Professor
1977:	Berufung als Direktor der Abt. Neurochemie an das Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Martinsried
1981:	Ernennung zum Honorarprofessor der Ludwig-Maximilians-Universität München

Tätigkeit in Editorial Boards:

- Brain Research
- EMBO Journal
- Journal of Cellular Biochemistry
- J. Neurochemistry
- Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology
- Trends in Neuroscience

Ernennungen und Auszeichnungen

1975:	Mitglied der «European Molecular Biology Organization» (EMBO)
1978:	Associate of the Neuroscience Research Program, Massachusetts Institute of Technology
1979:	Mitglied der Deutschen Akademie der Naturforscher LEOPOLDINA
1980:	Verleihung des Feldberg-Preises

ENTWICKLUNGSNEUROBIOLOGIE; VON DER DESKRIPTIVEN ANALYSE ZUM MOLEKULAREN VERSTÄNDNIS

Prof. Dr. Hans Thoenen

Einleitung

Schon die deskriptive Analyse der Entwicklung des Nervensystems höherer Vertebraten ist äusserst faszinierend. Es entwickelt sich aus einer einfachen Epithelschicht zum komplexesten zellulären System, das die Evolution hervorgebracht hat. Wenn wir aber über die beschreibende Analyse hinaus zu einem zellulären und schliesslich molekularen Verständnis gelangen wollen, ist es unumgänglich, dass wir zuerst einmal reduktionistische Prinzipien anwenden. Die Notwendigkeit zu einem solchen Vorgehen ergibt sich aus der Tatsache, dass z. B. im menschlichen Gehirn auf relativ kleinem Volumen ungefähr 10^{11} Nervenzellen untergebracht sind, dass jede Nervenzelle im Durchschnitt mit vielen tausend anderen Nervenzellen in Verbindung steht und dass die Komplexität dieses Systems auch darin zum Ausdruck kommt, dass im Gehirn ein wesentlich grösserer Anteil der in jeder somatischen Zelle verfügbaren genetischen Information ausgedrückt wird als in allen übrigen Körperzellen zusammen. Das Verfolgen der Entwicklung solch komplexer Systeme aus einfachen Anfängen eröffnet Einblicke, die im voll differenzierten System nicht oder nur sehr viel schwieriger zu erhalten wären. Durch die sequenzielle Verfolgung während der Entwicklung können in vielen Fällen vereinfachende Prinzipien herausgelesen werden. Trotz dieser Möglichkeiten ist es notwendig bei der Zielsetzung des molekularen Verständnisses von Einzelvorgängen, die entsprechenden Untersuchungen an einfacheren Systemen durchzuführen. Man kann dabei an sich weniger komplexe Systeme wählen, wie etwa das Nervensystem von Mollusken oder Insekten. Man kann aber auch relativ einfach organisierte Teilsysteme höherer Vertebraten, z. B. das periphere Nervensystem, wählen. Die an diesen einfachen oder relativ einfachen Systemen erarbeiteten Prinzipien können dann gezielt in den komplexen Systemen auf ihre (allgemeine) Gültigkeit überprüft werden. Das war auch das Vorgehen bei der Analyse derjenigen Aspekte

der Entwicklung des Nervensystems, über die ich Ihnen in der Folge berichten möchte.

Selektive Regulation des Überlebens von Neuronen während der Entwicklung des peripheren und zentralen Nervensystems

Es ist ein generelles entwicklungsbiologisches Prinzip, dass im Laufe der embryonalen Entwicklung Zellen zuerst im Überfluss gebildet werden und dass dann die lokal unterschiedlich regulierte Degeneration bzw. das Überleben von Zellen einen wichtigen Mechanismus darstellt für die Entstehung der volldifferenzierten Strukturen. Das ist z. B. der Fall bei der Entwicklung der einzelnen «Strahlen» der Extremitäten oder auch bei der Entstehung der Struktur von Federn. Während der Entwicklung des Nervensystems höherer Vertebraten werden Neuronen in früheren Stadien der Entwicklung im Überschuss gebildet, und das regional unterschiedliche Überleben von Neuronen stellt einen wesentlichen Mechanismus bei der Entstehung der Struktur und Funktion des voll differenzierten zentralen und peripheren Nervensystems dar [1]. In Abb. 1 ist schematisch das Entstehen der unregelmässigen Verteilung der Motoneuronen im Rükkenmark eines Hühnerembryos dargestellt. Es geht daraus hervor, dass die ungleichmässige Verteilung dieser Neuronen nicht durch regional unterschiedliche Replikation der Vorläuferzellen oder durch Wanderung zustande kommt, sondern durch ein regional unterschiedliches Überleben der Motoneuronen. Das Ausmass des Überlebens ist mit der Grösse des peripheren Innervationsgebietes korreliert. Dass dieses unterschiedliche Überleben nicht genetisch fest programmiert ist, sondern epigenetischen Modifikationen zugänglich ist, geht aus klassischen Arbeiten experimenteller Embryologen in der ersten Hälfte dieses Jahrhunderts hervor (siehe 1, 2). Durch Entfernung der Anlagen von Gliedmassen in frühen Entwicklungsstadien degenerieren auch die Motoneuronen, die diese normalerweise innervieren. Durch Transplantation von zusätzlichen Flügel- oder Beinanlagen überleben Motoneuronen, die unter normalen Bedingungen degenerieren würden.

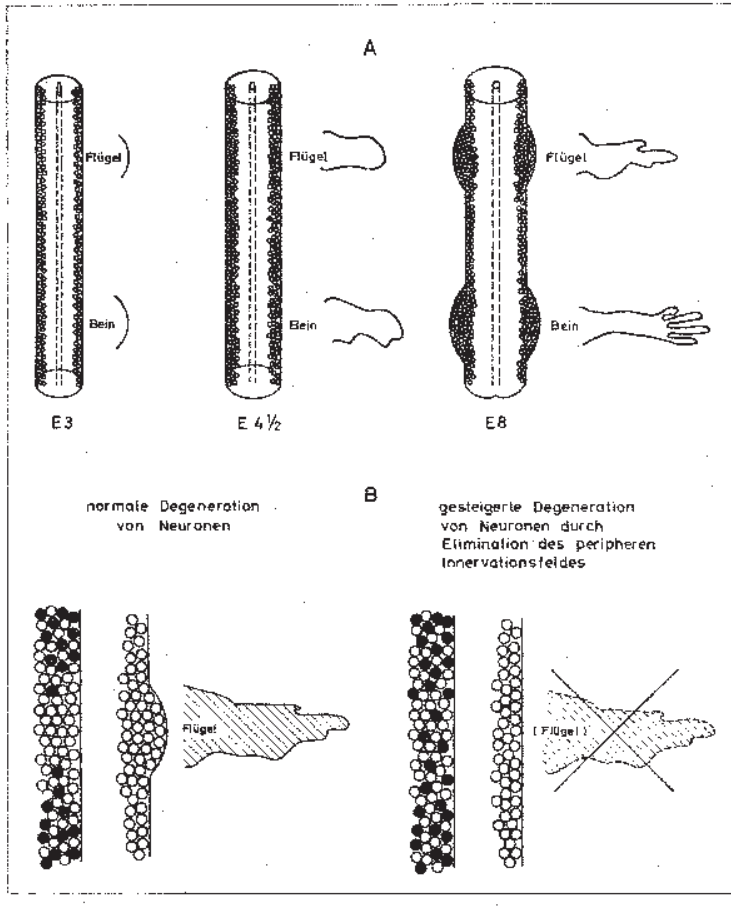


Abb. 1
Schematische Darstellung der Entwicklung der Motoneuronen des Rückenmarks des Hühnchens
Die Anhäufung der schematisch durch Kreise dargestellten Motoneuronen im Bereich der Flügel und der Beine kommt durch eine verminderte Degeneration von Neuronen in den Bereichen der grösseren Innervationsgebiete zustande (Abb. A). Durch Elimination der Flügelanlage degenerieren in diesem Bereich des Rückenmarks zusätzliche Neuronen (Abb. B). ○ = überlebende Neuronen; ● = degenerierende Neuronen; E = Embryonaltage.

Entdeckung des Nerve Growth Factors (NGF)

Die umfassendere Evaluierung des Prinzips, dass die Grösse des peripheren Innervationsfeldes die Zahl der innervierenden Motoneuronen im Rückenmark und in den sensorischen Rückenmarksganglien bestimmt, führte durch eine Reihe von ausserordentlich glücklichen Zufällen zur Entdeckung eines Mechanismus, wie das periphere Innervationsgebiet auf die innervierenden Neuronen einwirkt. Es wurde dementsprechend untersucht, ob zur Regulation dieses Phänomens die physiologischen, peripheren Innervationsgebiete (Flügel und Beine) durch Tumorgewebe ersetzt werden können [3]. Aus Gründen der zufälligen Verfügbarkeit wurde ein Mäusesarkom transplantiert, das, wie sich später zeigte, NGF produziert [4, 5]. Die Resultate dieser Versuche waren ursprünglich nicht die erwarteten, indem auf zuerst unerklärliche Weise sich nicht nur die sensorischen Neuronen im Bereich des Tumors, sondern im ganzen Hühnchen vergrösserten und auch die sympathischen Ganglien betroffen waren, während keine Wirkung auf die Motoneuronen nachweisbar war [3, 4]. War die zufällige Verwendung des Mäusesarkoms der erste glückliche Zufall, so war dieser von einer weiteren Kaskade von Glücksfällen gefolgt, die hier nicht in allen Einzelheiten dargelegt werden können (siehe 4, 5). Zwei Aspekte waren aber besonders wichtig, nämlich dass zum richtigen Zeitpunkt die richtigen Forscher sich mit dieser Frage beschäftigten, und man darf ruhig sagen, dass Rita Levi-Montalcini und Victor Hamburger in visionärer Voraussicht damals sehr schwer deutbare Phänomene richtig interpretierten und daraus die richtigen experimentellen Konsequenzen zogen [2, 4]. Als wesentlicher weiterer glücklicher Zufall darf die Tatsache betrachtet werden, dass Mutter Natur die für uns Neurobiologen glückliche Laune hatte, ein Molekül in einem Organ, nämlich der männlichen Speicheldrüse der Maus, in ungeahnt reichen Mengen produzieren zu lassen, wo es in bezug auf die Regulation der Entwicklung von Neuronen absolut keine Bedeutung hat. Diese «nutzlos» reichen Mengen von NGF ermöglichten aber den molekularen Zugriff, d. h. die Reinigung dieses Moleküls, die Produktion von Antikörpern und damit auch den Nachweis der physiologischen Bedeutung von NGF [4, 5, 6], die ich nun kurz darlegen möchte.

Der NGF als Überträger von Information zwischen peripheren Zielgebieten und den sie innervierenden Neuronen

Die Verfügbarkeit einer ausserordentlich reichen Quelle von NGF bildete die Voraussetzung zur Reinigung dieses Moleküls, zur Produktion von Antikörpern, zur Bestimmung der Aminosäuresequenz und schliesslich mit Hilfe gentechnologischer Methoden auch zur Charakterisierung des Vorläufermoleküls und der Organisation und chromosomalen Lokalisation des NGF-Gens [4–9]. Die Bedeutung der gentechnologischen Methoden kommt z. B. auch darin zum Ausdruck, dass es möglich wurde, die Struktur des menschlichen NGF aus genomischer DNA zu bestimmen [8], ohne dass menschlicher NGF gereinigt zu werden brauchte, was mit den bis jetzt zur Verfügung stehenden Methoden auch kaum möglich wäre. Damit ergibt sich die Möglichkeit, bei Bedarf menschlichen NGF mit biotechnologischen Methoden zu produzieren.

Die Evidenz, dass NGF als Überträger von Information zwischen den peripheren Innervationsgebieten und den innervierenden sympathischen und einem Teil der entsprechenden sensorischen Neuronen wirkt, basierte bis vor kurzem auf rein indirekten Anhaltspunkten. Wie in Abb. 2 schematisch dargestellt, haben wir nachgewiesen, dass der NGF mit hoher Selektivität von den entsprechenden Nervenendigungen aufgenommen wird und in membranbegrenzten Kompartimenten zu den Zellkörpern der Neuronen transportiert wird, wo die für den NGF charakteristischen biochemischen Effekte ausgelöst werden. Im sympathischen Nervensystem handelt es sich vor allem um eine selektive Induktion von Enzymen, die an der Synthese des adrenergen Transmitters Noradrenalin beteiligt sind. Daneben bewirkt NGF in sympathischen und sensorischen Neuronen auch eine Regulation der Synthese spezifischer Peptide wie Substanz P und Somatostatin. Dass diese «pharmakologischen» Effekte von physiologischer Bedeutung sind, wurde dadurch wahrscheinlich gemacht, dass die Unterbrechung des retrograden axonalen Transports die gleichen Auswirkungen hat wie die Neutralisierung des endogenen NGF durch Antikörper (siehe 5, 6). Die einmalige Applikation von NGF-Antikörpern bewirkt in frühen Entwicklungsstadien eine Degeneration der Neuronen, in voll differenzierten Neuronen einen temporären Abfall der durch NGF regulierten Enzyme und Peptide.

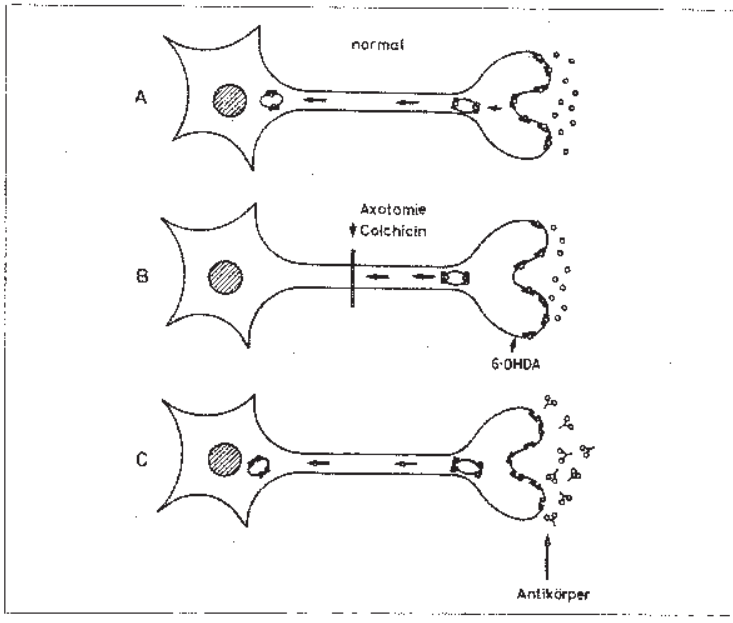


Abb. 2
Schematische Darstellung der physiologischen Bedeutung des retrograden Transports von NGF in sympathischen Neuronen
Physiologische Bedingungen (A): Die NGF-Moleküle (o) werden durch Vermittlung von Rezeptoren (▬) mit hoher Selektivität aufgenommen und in membranbegrenzten Kompartimenten mit rascher Transportgeschwindigkeit (mehrere Millimeter pro Stunde) in den Zellkörper der Neuronen transportiert, wo sie die für NGF spezifischen Wirkungen auslösen, wie z. B. die gesteigerte Synthese der Tyrosinhydroxylase und Dopamin-β-hydroxylase (geschwindigkeitsbestimmende Enzyme der Noradrenalin-Synthese), sowie spezifische Neuropeptide, wie Substanz P und Somatostatin.
Die Unterbrechung des retrograden axonalen Transports durch Axotomie, Colchicin oder durch Zerstörung der Nervenendigungen durch 6-Hydroxydopamin (Abb. B) hat die gleiche Wirkung wie die Neutralisierung von endogenem NGF durch Antikörper (Abb. C). In frühen Entwicklungsstadien führen die in A und B dargelegten experimentellen Massnahmen zur Degeneration der Neuronen. Im differenzierten adulten System führen sie zu einem temporären Abfall der Tyrosinhydroxylase und Dopamin-β-hydroxylase, was zeigt, dass NGF nicht nur für die Entwicklung des sympathischen Nervensystems von Bedeutung ist, sondern auch zur Aufrechterhaltung seiner differenzierten Funktionen.

Das zeigt, dass NGF nicht nur während der Entwicklung, sondern auch im voll differenzierten sympathischen und sensorischen Nervensystem zur Aufrechterhaltung spezifischer Funktionen von Bedeutung ist. Der direkte Nachweis einer Korrelation zwischen der Dichte der Innervation und dem NGF-Gehalt der Gewebe und der direkte Nachweis des retrograden Transportes von endogenem NGF waren bis vor kurzem nicht möglich, weil genügend zuverlässige und empfindliche Bestimmungsmethoden nicht zur Verfügung standen. Eine solche Bestimmungsmethode wurde von Sigrun Korsching in meiner Arbeitsgruppe entwickelt [10]. Die Empfindlichkeit dieser Bestimmungsmethode liegt im Bereich von 10^{-17} mol oder ungefähr einer Million Molekülen. Diese Bestimmungsmethode erlaubte den Nachweis, dass eine positive Korrelation besteht zwischen der Dichte der sympathischen Innervation und der Höhe des NGF-Gehalts der innervierten Gewebe (Tabelle 1). Sogar innerhalb eines einzelnen Organes ergeben sich regionale Unterschiede, wie das in Abb. 3 für das Vas deferens der Ratte dargestellt ist. Die besonders hohen NGF-Werte in den sympathischen Ganglien sind durch den retrograden axonalen Transport aus den peripheren Innervationsgebieten und nicht durch die lokale Synthese von NGF bedingt. Das wurde dadurch nachgewiesen, dass durch die Unterbrechung des retrograden Transports der NGF-Gehalt in sympathischen Ganglien mit einer Halbwertszeit von ungefähr 4 Stunden auf kaum messbare Werte nach 24 Stunden absank [11] (Abb. 4). Der geringe Beitrag der lokalen Synthese in den Ganglien kam auch darin zum Ausdruck,

Tabelle 1

Vergleich des NGF-Gehalts in sympathischen Ganglien und verschieden dicht innervierten Organen der Ratte

	ng NGF/g Gewebe
Vas deferens	2,1 ± 0,2
Iris	1,9 ± 0,3
Herzvorhof	1,0 ± 0,1
Speicheldrüse	0,5 ± 0,1
Herzventrikel	0,25 ± 0,05
Ganglion cervikale sup.	25 ± 4
Ganglion stellatum	19 ± 3

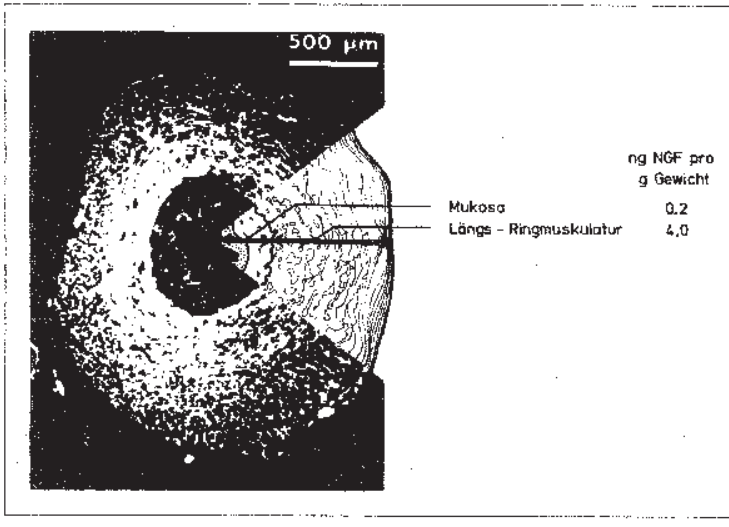


Abb. 3
Vergleich der Dichte der adrenergen Innervation und des NGF-Gehalts in den verschiedenen Schichten des Vas deferens
Die im linken Teil der Abbildung dargestellte Katecholaminfluoreszenz zeigt, dass die Dichte der Innervation in der Längs- und Ringmuskulatur wesentlich höher ist als in der nur spärlich innervierten Mukosa. Dementsprechend ist der NGF-Gehalt in der Mukosa 20mal niedriger als in der Muskularis.

dass die NGF-mRNA in den peripheren Organen mit der Höhe des NGF-Gehalts korreliert war, währenddem in den Ganglien trotz hohen NGF-Gehalts die NGF-mRNA an der Nachweisgrenze einer sehr empfindlichen quantitativen Bestimmungsmethode lag, die kürzlich durch Rolf Heumann entwickelt wurde [12]. Die Verfügbarkeit von quantitativen Bestimmungsmethoden für den endogenen NGF und die entsprechende mRNA erlaubten nun in jüngster Zeit auch erste Untersuchungen über die mögliche Regulation der Synthese von NGF. Diese ergaben, dass die niedrigen NGF-Werte in den peripheren Innervationsgebieten von sympathischen und sensorischen Neuronen durch verschiedene Mechanismen bedingt sind: Im Gegensatz zur Speicheldrüse wird der NGF nicht in den produzierenden Zellen gespeichert, sondern nach dem Prinzip der «konstituti-

ven Sekretion» unmittelbar nach der Synthese in kalziumunabhängiger Art und Weise ausgeschüttet. Die so kontinuierlich produzierten und freigesetzten (kleinen) NGF-Mengen werden von den innervierenden Nervenendigungen in sehr effizienter Weise aufgenommen und retrograd zum Zellkörper der Neuronen abtransportiert. Dass der rasche Anstieg von NGF nach Denervation (Abb. 4) nicht nur durch den Wegfall des retrograden Transports zustande kommt, sondern auch durch eine gesteigerte Synthese kann daraus geschlossen werden, dass dem raschen Anstieg von NGF in den denervierten Gebieten ein Anstieg der NGF-mRNA vorangeht. Das deutet darauf

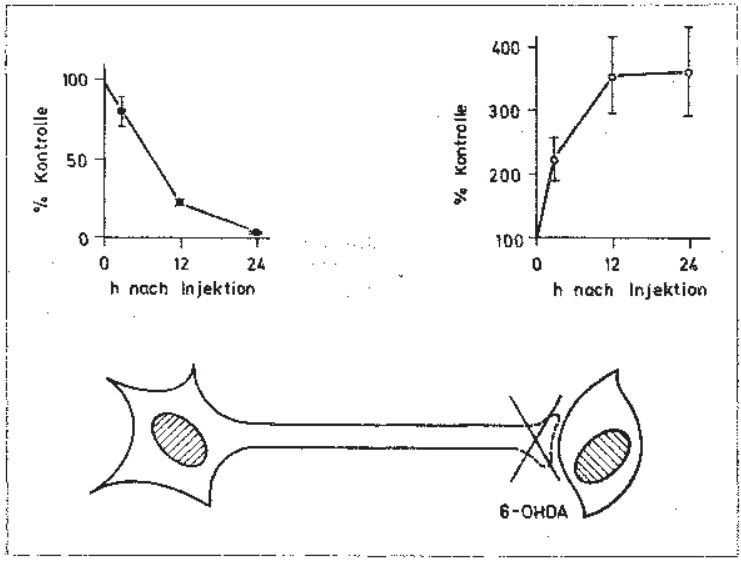


Abb. 4
Vergleich der Veränderung des NGF-Gehalts im Ganglion stellatum (links) und seinem Innervationsgebiet (Herzventrikel, rechts) nach einmaliger Verabreichung von 6-Hydroxydopamin
Durch die Zerstörung der sympathischen Nervenendigungen wird der retrograde Transport von NGF vom Ort der Produktion (Herz) zum innervierten Ganglion unterbrochen. Dort fällt der NGF-Gehalt mit einer Halbwertzeit von rund 4 Stunden ab, während er im Innervationsgebiet gewissermassen reziprok ansteigt.

hin, dass die Gegenwart der Nervenendigungen in den peripheren Effektororganen den niedrigen NGF-Gehalt nicht nur durch den sehr effizienten Abtransport bedingt, sondern auch durch eine negative Regulierung der Synthese von NGF. Der Mechanismus dieser Regulation und die zelluläre Lokalisation der NGF-Synthese durch *In-situ*-Hybridisierung sind Gegenstand zurzeit laufender Untersuchungen.

Wie ich eingangs erwähnt habe, war die Entdeckung des NGF durch eine Serie von glücklichen Umständen bedingt, wobei die reiche Quelle von NGF in der Speicheldrüse der männlichen Maus eine besonders wichtige Rolle spielte. Um diesen Glücksfall richtig würdigen zu können, ist es von Interesse, den Gehalt von NGF in dieser reichen Quelle mit dem Gehalt in den physiologisch relevanten Innervationsgebieten zu vergleichen. So befindet sich z. B. in der Speicheldrüse der männlichen Maus pro Gramm Gewebe 1 500 000 ng NGF, während im besonders dicht innervierten Vas deferens der Maus nur etwa 10 ng pro Gramm Gewebe vorhanden sind. Wenn also zur Reinigung von NGF aus der Speicheldrüse ein Reinigungsfaktor von 100 bis 300 notwendig ist, wäre bei der Isolierung von NGF aus dem Vas deferens der Maus ein Reinigungsfaktor von über 10 Millionen notwendig. Es kann vorausgesagt werden, dass mit den bis jetzt zur Verfügung stehenden biochemischen Reinigungsmethoden und der Empfindlichkeit der biologischen Bestimmungsmethoden, die, wie wir später sehen werden, die Grundlage für die Reinigung von neuen neurotrophen Faktoren bilden, der NGF sicher nicht der erste neurotrophe Faktor gewesen wäre, der entdeckt und gereinigt worden wäre. Es ist eher anzunehmen, dass er noch für sehr lange Zeit unentdeckt geblieben wäre.

Vorgehen zur Isolierung neuer neurotropher Faktoren

Den gütigen Launen von Mutter Natur sind Grenzen gesetzt, und die Zeit schien gekommen, die Isolierung und Charakterisierung von neurotrophen Faktoren an die Hand zu nehmen, für deren Produktion in physiologisch relevanten Gebieten Anhaltspunkte bestanden. Es war von Anfang an klar, dass sich diese Reinigung wesentlich schwieriger gestalten würde als die Reinigung von NGF aus der Speicheldrüse der Maus. Solch anspruchsvolle Projekte konnten nur

angegangen werden mit Hilfe der erst in den letzten Jahren erarbeiteten neuen Methoden der Zellbiologie, der Biochemie und auch der molekularen Genetik.
Auch wenn das Endziel immer das Verständnis des integrierten physiologischen Systems ist, so ist es unumgänglich, dieses System in seine einzelnen Bestandteile zu zerlegen, diese zu charakterisieren, um dann die Bedeutung der Einzelbestandteile im Gesamtsystem verstehen zu können. Wie ich eingangs schon erwähnt habe, ist es ein generelles Prinzip, dass Neuronen im peripheren und zentralen Nervensystem in frühen Entwicklungsstadien im Überschuss gebildet werden, um dann in kritischen Phasen der Entwicklung regional unterschiedlich zu degenerieren bzw. zu überleben. Das Konzept unseres Vorgehens, vor allem durch Yves-Alain Barde und David Edgar experimentell etabliert, war das Folgende (siehe 13): Sensorische und sympathische Neuronen verschiedenen embryonalen Alters wurden isoliert, und es wurde dann untersucht, welche spezifischen Moleküle dem Kulturmedium zugeführt werden mussten, um alle oder einen Teil der Neuronen am Leben zu erhalten. Es ging also darum, ein *In-vitro*-System zu schaffen, in dem die Vorgänge *in vivo* möglichst nachvollzogen, aber auch experimentell abgewandelt werden konnten. Das zu entwickelnde Zellkultursystem hatte nicht, wie das bis jetzt üblich war, deskriptiven Zwecken zu dienen, sondern musste quantitativen, analytischen Ansprüchen genügen. Hühnerembryonen erwiesen sich für derartige Untersuchungen als besonders geeignet, weil sie in verschiedenen Entwicklungsstadien leicht verfügbar sind und weil gerade die peripheren Ganglien leicht unter schonenden Bedingungen in die einzelnen Zellen dissoziiert werden können. Es ist wichtig, dass ein möglichst hoher Anteil der in den Ganglien vorhandenen Neuronen in Kultur gebracht wird, damit diese für das Gesamtsystem repräsentativ sind. Im weiteren ist es notwendig, die Neuronen von nichtneuronalen Zellen zu trennen, da man im ersten Analyseschritt daran interessiert ist, die Moleküle zu identifizieren, die direkt auf die Neuronen wirken und nicht indirekt über nichtneuronale Zellen. Auf diese Art und Weise ist es gelungen, für das periphere sympathische und sensorische System ein Kultursystem zu schaffen, in dem Neuronen praktisch ohne nichtneuronale Zellen mit einer fast 100%igen Ausbeute in Kultur gebracht werden können. Ohne Zusatz von spezifischen, neurotrophen Faktoren de-

generieren praktisch alle Neuronen, während bei Zusatz von adäquaten neurotrophen Faktoren praktisch alle Neuronen am Leben erhalten werden können, und zwar über viele Tage und sogar Wochen. Ein solches Gewebekultursystem war die Voraussetzung für die Reinigung eines neuen neurotrophen Faktors durch Yves-Alain Barde [14]. Dieses Molekül wirkt vor allem auf sensorische Neuronen, die nicht auf NGF ansprechen. In neueren Untersuchungen ergaben sich auch Anhaltspunkte für eine Wirkung auf Neuronen des Zentralnervensystems, vor allem auf Ganglienzellen der Retina. Zur Reinigung dieses Proteins (MG ca. 12 300, isoelektrischer Punkt >10) aus Säugerhirn war eine 1,4millionenfache Reinigung notwendig (Reinigungsfaktor für NGF aus der Speicheldrüse der männlichen Maus 100- bis 300fach). Entsprechend dem hohen Reinigungsfaktor sind auch die verfügbaren reinen Mengen dieses Moleküls ausserordentlich gering. Eine Charakterisierung, insbesondere eine partielle Bestimmung der Aminosäuresequenz, wurde nur durch die in den letzten Jahren entwickelte Gasphasen-Sequenzierungsmethode möglich, die wesentlich empfindlicher ist als die vorher verfügbaren Methoden. Gerade die Bestimmung der partiellen Aminosäuresequenz erwies sich im vorliegenden Fall als ausserordentlich wichtig, zumal das gereinigte Molekül ein sehr schlechtes Antigen ist. Die zur Verfügung stehenden Mengen des Moleküls waren bisher zur Produktion von Antikörpern unter Zuhilfenahme verschiedener Immunisierungsmethoden nicht ausreichend, und wir sind darauf angewiesen, Antikörper gegen synthetische Peptide von Teilsequenzen des Moleküls zu produzieren. Wir hoffen dabei, dass diese Antikörper, die gegen Teilsequenzen gebildet werden, auch das gesamte native Molekül erkennen.

Die Produktion von Antikörpern ist eine wesentliche Voraussetzung zur Abklärung der physiologischen Funktion dieses Moleküls *in vivo*, zu dessen quantitativer Bestimmung in den Geweben und möglicherweise auch zur immunhistochemischen Lokalisation des Ortes der Synthese und/oder der Akkumulation. Neben der Voraussetzung zur Produktion von Antikörpern wird die Bestimmung der Aminosäure-Teilsequenz auch die Voraussetzung zu der aus ihr abgeleiteten Synthese von Oligonukleotiden bilden, die je nach experimentellem Vorgehen neben den Antikörpern ein wichtiges Hilfsmittel darstellen werden bei der molekularen Klonierung des Moleküls. Der moleku-

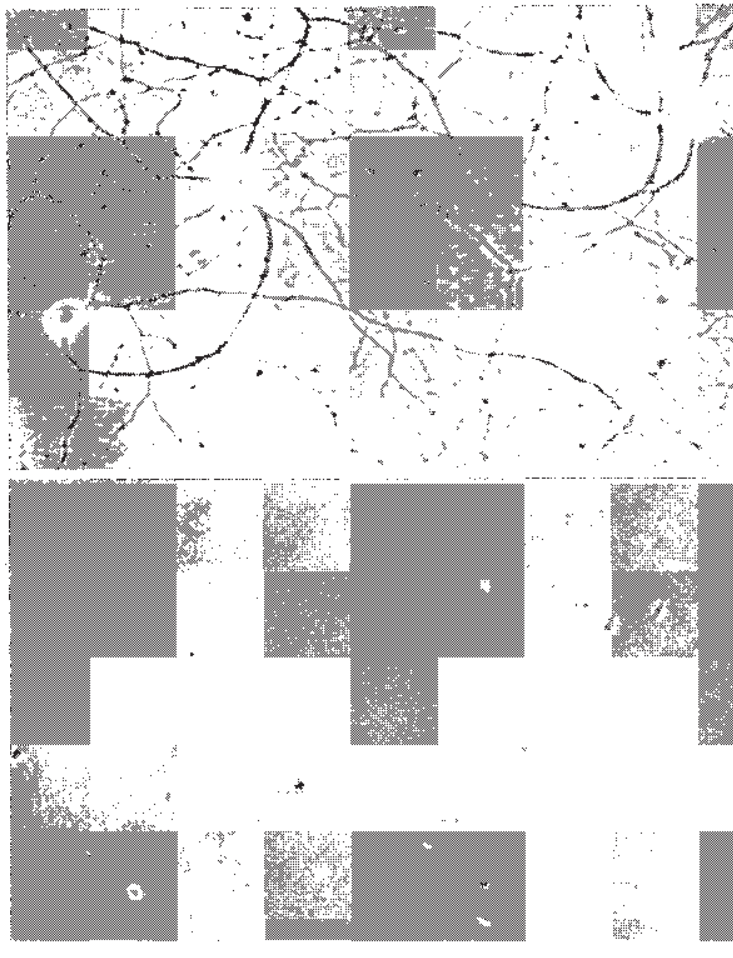


Abb. 5
Wirkung von «Brain-Derived Neurotrophic Factor» (BDNF) auf sensorische Neuronen des Hühnchenembryos in Kultur
A Neuron während 48 Stunden auf Laminin-Substrat und in Gegenwart von supramaximalen Konzentrationen von BDNF kultiviert. Mehr als 90% der Neuronen überleben.
B Gleiche Kulturbedingungen, aber ohne BDNF. Alle Neuronen gehen zugrunde.

laren Klonierung kommt neben der damit möglichen Aufklärung der Primärstruktur, der genetischen Organisation, der Quantifizierung der entsprechenden mRNA und der Identifizierung des Ortes der Synthese durch *In-situ*-Hybridisierung eine zusätzliche Bedeutung zu. Es kann schon jetzt vorausgesagt werden, dass die durch Reinigung verfügbaren Mengen wohl zu Untersuchungen *in vitro* ausreichen werden, nicht aber zu umfassenden Untersuchungen am Ganztier, wie das mit NGF möglich war. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, dieses Molekül, besonders wenn die weiteren Untersuchungen auch noch mögliche therapeutische Anwendungen ergeben sollten, mit biotechnologischen Methoden in genügenden Mengen zu produzieren.

Möglichkeiten und Grenzen der analytischen Zellkultursysteme

Bis jetzt habe ich dargelegt, wie die Kombination von quantitativen Zellkulturmethoden und biochemischen Reinigungsverfahren zur Identifizierung und Charakterisierung neuer neurotropher Moleküle benutzt werden kann. Im folgenden möchte ich Ihnen noch kurz darlegen, wie ein rigoros vereinfachtes analytisches Kultursystem von Neuronen über scheinbare Ungereimtheiten mit der *In-vivo*-Situation zu unerwarteten neuen Einsichten führen kann. Aus den klassischen Untersuchungen mit NGF bzw. seinen Antikörpern *in vivo* wusste man, dass für das periphere sympathische Nervensystem neben NGF kein anderer neurotropher Faktor von wesentlicher physiologischer Bedeutung sein konnte, da durch die Eliminierung von endogenem NGF durch Antikörper praktisch alle sympathischen Neuronen degenerierten [4–6]. Zu unserer grossen Überraschung konnten wir aber in unserem Kultursystem nur maximal 40% aller sympathischen Neuronen mit NGF allein am Leben erhalten. In einzelnen Entwicklungsstadien waren es nur etwa 10%. Wir waren mit der Frage konfrontiert, ob man sich zur resignierenden Feststellung bequemen sollte, dass es sich einfach um einen «Gewebekulturartefakt» handle. Da ich aber der Ansicht bin, dass es überhaupt keine Gewebekulturartefakte gibt, sondern dass man die Resultate erhält, die man durch die definierten Kulturbedingungen geschaffen hat, war zu dieser resignierten Feststellung kein Grund. David Edgar ging dann

der Frage nach, welches die wesentlichen Unterschiede zwischen der *In-vivo*- und der *In-vitro*-Situation sind, und er fand für die ursprüngliche Diskrepanz eine befriedigende Erklärung, die auch noch neue, unerwartete Einsichten vermittelte. Er untersuchte in diesem Zusammenhang zuerst einmal eine Mischung von Molekülen, die der sogenannten extrazellulären Matrix angehören und die in unserem ursprünglichen analytischen System nicht vorhanden waren. Diese Moleküle, die von nichtneuronalen Zellen sezerniert werden und die allein keine neurotrophe Wirkung haben (das heisst selbst in Kultur keine Neuronen am Leben erhalten), korrigieren die Wirkung von NGF in der Richtung der *In-vivo*-Situation [15]. In Gegenwart dieser Mischung von Molekülen überlebten nun auch unter Kulturbedingungen praktisch alle sympathischen Neuronen. Hier ergab sich erneut die Notwendigkeit, das oder die für diese Wirkung verantwortlichen Moleküle aufzureinigen. Diese Reinigung wäre wahrscheinlich etwas einfacher gewesen als die Reinigung eines neurotrophen Faktors, weil die Moleküle der extrazellulären Matrix in grösseren Mengen gebildet werden. Wir nutzten aber die Nähe der Arbeitsgruppe von Rupert Timpl im Max-Planck-Institut für Biochemie, der sich seit Jahren mit der Reinigung und der Abklärung der biologischen Funktion von Molekülen der Basalmembran befasst [16]. Es zeigte sich, dass das für die Modulation des NGF-Effektes verantwortliche Molekül Laminin ist, ein Glykoprotein, das ein konstanter Bestandteil von Basalmembranen ist und das auch von den die peripheren Neuronen umgebenden Schwannzellen gebildet wird. Dank der bereits vorliegenden biochemischen und immunologischen Information über Laminin konnte in kurzer Zeit auch die Domäne des Lamininmoleküls identifiziert werden, die für die Wirkung auf die Neuronen verantwortlich ist [17]. Es war von ganz besonderem Interesse, dass es sich um eine andere Domäne des Laminin-Moleküls handelt als diejenige, die für die Bindung von Muskelzellen, Leber- oder Tumorzellen an die extrazelluläre Matrix verantwortlich ist. Es wird zukünftigen Untersuchungen, die bereits angelaufen sind, überlassen bleiben, den Mechanismus von Laminin über spezifische neuronale Rezeptoren und deren Bedeutung für die Modulation der neurotrophen Faktoren (auch der neu isolierte neurotrophe Faktor aus Säugerhirn [14] wird durch Laminin moduliert) zu analysieren und zu verstehen. Aus der Entdeckung der Funktion von Laminin als Mo-

dulator der Wirkung von neurotrophen Faktoren geht auch hervor, dass ein rigoroses analytisches System, wie es die isolierten Neuronen von peripheren Ganglien, die ohne nichtneuronale Zellen in einem definierten Medium gezüchtet werden, in seiner Aussagekraft limitiert ist, aber auch die Chance zur Entdeckung neuer Mechanismen bietet, nach denen man ursprünglich eigentlich gar nicht suchte.

Konklusionen und Ausblick

Ich habe versucht, Ihnen darzulegen, nach welchen Prinzipien wir ein beschränktes Gebiet der Entwicklungsneurobiologie im Hinblick auf ein molekulares Verständnis bearbeitet haben. Das experimentelle Vorgehen ist dadurch gekennzeichnet, dass für ein limitiertes Ziel ein sehr breites Spektrum von experimentellen Methoden Anwendung findet, das von der Zellbiologie über Immunologie und Proteinchemie zur molekularen Genetik führt. Die erfolgreiche Anwendung eines derartig breiten Spektrums von Methoden ist nur noch im Teamwork möglich. Wir verschaffen uns damit aber Zugang zu einer umfassenderen Problembearbeitung, deren Ziel nicht die Anhäufung von möglichst reichhaltiger Einzelinformation ist, sondern die Erarbeitung vereinfachender, genereller Prinzipien.

LITERATUR ZUM VORTRAG

1 Cowan, W.M., Fawcett, J.W., O'Leary, D.D.M. and Stanfield, B.B. Regressive events in neurogenesis. Science *225*, 1258–1265, 1984.

2 Hamburger, V. and Oppenheim, R.W. Naturally occurring neuronal death in vertebrates. Neuroscience Commentaries *1*, 39–55, 1982.

3 Bueker, E.D. Implantation of tumors in the hind limb of the embryonic chick and developmental response of the lumbosacral nervous system. Anat. Rec. *102*, 369–390, 1948.

4 Levi-Montalcini, R. The nerve growth factor: its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells. Harvey Lect. *60*, 217–259, 1966.

5 Thoenen, H. and Barde, Y.-A. Physiology of nerve growth factor. Physiol. Rev. *60*, 1284–1335, 1980.

6 Schwab, M.E. and Thoenen, H. Retrograde axonal transport. In: Handbook of Neurochemistry (A. Lajtha, ed.) Vol. 5, Plenum Publishing Corporation, New York, 381–404, 1983.

7 Angeletti, R.H. and Bradshaw, R.A. Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *68*, 2417–2420, 1971.

8 Ullrich, A., Gray, A., Berman, C., Coussens, L. and Dull, T.J. Sequence homology of human and mouse β-NGF subunit genes. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. *48*, 435–442, 1983.

9 Scott, J., Selby, M., Urdea, M., Quiroga, M., Bell G.I. and Rutter, W.J. Isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the precursor of mouse nerve growth factor. Nature *302*, 538–540, 1983.

10 Korsching, S. and Thoenen, H.: Nerve growth factor in sympathetic ganglia and corresponding target organs of the rat: Correlation with density of sympathetic innervation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *80*, 3513–3516, 1983.

11 Korsching, S. and Thoenen, H. Treatment with 6-OH-dopamine and colchicine decreases nerve growth factor levels in sympathetic ganglia and increases them in the corresponding target tissues. J. Neurosci. *5*, 1058–1061, 1985.

12 Heumann, R., Korsching, S., Scott, J. and Thoenen, H. Relationship between levels of nerve growth factor (NGF) and its messenger RNA in sympathetic ganglia and peripheral target tissues. EMBO J. *3*, 3183–3189, 1984.

13 Barde, Y.-A., Edgar, D. and Thoenen, H. New neurotrophic factors. Ann. Rev. Physiol. *45*, 601–612, 1983.

14 Barde, Y.-A., Edgar, D. and Thoenen, H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. EMBO J. *1*, 549–553, 1982.

15 Edgar, D. and Thoenen, H. Modulation of NGF-induced survival of chick sympathetic neurons by contact with a conditioned medium factor bound to the culture substrate. Dev. Brain Res. *5*, 89–92, 1982.

16 Timpl, R., Engel, J. and Martin, G.R. Laminin – a multifunctional protein of basement membranes. Trends Biochem. Sci. *8*, 207–209, 1983.

17 Edgar, D., Timpl, R. and Thoenen, H. The heparin binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival. EMBO J. *3*, 1463–1468, 1984.

PUBLIKATIONSLISTE

A. Originalpublikationen

Thoenen, H.: Die morphologische Beeinflussung der Struktur der Schilddrüse, insbesondere der Adenome, durch die Jodprophylaxe des Kropfes. Inaugural-Dissertation, 1957.

Thoenen, H.: Beeinflussung der Xanthoproteinreaktion im Blutserum durch Medikamente. Schweiz. med. Wschr. *88*, 1257, 1959.

Richterich, R., Spring, P. and Thoenen, H.: Klinische Erfahrungen mit Hydrochlorothiazid, einem neuen, oral verabreichbaren Sulfonamiddiuretikum. Schweiz. med. Wschr. *13*, 353–361, 1959.

Hartmann, G. and Thoenen, H.: Zur Pathogenese der essentiellen Hyperlipämie. Schweiz. med. Wschr. *42*, 1102–1105, 1959.

Verzár, F. and Thoenen, H.: Die Wirkung von Elektrolyten auf die thermische Kontraktion von Collagenfäden. Gerontologia *4*, 112–120, 1960.

Thoenen, H., Lacroix, E. and Leusen, I: Lésions gastriques postréserpiniques, rôle du cortex surrénalien. Gastroenterologia *98*, 225–232, 1962.

Leusen, I., Thoenen, H. and Lacroix, E.: L'iproniazide et l'hypersécrétion gastrique postréserpinique. Arch. int. Pharmacodyn. *141*, 190–198, 1963.

Haefely, W., Thoenen, H. and Hürlimann, A.: The effect of intraventricular application of substance P preparations of different purity. Med. exp. *7*, 245–249, 1962.

Haefely, W., Hürlimann, A. and Thoenen, H.: The responses to tyramine of the normal and denervated nictitating membrane of the cat: Analysis of the mechanisms and sites of action. Br. J. Pharmac. Chemother. *21*, 27–38, 1963.

Thoenen, H., Hürlimann, A. and Haefely, W.: The effect of postganglionic sympathetic stimulation on the isolated, perfused spleen of the cat. Helv. physiol. pharmacol. Acta *21*, 17–26, 1963.

Thoenen, H., Hürlimann, A. and Haefely, W.: Removal of infused norepinephrine by the cat's spleen; mechanism of its inhibition by phenoxybenzamine. Experientia *19*, 601–602, 1963.

Hürlimann, A., Haefely, W. and Thoenen, H.: Beeinflussung der pharmakologischen Wirkung und biologischen Inaktivierung von exogen zugeführtem und endogen freigesetztem Noradrenalin durch Kokain. Helv. physiol. pharmacol. Acta *21*, C24–C27, 1963.

Thoenen, H., Hürlimann, A. and Haefely, W.: The effect of sympathetic nerve stimulation on volume, vascular resistance, and norepinephrine output in the isolated perfused spleen of the cat, and its modification by cocaine. J. Pharmacol. Exp. Ther. *143*, 57–63, 1964.

Haefely, W., Hürlimann, A. and Thoenen, H.: A quantitative study of the effect of cocaine on the response of the cat nictitating membrane to nerve stimulation and to injected noradrenaline. Br. J. Pharmac. Chemother. *22*, 5–21, 1964.

Haefely, W., Hürlimann, A. and Thoenen, H.: Scheinbar paradoxe Beeinflussung von peripheren Noradrenalinwirkungen durch einige Thymoleptica. Helv. physiol. pharmacol. Acta *22*, 15–33, 1964.

Thoenen, H., Hürlimann, A. and Haefely, W.: Dual site of action of phenoxybenzamine in the cat's spleen: blockade of – adrenergic receptors and inhibition of re-uptake of neurally released norepinephrine. Experientia *20*, 272–273, 1964.

Thoenen, H., Hürlimann, A. and Haefely, W.: Mode of action of imipramine and 5-(3'-methylaminopropyliden)-dibenzo-[1 a,e]cyclohepta[1,3,5 trien hydrochloride (Ro 4-6011), a new antidepressant drug, on peripheral adrenergic mechanisms. J. Pharacol. Exp. Ther. *144*, 405–414, 1964.

Haefely, W., Hürlimann, A and Thoenen, H.: Interferenz von Gefässeffekten eines Pharmakons mit seinen anderen nichtvasculären pharmakologischen Wirkungen. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmakol. *249*, 267–278, 1964.

Thoenen, H., Hürlimann, A. and Haefely, W.: Wirkungen von Phenoxybenzamin, Phentolamin und Azapetin auf adrenergische Synapsen der Katzenmilz. Blockierung der α-adrenergischen Rezeptoren und Hemmung der Wiederaufnahme von neural freigesetztem Noradrenalin. Helv. physiol. pharmacol. Acta *22*, 148–161, 1964.

Thoenen, H., Hürlimann, A. and Haefely, W.: A technique for repetitive long-term measurement of aortic pressure and cardiac output in the unanaesthetized dog using an implanted catheter. Experientia *21*, 168–169, 1965.

Haefely, W., Thoenen, H. and Hürlimann, A: The effect of sympathetic nerve stimulation in cats pretreated with α-methylmeta-tyrosine. Life Sci. *4*, 913–918, 1965.

Thoenen, H., Hürlimann, A. and Haefely, W.: On the mode of action of chlorpromazine on peripheral adrenergic mechanisms. Int. J. Neuropharmacol. *4*, 79–89, 1965.

Thoenen, H., Haefely, W., Gey, K.F. and Hürlimann, A.: Diminished effects of sympathetic nerve stimulation in cats pretreated with disulfiram; liberation of dopamine as sympathetic transmitter. Life Sci. *4*, 2033–2038, 1965.

Thoenen, H., Hürlimann, A. and Haefely, W.: The effect of angiotensin on the response to postganglionic sympathetic stimulation of the cat spleen; lack of facilitation of norepinephrine liberation. Med. Pharmacol. Exp. *13*, 379–387, 1965.

Haefely, W., Hürlimann, A. and Thoenen, H.: Relation between the rate of stimulation and the quantity of noradrenaline liberated from sympathetic nerve endings in the isolated perfused spleen of the cat. J. Physiol. (Lond.) *181*, 48–58, 1965.

Haefely, W., Hürlimann, A. and Thoenen, H.: The effect of stimulation of sympathetic nerves in the cat treated with reserpine, α-methyl-dopa and α-methylmethatyrosine. Br. J. Pharmac. Chemother. *26*, 172–185, 1966.

Thoenen, H., Hürlimann, A. and Haefely, W.: Interaction of phenoxybenzamine with guanethidine and bretylium at the sympathetic nerve endings of the isolated perfused spleen of the cat. J. Pharmacol. Exp. Ther. *151*, 189–195, 1966.

Thoenen, H., Haefely, W., Gey, K.F. and Hürlimann, A: The effect of α-methyl-tyrosine on peripheral sympathetic transmission. Life Sci. *5*, 723–730, 1966.

Thoenen, H., Hürlimann, A., Gey, F.K. and Haefely, W.: Liberation of p-hydroxy-norephedrine from cat spleen by sympathetic nerve stimulation after pretreatment with amphetamine. Life Sci. *5*, 1715–1722, 1966.

Thoenen, H., Tranzer, J.P., Hürlimann, A. and Haefely, W.: Untersuchungen zur Frage eines cholinergischen Gliedes in der postganglionären sympathischen Transmission. Helv. physiol. pharmacol. Acta *24*, 229–246, 1966.

Haefely, W., Hürlimann, A. and Thoenen, H.: Some pharmacological actions of the β-adrenolytic agent Ro 3-3528 (6,7-dimethyl-α-[(isopropylamino)methyl]-2-benzofuranmethanol hydrochloride). Angiologica *4*, 203–215, 1967.

Tranzer, J.P. and Thoenen, H.: Significance of "empty vesicles" in postganglionic sympathetic nerve terminals. Experientia *23*, 123–124, 1967.

Thoenen, H., Haefely, W., Gey, K.F. and Hürlimann, A.: Quantitative aspects of the replacement of norepinephrine by dopamine as a sympathetic transmitter after inhibition of dopamine-β-hydroxylase by disulfiram. J. Pharmacol. Exp. Ther. *156*, 246–251, 1967.

Thoenen, H., Haefely, W., Gey, K.F. and Hürlimann, A.: Liberation of α-Methyldopamine as a "false" sympathetic transmitter after pretreatment of cats with α-methyldopa and disulfiram. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmakol. *258*, 181–196, 1967.

Tranzer, J.P. and Thoenen, H.: Electronmicroscopic localization of 5-hydroxydopamine (3,4,5-trihydroxy-phenyl-ethylamine), a new "false" sympathetic transmitter. Experientia *23*, 743–745, 1967.

Thoenen, H., Haefely, W. and Staehelin, H.: Potentiation by tetraethylammonium of the response of the cat spleen to postganglionic sympathetic nerve stimulation. J. Pharmacol. Exp. Ther. *157*, 532–540, 1967.

Haefely, W., Hürlimann, A. and Thoenen, H.: Adrenergic transmitter changes and response to sympathetic nerve stimulation after differing pretreatment with α-Methyldopa. Br. J. Pharmac. Chemother. *31*, 105–119, 1967.

Thoenen, H., Hürlimann, A. and Haefely, W.: Mechanism of amphetamine accumulation in the isolated perfused heart of the rat. J. Pharm. Pharmacol. *20*, 1–11, 1968.

Thoenen, H., Haefely, W., Gey, K.F. and Hürlimann, A.: Diminished effect of sympathetic nerve stimulation in cats pretreated with 5-hydroxydopa; formation and liberation of false adrenergic transmitters. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. *259*, 17–33, 1967.

Thoenen, H., Gerold, M., Haefely, W. and Hürlimann, A.: Norepinephrine depleting and antihypertensive effect of 4-methoxy-3,5-dihydroxy-phenylalanine. Experientia *24*, 158–159, 1968.

Tranzer, J.P. and Thoenen, H.: An electron microscopic study of selective, acute degeneration of sympathetic nerve terminals after administration of 6-hydroxydopamine. Experientia *24*, 155–156, 1968.

Tranzer, J.P. and Thoenen, H.: Various types of amine-storing vesicles in peripheral adrenergic nerve terminals. Experientia *24*, 484–485, 1968.

Thoenen, H. and Tranzer, J.P.: Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. *261*, 271–288, 1968.

Häusler, G., Thoenen, H., Haefely, W. and Hürlimann, A.: Electrical events in cardiac adrenergic nerves and noradrenaline release from the heart induced by acetylcholine and KCl. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. *261*, 389–411, 1968.

Thoenen, H., Haefely, W., Häusler, G. and Hürlimann, A.: Formation of a "false" adrenergic transmitter in cats pretreated with 4-methoxy-3,5-dihydroxyphenylalanine and its effects on postganglionic sympathetic transmission. J. Pharmacol. Exp. Ther. *162*, 70–79, 1968.

Snipes, R.L., Thoenen, H. and Tranzer, J.P.: Fine structural localization of exogenous 5-HT in vesicles of adrenergic nerve terminals. Experientia *24*, 1026–1027, 1968.

Mueller, R. A., Thoenen, H. and Axelrod, J.: Adrenal tyrosine hydroxylase: compensatory increase in activity after chemical sympathectomy. Science *158*, 468–469, 1969.

Baumgartner, H. R., Thoenen, H. and Tranzer, J. P.: Accumulation of 5-hydroxydopamine in 5-HT storage organelles of cat platelets and concommitant changes in platelet aggregation. Experientia *25*, 857–859, 1969.

Thoenen, H., Hürlimann, A. and Haefely, W.: Cation dependence of the noradrenaline-releasing action of tyramine. Eur. J. Pharmacol. *6*, 29–37, 1969.

Thoenen, H., Mueller, R. A. and Axelrod, J.: Increased tyrosine hydroxylase activity after drug-induced alteration of sympathetic transmission. Nature *221*, 1264, 1969.

Mueller, R. A., Thoenen, H. and Axelrod, J.: Increase in tyrosine hydroxylase activity after reserpine administration. J. Pharmacol. Exp. Ther. *169*, 74–79, 1969.

Thoenen, H., Mueller, R. A. and Axelrod, J.: Trans-synaptic induction of adrenal tyrosine hydroxylase. J. Pharmacol. Exp. Ther. *169*, 249–254, 1969.

Mueller, R. A., Thoenen, H. and Axelrod, J.: Inhibition of transsynaptically increased tyrosine hydroxylase activity by cycloheximide and actinomycin D. Mol. Pharmacol. *5*, 463–469, 1969.

Häusler, G., Haefely, W. and Thoenen, H.: Chemical sympathectomy of the cat with 6-hydroxydopamine. H. Pharmacol. Exp. Ther. *170*, 50–61, 1969.

Thoenen, H., Mueller, R. A. and Axelrod, J.: Neuronally dependent induction of adrenal phenylethanolamine-N-methyltransferase by 6-hydroxydopamine. J. Biochem. Pharmacol. *19*, 669–673, 1970.

Mueller, R. A., Thoenen, H. and Axelrod, J.: Effect of pituitary and ACTH on the maintenance of basal tyrosine hydroxylase activity in the rat adrenal gland. Endocrinology *86*, 751–755, 1970.

Mueller, R. A., Thoenen, H. and Axelrod, J.: Inhibition of neuronally induced tyrosine hydroxylase by nicotinic receptor blockade. Eur. J. Pharmacol. *10*, 51–56, 1970.

Mueller, R. A., Thoenen, H. and Axelrod, J.: Phase difference in the induction of tyrosine hydroxylase in cell body and nerve terminals of sympathetic neurones. Proc. Nat. Acad. Sci. USA *65*, 58–62, 1970.

Thoenen, H.: Induction of tyrosine hydroxylase in peripheral and central adrenergic neurones by cold-exposure of rats. Nature *228*, 861–862, 1970.

Mueller, R. A. and Thoenen, H.: Cardiac catecholamine synthesis, turnover, and metabolism in isoproterenol-induced myocytolysis. Cardiovasc. Res. *5*, 364–370, 1971.

Nakamura, K., Gerold, M. and Thoenen, H.: Experimental hypertension of the rat: reciprocal changes of norepinephrine turnover in heart and brain-stem. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. *268*, 125–139, 1971.

Saner, A. and Thoenen, H.: Model experiments on the molecular mechanism of action of 6-hydroxydopamine. Mol. Pharmacol. *7*, 147–154, 1971.

Thoenen, H., Kettler, R., Burkard, W. and Saner, A.: Neurally mediated control of enzymes involved in the synthesis of norepinephrine. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. *270*, 146–160, 1971.

Thoenen, H., Angeletti, P., Levi-Montalcini, R. and Kettler, R.: Selective induction of tyrosine hydroxylase and dopamine β-hydroxylase in the rat superior cervical ganglia by nerve growth factor. Proc. Nat. Acad. Sci. USA *68*, 1598–1602, 1971.

Nakamura, K. and Thoenen, H.: Hypothermia induced by intraventricular administration of 6-hydroxydopamine in rats. Eur. J. Pharmacol. *16*, 46–54, 1971.

Nakamura, K., Gerold, M. and Thoenen, H.: Genetically hypertensive rats: Relationship between the development of hypertension and the changes in norepinephrine turnover of peripheral and central adrenergic neurons. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. *271*, 157–169, 1971.

Consolo, S., Garattini, S., Ladinsky, H. and Thoenen, H.: Effect of chemical sympathectomy on the content of acetylcholine, choline and choline acetyltransferase activity in the cat spleen and iris. J. Physiol. *220*, 639–646, 1972.

Thoenen, H., Saner, A., Angeletti, P. U. and Levi-Montalcini, R.: Increased activity of choline acetyltransferase in sympathetic ganglia after prolonged administration of nerve growth factor. Nature New Biol. *236*, 26–27, 1972.

Nakamura, K. and Thoenen, H.: Increased irritability: A permanent behavoir change induced in the rat by intraventricular administration of 6-hydroxydopamine. Psychopharmacologia *24*, 359–372, 1972.

Thoenen, H., Kettler, R. and Saner, A.: Time course of the development of enzymes involved in the synthesis of norepinephrine in the superior cervical ganglion of the rat from birth to adult life. Brain Res. *40*, 459–468, 1972.

Häusler, G., Gerold, M. and Thoenen, H.: Cardiovascular effects of 6-hydroxydopamine injected into a lateral brain ventricle of the rat. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. *274*, 211–228, 1972.

Angeletti, P. U., Levi-Montalcini, R., Kettler, R. and Thoenen, H.: Comparative studies on the effect of the nerve growth factor on sympathetic ganglia and adrenal medulla in newborn rats. Brain Res. *44*, 197–206, 1972.

Thoenen, H., Saner, A., Kettler, R. and Angeletti, P. U.: Nerve growth factor and preganglionic cholinergic nerves: their relative importance to the development of the terminal adrenergic neuron. Brain Res. *44*, 593–602, 1972.

Häusler, G., Finch, L. and Thoenen, H.: Central adrenergic neurones and the initiation and development of experimental hypertension. Experientia *28*, 1200–1203, 1972.

Finch, L., Häusler, G. and Thoenen, H.: A comparison of the effects of chemical sympathectomy by 6-hydroxydopamine in newborn and adult rats. Br. J. Pharmacol. *47*, 249–260, 1973.

Tranzer, J. P. and Thoenen, H.: Selective destruction of adrenergic nerve terminals by chemical analogues of 6-hydroxydopamine. Experientia *29*, 314–315, 1973.

Oesch, F. and Thoenen, H.: Increased activity of the peripheral sympathetic nervous system: Induction of choline acetyltransferase in the preganglionic cholinergic neuron. Nature *242*, 536–537, 1973.

Oesch, F., Otten, U. and Thoenen, H.: Relationship between the rate of axoplasmic transport and subcellular distribution of enzymes involved in the synthesis of norepinephrine. J. Neurochem. *20*, 1691–1706, 1973.

Thoenen, H., Otten, U. and Oesch, F.: Trans-synaptic regulation of tyrosine hydroxylase. In "Frontiers in Catecholamine Research", Pergamon Press, 169–185, 1973.

Thoenen, H., Otten, U. and Oesch, F.: Axoplasmic transport of enzymes involved in the synthesis of norepinephrine: relationship between the rate of transport and subcellular distribution. Brain Res. *62*, 471–475, 1973.

Finch, L., Häusler, G., Kuhn, H. and Thoenen, H.: Rapid recovery of vascular adrenergic nerves in the rat after chemical sympathectomy with 6-hydroxydopamine. Br. J. Pharmacol. *48*, 59–72, 1973.

Sorimachi, M., Oesch, F. and Thoenen, H.: Effects of colchicine and cytochalasin B on the release of ^{3}H-norepinephrine from guinea-pig atria evoked by high potassium, nicotine and tyramine. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *276*, 1–12, 1973.

Hendry, I. A., Stöckel, K., Thoenen, H. and Iversen, L. L.: The retrograde axonal transport of nerve growth factor. Brain Res. *68*, 103–121, 1974.

Otten, U., Oesch, F. and Thoenen, H.: Dissociation between changes in cyclic AMP and subsequent induction of TH in the rat superior cervical ganglion and adrenal medulla. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *280*, 129–140, 1973.

Otten, U., Paravicini, U., Oesch, F. and Thoenen, H.: Time requirement for the single steps of trans-synaptic induction of tyrosine hydroxylase in the peripheral sympathetic nervous system. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *280*, 117–127, 1973.

Hendry, I. A. and Thoenen, H.: Changes of enzyme pattern in the sympathetic nervous system of adult mice after submaxillary gland removal; response to exogenous nerve growth factor. J. Neurochem. *22*, 999–1004, 1974.

Goodman, R., Oesch, F. and Thoenen, H.: Changes in enzyme patterns produced by potassium depolarization and dibutyryl cyclic AMP in organ cultures of sympathetic ganglia. J. Neurochem. *23*, 369–378, 1974.

Stöckel, K., Paravicini, U. and Thoenen, H.: Specificity of the retrograde axonal transport of nerve growth factor. Brain Res. *76*, 413–421, 1974.

Otten, U., Mueller, R. A., Oesch, F. and Thoenen, H.: Location of an isoproterenol-responsive cyclic AMP-pool in adrenergic nerve cell bodies and its relationship to tyrosine hydroxylase induction. Proc. Nat. Acad. Sci. USA *71*, 2217–2221, 1974.

Stöckel, K., Solomon, F., Paravicini, U. and Thoenen, H.: Effect of nerve growth factor on sympathetic ganglia: Dissociation between tyrosine hydroxylase and tubulin synthesis. Nature *250*, 150–151, 1974.

Paravicini, U., Stöckel, K. and Thoenen, H.: Biological importance of retrograde axonal transport of NGF in adrenergic neurons. Brain Res. *84*, 279–291, 1975.

Mueller, R. A., Otten, U. and Thoenen, H.: The role of cyclic adenosine 3,5'-monophosphate in reserpine-mitiated adrenal medullary tyrosine hydroxylase induction. J. Mol. Pharmacol. *10*, 855–860, 1974.

Otten, U., Mueller, R. A. and Thoenen, H.: Evidence against a causal relationship between rate, extent and duration of increase in cAMP and subsequent induction of tyrosine hydroxylase in the rat adrenal medulla. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *285*, 233–242, 1974.

Stöckel, K. and Thoenen, H.: Retrograde axonal transport of nerve growth factor (NGF): Specificity and biological importance. Brain Res. *85*, 337–341, 1975.

Levi-Montalcini, R., Aloe, L., Mugnaini, E., Oesch, F. and Thoenen, H.: NGF induced volume increase and enhances tyrosine hydroxylase synthesis in chemically axotomized sympathetic ganglia of newborn rats. Proc. Nat. Acad. Sci. USA *72*, 595–599, 1975.

Stöckel, K., Schwab, M. and Thoenen, H.: Specificity of retrograde transport of nerve growth factor (NGF) in sensory neurons: a biochemical and morphological study. Brain Res. *89*, 1–14, 1975.

Schwab, M. E. and Thoenen, H.: Early effects of nerve growth factor on adrenergic neurons: An electron microscopic morphometric study of the rat superior cervical ganglion. Cell Tiss. Res. *158*, 543–553, 1975.

Iversen, L. L., Stöckel, K. and Thoenen, H.: Autoradiographic studies of the retrograde axonal transport of nerve growth factor in mouse sympathetic neurons. Brain Res. *88*, 37–43, 1975.

Otten, U., Mueller, R. A. and Thoenen, H.: Effect of hypophysectomy on cAMP changes in rat adrenal medulla evoked by catecholamines and carbamylcholine. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *289*, 157–170, 1975.

Otten, U. and Thoenen, H.: Circadian rhythm of tyrosine hydroxylase induction by short-term cold stress: Modulatory action of glucocorticoids in newborn and adult rats. Proc. Nat. Acad. Sci. USA *72*, 1415–1419, 1975.

Thoenen, H.: Nerve-muscle preparations of the isolated perfused spleen. Methods in Pharmacology *3*, 447–455, 1975.

Goodman, R., Otten, U. and Thoenen, H.: Organ culture of the rat adrenal medulla: a model system for the study of trans-synaptic enzyme induction. J. Neurochem. *25*, 423–427, 1975.

Stöckel, K., Schwab, M. and Thoenen, H.: Comparison between the retrograde axonal transport of nerve growth factor and tetanus toxin in motor, sensory and adrenergic neurons. Brain Res. *99*, 1–16, 1975.

Schwab, M. E. and Thoenen, H.: Electron microscopic evidence for a trans-synaptic migration of tetanus toxin in spinal cord motoneurons: An autoradiographic and morphometric study. Brain Res. *105*, 213–227, 1976.

Stöckel, K., Guroff, G., Schwab, M. and Thoenen, H.: The significance of retrograde axonal transport for the accumulation of systemically administered nerve growth factor (NGF) in the rat superior cervical ganglion. Brain Res. *109*, 271–284, 1976.

Monard, D., Stöckel, K., Goodman, R. and Thoenen, H.: Distinction between nerve growth factor and glial factor. Nature *258*, 444–445, 1975.

Otten, U. and Thoenen, H.: Mechanisms of tyrosine hydroxylase and dopamine β-hydroxylase induction in organ cultures of rat sympathetic ganglia by potassium depolarization and cholinomimetics. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *292*, 153–159, 1976.

Otten, U. and Thoenen, H.: Lack of correlation between changes in cyclic nucleotides and subsequent induction of tyrosine hydroxylase in rat adrenal medulla. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *293*, 105–108, 1976.

Stöckel, K., Gagnon, C., Guroff, G. and Thoenen, H.: Purification of nerve growth factor antibodies by affinity chromatography. J. Neurochem. *26*, 1207–1211, 1976.

Gagnon, C., Otten, U. and Thoenen, H.: Increased synthesis of dopamine β-hydroxylase in cultured rat adrenal medullae after in vivo administration of reserpine. J. Neurochem. *27*, 259–265, 1976.

Otten, U. and Thoenen, H.: Role of membrane depolarization in trans-synaptic induction of tyrosine hydroxylase in organ cultures of sympathetic ganglia. Neuroscience Letters *2*, 93–96, 1976.

Otten, U. and Thoenen, H.: Selective induction of tyrosine hydroxylase and dopamine β-hydroxylase in sympathetic ganglia in organ culture: role of glucocorticoids as modulators. Mol. Pharmacol. *12*, 353–361, 1976.

Schwab, M. E., Stöckel, K. and Thoenen, H.: Immunocytochemical localization of nerve growth factor (NGF) in the submandibular gland of adult mice by light and electron microscopy. Cell Tiss. Res. *169*, 289–299, 1976.

Otten, U. and Thoenen, H.: Modulatory role of glucocorticoids on NGF-mediated enzyme induction in organ cultures of sympathetic ganglia. Brain Res. *111*, 438–441, 1976.

Gagnon, C., Schatz, R., Otten, U. and Thoenen, H.: Synthesis, subcellular distribution and turnover of dopamine β-hydroxylase in organ cultures of sympathetic ganglia and adrenal medullae. J. Neurochem. *27*, 1083–1089, 1976.

Fillenz, M., Gagnon, C., Stöckel, K. and Thoenen, H.: Selective uptake and retrograde axonal transport of dopamine β-hydroxylase antibodies in peripheral adrenergic neurons. Brain Res. *114*, 293–303, 1976.

Schwab, M. and Thoenen, H.: Selective trans-synaptic migration of tetanus toxin after retrograde axonal transport in peripheral sympathetic nerves: a comparison with nerve growth factor. Brain Res. *122*, 459–474, 1977.

Stöckel, K., Schwab, M. and Thoenen, H.: Role of gangliosides in the uptake and retrograde axonal transport of cholera and tetanus toxin as compared to nerve growth factor and wheat germ agglutinin. Brain Res. *132*, 273–285, 1977.

Schwab, M., Agid, Y., Glowinski, J. and Thoenen, H.: Retrograde axonal transport of ^{125}I-tetanus toxin as a tool for tracing fiber connections in the central nervous system: connections of the rostral part of the rat neostriatum. Brain Res. *126*, 211–224, 1977.

Otten, U. and Thoenen, H.: Effect of glucocorticoids on NGF-mediated enzyme induction in organ cultures of rat sympathetic ganglia: enhanced response and reduced time-requirement to initiate enzyme induction. J. Neurochem. *29*, 69–75, 1977.

Otten, U., Schwab, M., Gagnon, C. and Thoenen, H.: Selective induction of tyrosine hydroxylase and dopamine β-hydroxylase by nerve growth factor: comparison between adrenal medulla and sympathetic ganglia of adult and newborn rats. Brain Res. *133*, 291–303, 1977.

Lucas, C. A. and Thoenen, H.: Selective induction by glucocorticoids of tyrosine hydroxylase in organ cultures of rat pheochromocytoma. Neurosciences, *2*, 1095–1101, 1977.

Otten, U., Hatanaka, H. and Thoenen, H.: Role of cyclic nucleotides in NGF-mediated induction of tyrosine hydroxylase in rat sympathetic ganglia and adrenal medulla. Brain Res. *140*, 385–389, 1978.

Goedert, M., Otten, U. and Thoenen, H.: Biochemical effects of antibodies against nerve growth factor on developing and differentiated sympathetic ganglia. Brain Res., *148*, 264–268, 1978.

Suda, K., Barde, Y. A. and Thoenen, H.: Nerve growth factor in mouse and rat serum: Correlation between bioassay and radio-immunoassay determinations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *75*, *8*, 4042–4046, 1978.

Unsicker, K., Krisch, B., Otten, U. and Thoenen, H.: Nerve growth factor induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *75*, 3498–3502, 1978.

Goedert, M., Otten, U. and Thoenen, H.: Biochemical effects of nerve growth factor and its antibody on the vas deferens and the adrenal medulla. Neurosci. Lett. *8*, 71–76, 1978.

Schwab, M. E. and Thoenen, H.: Selective binding, uptake and retrograde transport of tetanus toxin by nerve terminals in the rat iris. An electron microscopic study using colloidal gold as a tracer. J. Cell Biol., *77*, 1–13, 1978.

Edgar, D. H. and Thoenen, H.: Selective enzyme induction in a nerve growth factor-responsive pheochromocytoma cell line (PC12). Brain Res. *154*, 186–190, 1978.

Stöckel, K., Dumas, M. and Thoenen, H.: Uptake and subsequent retrograde axonal transport of nerve growth factor (NGF) are not influenced by neuronal activity. Neurosci. Lett. *10*, 61–64, 1978.

Max, R. S., Rohrer, H., Otten, U. and Thoenen, H.: Nerve growth factor-mediated induction of tyrosine hydroxylase in rat superior cervical ganglia *in vitro*. J. Biol. Chem. *253*, *22*, 8013–8015, 1978.

Schwab, M. E., Dumas, M. and Thoenen, H.: Retrograde axonal and trans-synaptic transport of macromolecules. Proc. Eur. Soc. Neurochem., V. Neuhoff (Ed.) Verlag Chemie, Weinheim, New York, *1*, 476–477, 1978.

Hatanaka, H., Otten, U. and Thoenen, H.: Nerve growth factor-mediated selective induction of ornithine decarboxylase in rat pheochromocytoma: a cyclic AMP-independent process. FEBS Lett. *92*, *2*, 313–316, 1978.

Barde, Y. A., Lindsay, R. M., Monard, D. and Thoenen, H.: New factor released by cultured glioma cells supporting survival and growth of sensory neurones. Nature, *274*, *5673*, 818, 1978.

Rohrer, H., Otten, U. and Thoenen, H.: On the role of RNA synthesis in the selective induction of tyrosine hydroxylase by nerve growth factor. Brain Res. *159*, 436–439, 1978.

Thoenen, H. and Schwab, M.: Physiological and pathophysiological implications of the retrograde axonal transport of macro-molecules. Advances in Pharmacology and Therapeutics, Vol. 5: Neuropsychopharmacology, Pergamon Press, Oxford and New York, 37–59, 1978.

Max, S. R., Schwab, M. E., Dumas, M. and Thoenen, H.: Retrograde axonal transport of nerve growth factor in the ciliary ganglion of the chick and the rat. Brain Res. *159*, 411–415, 1978.

Dumas, M., Schwab, M. E. and Thoenen, H.: Retrograde axonal transport of specific macromolecules as a tool for characterizing nerve terminal membranes. J. Neurobiology, *10*, *2*, 179–197, 1979.

Dumas, M., Schwab, M. E., Baumann, R. and Thoenen, H.: Retrograde transport of tetanus toxin through a chain of two neurons. Brain Res. *165*, 354–357, 1979.

Schwab, M. E., Otten, U., Agid, Y. and Thoenen, H.: Nerve growth factor (NGF) in the rat CNS: Absence of specific retrograde axonal transport and tyrosine hydroxylase induction in locus coeruleus and substantia nigra. Brain Res. *168*, 473–483, 1979.

Edgar, D., Barde, Y.A. and Thoenen, H.: Induction of fibre outgrowth and choline acetyltransferase in PC12 pheochromocytoma cells by conditioned media from glial cells and organ extracts. Exp. Cell Res., *121*, 353–361, 1979.

Herrup, K. and Thoenen, H.: Properties of the nerve growth factor receptor of a clonal line of rat pheochromocytoma (PC12) cells. Exp. Cell Res., *121*, 71–78, 1979.

Lucas, C.A., Edgar, D. and Thoenen, H.: Regulation of tyrosine hydroxylase and choline acetyltransferase activities by cell density in the PC12 rat pheochromocytoma clonal cell line. Exp. Cell Res., *121*, 79–86, 1979.

Schwab, M.E., Suda, K. and Thoenen, H.: Selective retrograde transsynaptic transfer of a protein, tetanus toxin, subsequent to its retrograde axonal transport. J. Cell Biol. *82*, 798–810, 1979.

Bönisch, H., Otten, U. and Thoenen, H.: The role of sodium influx mediated by nicotinic receptors as an initial event in trans-synaptic induction of tyrosine hydroxylase in adrenergic neurons. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., *313*, 199–203, 1980.

Harper, G.P. and Thoenen, H: Nerve Growth Factor: Biological significance, measurement and distribution. J. Neurochem., *34*, 5–16, 1980.

Harper, G.P. and Thoenen, H.: The distribution of Nerve Growth Factor in the male sex organs of mammals. J. Neurochem., *34*, 893–903, 1980.

Barde, Y.A., Edgar, D. and Thoenen, H.: Sensory neurons in culture: changing requirements for survival factors during embryonic development. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, *77*, 1199–1203, 1980.

Goedert, M., Otten, U., Schäfer, Th., Schwab, M.E. and Thoenen, H.: Immunosympathectomy: lack of evidence for a complement-mediated cytotoxic mechanism. Brain Res., *201*, 399–409, 1980.

Edgar, D., Barde, Y.-A. and Thoenen, H.: Subpopulations of cultured chick sympathetic neurones differ in their requirements for survival factors. Nature *289*, 294–295, 1981.

Eckenstein, F., Barde, Y.-A. and Thoenen, H.: Production of specific antibodies to choline acetyltransferase purified from pig brain. Neuroscience *6*, 993–1000, 1981.

Heumann, R., Schwab, M.E. and Thoenen, H.: A second messenger required for nerve growth factor biological activity? Nature *292*, 838-840, 1981.

Schwab, M.E., Heumann, R. and Thoenen, H.: Communication between target organs and nerve cells: retrograde axonal transport and site of action of nerve growth factor (NGF). Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. 46, 125–134, 1982.

Harper, G.P., Glanville, R.W. and Thoenen, H.: The purification of Nerve Growth Factor from bovine seminal plasma: biochemical characterization and partial amino-acid sequence. J. Biol. Chem., *257*, 8541–8548, 1982.

Naujoks, K.W., Korsching, S., Rohrer, H. and Thoenen, H.: Nerve growth factor-mediated induction of tyrosine hydroxylase and of neurite outgrowth in culture of bovine adrenal chromaffin cells: dependence on developmental stage. Dev. Biol., *92*, 365–379, 1982.

Rohrer, H., Schäfer, T., Korsching, S. and Thoenen, H.: Internalization of nerve growth factor by pheochromocytoma PC12 cells: absence of transfer to the nucleus. J. Neuroscience, *2*, 687–697, 1982.

Turner, J.E., Schwab, M.E. and Thoenen, H.: Nerve growth factor stimulates neurite outgrowth from goldfish retinal explants: the influence of a prior lesion. Dev. Brain Res., *4*, 59–66, 1982.

Turner, J.E., Barde, Y.-A., Schwab, M.E. and Thoenen, H.: Extract from brain stimulates neurite outgrowth from fetal rat retinal explants. Dev. Brain Res., *6*, 77–83, 1983.

Wakade, A.R., Edgar D. and Thoenen, H.: Substrate requirement and media supplements necessary for the long-term survival of chick sympathetic and sensory neurons cultured without serum. Exp. Cell Res., *140*, 71–78, 1982.

Wakade, A.R., Edgar, D. and Thoenen, H.: Proliferation of cultured glial cells from embryonic chick sympathetic ganglia: inhibition by horse serum. Exp. Cell Res., *140*, 79–84, 1982.

Barde, Y.-A., Edgar, D. and Thoenen, H.: Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. EMBO J., *1*, 549–553, 1982.

Edgar, D. and Thoenen, H.: Modulation of NGF-induced survival of chick sympathetic neurons by contact with a conditioned medium factor bound to the culture substrate. Dev. Brain Res., *5*, 89–92, 1982.

Eckenstein, F. and Thoenen, H.: Production of specific antisera and monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: characterization and use for identification of cholinergic neurons. EMBO J., *1*, 363–368, 1982.

Hefti, F., Gnahn, H., Schwab, M.E. and Thoenen, H.: Induction of tyrosine hydroxylase by Nerve Growth Factor and by elevated K^+ concentrations in cultures of dissociated sympathetic neurons. J. Neurosci., *3*, 1554–1556, 1982.

Harper, G.P., Barde, Y.-A., Edgar, D., Ganten, D., Hefti, F., Heumann, R., Naujoks, K.W., Rohrer, H., Turner, J.E. and Thoenen, H.: Biological and immunological properties of the Nerve Growth Factor from bovine seminal plasma: comparison with the properties of mouse Nerve Growth Factor. Neuroscience *8*, 375–387, 1983.

Schäfer, T., Schwab, M.E. and Thoenen, H.: Increased formation of preganglionic synapses and axons due to a retrograde transsynaptic action of Nerve Growth Factor in the rat sympathetic nervous system. J. Neurosci., *3*, 1501–1510, 1983.

Heumann, R., Kachel, V. and Thoenen, H.: Relationship between NGF-mediated volume increase and "priming effect" in fast and slow reacting clones of PC12 pheochromocytoma cells: role of cAMP. Exp. Cell Res., *145*, 179–190, 1983.

Wakade, A.R., Edgar, D. and Thoenen, H.: Both Nerve Growth Factor and high K^+ concentrations support the survival of chick embryo sympathetic neurons. Exp. Cell Res., *144*, 377–384, 1983.

Schwab, M.E. and Thoenen, H.: Mechanism of uptake and retrograde axonal transport of noradrenaline in sympathetic neurons in culture. J. Cell Biol., *96*, 1538–1547, 1983.

Guahn, H., Hefti, F., Heumann, R., Schwab, M.E. and Thoenen, H.: NGF-mediated increase of choline acetyltransferase (ChAT) in the neonatal rat forebrain; evidence for a physiological role of NGF in the brain? Dev. Brain Res., *9*, 45–52, 1983.

Rohrer, H., Thoenen, H. and Edgar, D.: Presence of Nerve Growth Factor receptors and catecholamine uptake in subpopulations of chick sympathetic neurons: correlation with survival factor requirements in culture. Dev. Biol., *99*, 34–40, 1983.

Hayashi, M., Edgar, D. and Thoenen, H.: The development of substance P, somatostatin and vasoactive intestinal polypeptide in sympathetic and spinal sensory ganglia of the chick embryo. Neuroscience, *10*, 31–39, 1983.

Sofroniew, M.V., Eckenstein, F., Thoenen, H. and Cuello, A.C.: Topography of choline acetyltransferase–containing neurons in the forebrain of the rat. Neurosci. Lett., *33*, 7–12, 1982.

Eckenstein, F. and Thoenen, H.: Cholinergic neurons in the rat cerebral cortex demonstrated by immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. Neurosci. Lett., *36*, 211–215, 1983.

Korsching, S. and Thoenen, H.: Nerve growth factor in sympathetic ganglia and corresponding target organs of the rat: Correlation with density of sympathetic innervation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *80*, 3513–3516, 1983.

Korsching, S. and Thoenen, H.: Quantitative demonstration of the retrograde axonal transport of endogenous nerve growth factor. Neurosci. Lett., *39*, 1–4, 1983.

Acheson, A.L. and Thoenen, H.: Cell contact-mediated regulation of tyrosine hydroxylase synthesis in cultured bovine adrenal chromaffin cells. J. Cell Biol., *97*, 925–928, 1983.

Thoenen, H., Korsching, S., Barde, Y.-A. and Edgar, D.: Quantitation and purification of neurotrophic molecules. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. 48, 679–684, 1983.

Wakade, A.R. and Thoenen, H.: Interchangeability of nerve growth factor and high potassium in the long-term survival of chick sympathetic neurons in serum-free culture medium. Neurosci. Lett., *45*, 71–74, 1984.

Heumann, R., Schwab, M., Merkl, R. and Thoenen, H.: Nerve Growth Factor (NGF) mediated induction of choline acetyltransferase (ChAT) in PC12 cells: evaluation of the site of action of NGF and the involvement of lysosomal degradation products of NGF. J. Neurosci., *4*, 3039–3050, 1984.

Acheson, A.L., Naujoks, K. and Thoenen, H.: Nerve Growth Factor-mediated enzyme induction in primary cultures of bovine adrenal chromaffin cells: specificity and level of regulation. J. Neurosci., *4*, 1771–1780, 1984.

Barth, E.-M., Korsching, S. and Thoenen, H.: Regulation of Nerve Growth Factor synthesis and release in organ cultures of rat iris. J. Cell Biol., *99*, 839–843, 1984.

Edgar, D., Timpl, R. and Thoenen, H.: The heparin binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival. EMBO J., *3*, 1463–1468, 1984.

Korsching, S. and Thoenen, H.: Treatment with 6-OH-dopamine and colchicine decreases nerve growth factor levels in sympathetic ganglia and increases them in the corresponding target tissues. J. Neurosci., *5*, 1058–1061, 1985.

Heumann, R., Korsching, S., Scott, J. and Thoenen, H.: Relationship between levels of Nerve Growth Factor (NGF) and its messenger RNA in sympathetic ganglia and peripheral target tissues. EMBO J., *3*, 3183–3189, 1984.

Korsching, S. and Thoenen, H.: Nerve Growth Factor supply for spinal sensory neurons: site of origin and competition with the sympathetic nervous system. Neurosci. Lett., *54*, 201–205, 1985.

Hayashi, M., Edgar, D. and Thoenen, H.: Nerve Growth Factor changes the relative levels of neuro-peptides in developing sensory and sympathetic ganglia of the chick embryo. Dev. Biol., *108*, 49–55, 1985.

Csillik, B., Schwab, M.E. and Thoenen, H.: Transganglionic regulation of central terminals of dorsal root ganglion cells by Nerve Growth Factor (NGF). Brain Res., *331*, 11–15, 1985.

Korsching, S., Auburger, G., Heumann, R., Scott, J. and Thoenen, H.: Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation. EMBO J., *4*, 1389–1393, 1985.

Rohrer, H., Henke-Fahle, S., El-Sharkawy, T., Lux, H.D. and Thoenen, H.: Progenitor cells from embryonic chick dorsal root ganglia differentiate *in vitro* to neurons: biochemical and electrophysiological evidence. EMBO J., in press, 1985.

Lindsay, R.M., Thoenen, H. and Barde, Y.-A.: Placode and neural crest-derived sensory neurons are responsive at early developmental stages to brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Dev. Biol., in press, 1985.

Schwab, M.E. and Thoenen, H.: Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurothrophic factors. J. Neurosci., in press, 1985.

Thoenen, H., Korsching, S., Heumann, R. and Acheson, A: Nerve Growth Factor. Ciba Foundation Symposium on Growth Factors in Biology and Medicine. London, in press, 1985.

Korsching, S. and Thoenen, H.: Two-site immunoassay for nerve growth factor. Meth. Enzymol., in press, 1985.

Hürlimann, A., Haefely, W. and Thoenen, H.: Methods of evaluating antidepressant drugs. In "Methods in Drug Evaluation", North-Holland Publ. Comp., Amsterdam, 238–250, 1966.

Haefely, W., Hürlimann, A. and Thoenen, H.: The effect of bradykinin and angiotensin on ganglionic transmission. In "Hypotensive Polypeptides", Springer-Verlag, New York, 314–328, 1966.

Thoenen, H.: Bildung und funktionelle Bedeutung adrenerger Ersatztransmitter. Experimentelle Medizin, Pathologie und Klinik, Band *27*, Springer-Verlag, Berlin, 1969.

Tranzer, J.P., Thoenen, H., Snipes, R.L. and Richards, J.G.: Recent developments on ultrastructural aspects of adrenergic nerve endings in various experimental conditions. Progr. Brain Res. *31*, 33–46, 1969.

Thoenen, H., Tranzer, J.P. and Häusler, G.: Chemical sympathectomy with 6-hydroxydopamine. In "New Aspects of Storage and Release Mechanisms of Catecholamines", Springer-Verlag, Bayer-Symposium *II*, 130–142, 1970.

Axelrod, J., Mueller, R.A. and Thoenen, H.: Neuronal and hormonal control of tyrosine hydroxylase and phenetholamine-N-methyltransferase activity. In "New Aspects of Storage and Release Mechanisms of Catecholamines", Springer-Verlag, Bayer-Symposium *II*, 212–219, 1970.

Thoenen, H.: Biochemical alterations induced by 6-hydroxydopamine in peripheral adrenergic neurons. In "6-Hydroxydopamine and Catecholamine Neurons", T. Malmfors and H. Thoenen (Eds.), North-Holland Publ. Corp. 75–85, 1971.

Bartholini, G., Thoenen, H. and Pletscher, A.: Biochemical effects of 6-hydroxydopamine in brain without detectable ultrastructural changes. In "6-Hydroxydopamine and Catecholamine Neurons", T. Malmfors and H. Thoenen (Eds.), North-Holland Publ. Corp., 163–170, 1971.

Saner, A. and Thoenen, H.: Contributions to the molecular mechanism of action of 6-hydroxydopamine. In "6-Hydroxydopamine and Catecholamine Neurons", Eds. T. Malmfors and H. Thoenen, North-Holland Publ. Corp., 265–275, 1971.

Thoenen, H.: Chemical sympathectomy: a new tool in the investigation of the physiology and pharmacology of peripheral and central adrenergic neurons. In "Perspectives in Neuropharmacology", Oxford Academic Press, 301–338, 1972.

Thoenen, H. and Tranzer, J.P.: Functional importance of subcellular distribution of false adrenergic transmitters. Progr. Brain Res. *34*, 235–236, 1971.

Thoenen, H.: Surgical, immunological and chemical sympathectomy. Their application in the investigation of the physiology and pharmacology of the sympathetic nervous system. Handbuch der exp. Pharmakol. *33*, 813–844, 1972.

Nakamura, K., Gerold, M. and Thoenen, H.: Doc-salt and spontaneously hypertensive rats: comparative studies on norepinephrine turnover in central and peripheral adrenergic neurons. In "Spontaneous Hypertension – Its Pathogenesis and Complications", Igaku Shoin, Ltd., Tokyo, 51–58, 1972.

Thoenen, H.: Comparison between the effect of neuronal activity and nerve growth factor on the enzymes involved in the synthesis of norepinephrine. Pharmacol. Rev. *24*, 255–267, 1972.

Thoenen, H.: Neuronally mediated enzyme induction in adrenergic neurons and adrenal chromaffin cells. Biochem. Soc. Symp. *36*, 3–15, 1972.

Thoenen, H. and Oesch, F.: New enzyme synthesis as a long-term adaptation to increased transmitter utilization. In "New Concepts in Neurotransmitter Regulation", Plenum Press, 33–52, 1973.

Thoenen, H. and Tranzer, J.P.: The pharmacology of 6-hydroxydopamine. Ann. Rev. Pharmacol. *13*, 169–180, 1973.

Thoenen, H., Hendry, I.A., Stöckel, K., Paravicini, U. and Oesch, F.: Regulation of enzyme synthesis by neuronal activity and by nerve growth factor. In "Dynamics of Degeneration and Growth in Neurons", Pergamon Press, Oxford, New York, 315–328, 1974.

Thoenen, H.: Mini Review: Trans-synaptic enzyme induction. Life Sci. *14*, 223–235, 1974.

Thoenen, H.: Trans-synaptic regulation of neuronal enzyme synthesis. Handbook of Psychopharmacology *3*, 443–475, 1975.

Oesch, F., Otten, U., Mueller, R.A., Goodman, R. and Thoenen, H.: Trans-synaptic regulation of enzyme synthesis. Golgi Centennial Symposium Proceedings, Raven Press, 503–513, 1975.

Thoenen, H.: Trans-synaptic regulation of the synthesis of specific neuronal proteins. J. Neural Transmission Suppl. *2*, 127–136, 1975.

Thoenen, H.: Trans-synaptic enzyme induction. Adv. in Neurology, *9*, 67–71, 1975.

Thoenen, H., Otten, U., and Stöckel, K.: Ortho- and retrograde trophic effects on adrenergic neurons: regulation of enzyme synthesis by the activity of preganglionic fibers and retrograde axonal transport of nerve growth factor. In "Metabolic Compartmentalization and Neurotransmission", Plenum Press, 229–245, 1975.

Thoenen, H. and Otten, U.: Cyclic nucleotides and trans-synaptic enzyme induction: Lack of correlation between initial cAMP increase, changes in cAMP/cGMP ratio and subsequent induction of tyrosine hydroxylase in the adrenal medulla. In "Chemical Tools in Catecholamine Research", O. Almgren, A. Carlsson and J. Engel (Eds.), North-Holland Publ. Corp. Vol. *II*, 275–282, 1975.

Stöckel, K. and Thoenen, H.: Specificity and biological importance of retrograde axonal transport of nerve growth factor. Proc. of the 6th Intern. Congr. of Pharmacology, J. Tuomisto and M.K. Paasonen (Eds.). Vol. *2*, 285–296, 1975.

Gagnon, C., Otten, U. and Thoenen, H.: Dopamine β-hydroxylase in organ culture of rat adrenal medulla: synthesis, storage, release and trans-synaptic induction. In "Catecholamines and Stress", E. Usdin, R. Kvetnansky and I.J. Kopin (Eds.). Pergamon Press, Oxford, New York, 305–312, 1975.

Thoenen, H. and Otten, U.: Molecular events in trans-synaptic regulation of the synthesis of macromolecules. In "Essays in Neurochemistry and Neuropharmacology", Vol. *1*, Wiley & Sons, Ltd., 73–101, 1976.

Thoenen, H., Schwab, M. and Otten, U.: Nerve growth factor as a mediator of information between effector organs and innervating neurons. In "Molecular Control of Proliferation and Differentiation", J. Papaconstántinou and W.J. Rutter (Eds.). Academic Press, New York, San Francisco, London, 101–118, 1978.

Thoenen, H. and Otten, U.: Trans-synaptic enzyme induction: ionic requirements and modulatory role of glucocorticoids. In "Structure and Function of Monoamine Enzymes", Marcel Decker Inc., 439–464, 1977.

Thoenen, H. and Otten, U.: Role of adrenocortical hormones in the modulation of synthesis and degradation of enzymes involved in the formation of catecholamines. In "Frontiers in Neuroendocrinology", W.F. Ganong and L. Martini (Eds.). Vol. *5*, Raven Press, New York, 163–184, 1978.

Otten, U., Goedert, M. and Thoenen, H.: Role of nerve growth factor for development and maintenance of function of sympathetic neurons and adrenal medullary cells. In "Maturation of Neurotransmission", A. Vernadakis, E. Giacobini, G. Filogamo (Eds.), Karger-Verlag, Basel, 76–82, 1978.

Thoenen, H.: Remarks on Neurobiology. In "Dimensions in Health Research", Academic Press, New York, 151–157, 1978.

Otten, U., Hatanaka, H. and Thoenen, H.: Effect of nerve growth factor on general growth and differentiation of sympathetic neurons: induction of ornithine decarboxylase and tyrosine hydroxylase as respective examples. 4th Int. Catecholamine Symp. Asilomar, Pergamon Press, Oxford, New York, 115–117, 1978.

Thoenen, H., Otten, U. and Schwab, M. E.: Orthograde and retrograde signals for the regulation of neuronal gene expressions: The peripheral sympathetic nervous system as a model. In "The Neurosciences, Fourth Study Program", MIT-Press, Cambridge, Mass., 911–928, 1979.

Thoenen, H., Barde, Y.A., Edgar, D., Hatanaka, H., Otten, U. and Schwab, M.E.: Mechanism of action and possible sites of synthesis of Nerve Growth Factor. In "Development and Chemical Specificity of Neurons, Progress in Brain Research", M. Cuénod, G.W. Kreutzberg, and F.E. Bloom (Eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, Vol. 51, 95–107, 1979.

Thoenen, H. and Schwab, M.E.: Retrograde Axonal Transport of Specific Macromolecules. TIPS *1*, 74–76, 1979.

Thoenen, H. and Barde, Y.A.: Physiology of Nerve Growth Factor. Physiol. Rev. *60*, 1284–1335, 1980.

Edgar, D., Barde, Y.A. and Thoenen, H.: PC12 pheochromocytoma cells as tools for the characterization of neuronal survival factors in conditioned media from glial cells and in neuronal organ extracts. In "Tissue Culture in Neurobiology", E. Giacobini, A. Vernadakis, A. Shahar (Eds.), Raven Press, New York, 303–311, 1980.

Harper, G.P. and Thoenen, H.: Target cells, biological effects and mechanism of action of Nerve Growth Factor and its antibodies. Ann. Rev. Pharm. & Toxicol., *21*, 205–229, 1981.

Thoenen, H., Barde, Y.-A. and Edgar, D.: The role of Nerve Growth Factor (NGF) and related factors for the survival of peripheral neurons. Adv. Biochem. Psychopharmacol., *28*, 263–273, 1981.

Thoenen, H., Schäfer, Th., Heumann, R. and Schwab, M.: Nerve Growth Factor as a retrograde macromolecular messenger between effector cells and innervating neurons. In "Hormones and Cell Regulation", Vol. 5, J.E. Dumont and J. Nunez (Eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 15–34, 1981.

Thoenen, H. and Kreutzberg, G.W.: The role of fast transport in the nervous system. Neurosciences Res. Progr. Bull. Vol. 20, MIT Press, Cambridge, Mass., 1–138, 1981.

Rohrer, H., Barde, Y.A., Edgar, D. and Thoenen, H.: Nerve growth factor receptor on sensory and sympathetic neurons in culture. In "Neuroreceptors", F. Hucho (Ed.), Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York, 65–75, 1982.

Barde, Y.-A., Edgar, D. and Thoenen, H.: New neurotrophic factors. Ann. Rev. Physiol. *45*, 601–612, 1983.

Thoenen, H.: Macromolecular factors involved in the regulation of the survival and differentiation of neurons during development. In "Organizing Principles of Neural Development", NATO ASI Series A: Life Sciences, S.C. Sharma (Ed.), Vol. 78, Plenum Press, New York, 109–127, 1984.

Thoenen, H. and Edgar, D.: The regulation of neuronal gene expression. TINS, *5*, 311–313, 1982.

Thoenen, H., Barde, Y.-A. and Edgar, D.: Factors involved in the regulation of the survival and differentiation of neurons. In "Repair and Regeneration of the Nervous System", J.G. Nicholls (Ed.), Vol. 24, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 173–185, 1982.

Thoenen, H.: Strategies for application of molecular genetics to neurobiology. In "Molecular Genetic Neuroscience". F.O. Schmitt, S.J. Bird and F.E. Bloom (Eds.), Raven Press, New York, 459–466, 1982.

Schwab, M.E. and Thoenen, H.: Retrograde axonal transport. In "Handbook of Neurochemistry". A. Lajtha (Ed.), Vol. 5, Plenum Publishing Corporation, New York, 381–404, 1983.

Barde, Y.-A., Edgar, D. and Thoenen, H.: Molecules involved in the regulation of neuron survival during development. In "Neuroscience approached through Cell Culture". S. Pfeiffer (Ed.), Vol. 1, CRC Press Inc., Boca Raton, 69–86, 1982.

Thoenen, H., Schwab, M. and Heumann, R.: Communication between target organs and nerve cells: retrograde axonal transport, site and mechanism of action of nerve growth factor (NGF). In "Ramón y Cajal's Contribution to the Neurosciences". S. Grisolia, C. Guerri, F. Samson, S. Norton and F. Reinoso-Suárez (Eds.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 101–107, 1983.

Thoenen, H., Barde, Y.-A. and Edgar, D.: Macromolecular factors involved in the regulation of the survival and differentiation of peripheral sensory and sympathetic neurons. In "Cellular and Molecular Biology of Neuronal Development", I. Black (Ed.), Plenum Press, New York, 243–250, 1983.

Harper, G.P. and Thoenen, H.: Biochemical, biological and immunological characterization of bovine nerve growth factor. In "Chemistry of Peptides and Proteins", W. Voelter, E. Bayer, Y.A. Ovchinnikov and Wünsch, E. (Eds.), Vol. 2, Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York, 171–177, 1984.

Schwab, M.E. and Thoenen, H.: Factors influencing axonal growth; central vs. peripheral nerve explants as substrates *in vitro*. Proc. of International Symposium on "Recovery from neural trauma", Israel, June 10–15, 1984, in press.

Barde, Y.-A. and Thoenen, H.: Purification of a neurotrophic protein from mammalian brain. In "The Role of Cell Interactions in Early Neurogenesis", NATO ASI Series A: Life Sciences, A.-M. Duprat, A.C. Kato and M. Weber (Eds.), Vol. 77, Plenum Press New York, London, 263–269, 1984.

Barde, Y.-A. and Thoenen, H.: Neurotrophic Factors. In "Hormones and Cell Regulation", J.E. Dumont, B. Hamprecht and J. Nunez (Eds.), Vol. 9, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 385–390, 1985.

Barde, Y.-A., Lindsay, R.M., and Thoenen, H.: Biological properties of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Colloquium Mosbach, in press, 1985.

ÉLOGE
DU DOCTEUR ROBERTO MONTESANO

Professeur Lelio Orci

C'est à la fois un grand privilège et une responsabilité toute particulière d'avoir à présenter son propre élève qui reçoit un prix. Privilège, puisque l'honneur fait à l'élève rejaillit inévitablement sur le laboratoire d'accueil; responsabilité, puisque toute contribution scientifique importante est l'aboutissement d'une série de choix successifs et irréversibles: les choix opérés étaient-ils les meilleurs de tous? Aujourd'hui, il me semble qu'on peut répondre par l'affirmative et j'abandonnerai pour la suite de ce discours de telles préoccupations.

Roberto Montesano est né à Guidizzolo, province de Mantoue, en 1947. Il a accompli ses études de médecine à Bologne et à Parme et obtint son doctorat en médecine en 1972. En guise d'introduction au curriculum du lauréat, j'aimerais vous faire vivre le premier contact du Dr Montesano avec Genève. Au mois de novembre 1973, celui-ci était envoyé dans notre laboratoire pour un stage de 3 jours afin d'apprendre la technique du cryodécapage ou freeze-etching. Roberto Montesano fut séduit par l'environnement de l'Université de Genève. Je me suis senti très sensible à la frustration ressentie par un jeune chercheur plein d'enthousiasme, mais privé de moyens, et je lui proposai une place d'assistant; le lendemain de son départ, le Dr Montesano me téléphonait qu'il avait démissionné de son poste en Italie et qu'il attendait mes instructions pour revenir à Genève. La première qualité du candidat était déjà révélée: courage de suivre inconditionnellement un choix. Les autres devaient s'affirmer progressivement au cours de son activité à Genève et je peux les résumer par les mots suivants: imagination, discipline, persévérance, pouvoir de synthèse verbale et écrite.

Je ne vais pas aborder le domaine de la contribution scientifique du Dr Montesano récompensée aujourd'hui par le Prix Cloëtta. Qui pourrait le faire mieux que le récipiendaire lui-même, dans un instant? J'aimerais, en revanche, introduire un commentaire personnel sur la Suisse comme pays d'accueil. Je suis particulièrement heureux

d'en avoir l'opportunité, puisque les débuts de mon activité scientifique à Genève ressemblent presque point par point à ceux du lauréat d'aujourd'hui. Arrivé en Suisse de Rome pour un bref stage à Genève, j'ai rencontré la confiance et l'enthousiasme de mon regretté maître, le professeur Charles Rouiller; ce qui devait être une simple visite est devenu une identité scientifique complète. Pour peu que l'on connaisse les restrictions administratives qui limitent les échanges académiques presque partout en Europe, je dirai sans hypocrisie que sans ce pays d'accueil exemplaire qu'est la Suisse, les qualités du Dr Montesano n'auraient peut-être pas connu tout le développement que le Conseil de Fondation du Prix Cloëtta a pensé pouvoir distinguer.
Distinctions, prix, honneurs dans un monde où tout semble trop souvent comparable ou du moins apparemment comparable, n'y a-t-il pas là un germe de vanité à craindre? Personnellement, je ne crois pas à ce risque et je soutiens entièrement les buts de la Fondation Cloëtta qui sont d'encourager l'excellence.
Roberto Montesano, nous célébrons aujourd'hui votre contribution scientifique. Nous devons également mentionner vos responsabilités. Parmi celles-ci, la plus importante me paraît que vous continuiez à donner de vous-même aux autres. Ce n'est qu'en partageant vos talents avec vos collègues et vos étudiants que vous approfondirez votre condition de chercheur et d'homme et que vous pourrez ainsi lui donner sa vraie mesure.

LE PRIX CLOËTTA 1985
EST DÉCERNÉ À

MONSIEUR

ROBERTO MONTESANO

DOCTEUR EN MÉDECINE

NÉ EN 1948, MAÎTRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
AU DÉPARTEMENT DE MORPHOLOGIE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR SES TRAVAUX SUR LES INTERACTIONS ENTRE CELLULES ET
MATRICE EXTRACELLULAIRE DANS L'ORGANOGENÈSE, EN PARTICULIER
SUR LES CELLULES ENDOTHÉLIALES ET LES MÉCANISMES
INTRA ET EXTRACELLULAIRES IMPLIQUÉS DANS L'ANGIOGENÈSE.

ZURICH, LE 25 NOVEMBRE 1985

POUR LE CONSEIL DE FONDATION:

LE PRÉSIDENT: LE VICE-PRÉSIDENT:

UN MEMBRE:

Dr. Roberto Montesano

CURRICULUM VITAE

of Dr. Roberto Montesano

Date of birth	2 June 1948
Place of birth	Guidizzolo, Mantova (Italy)
Nationality	Italian
Studies	
1966	Baccalaureat
1972	M. D., University of Parma (Italy) with honours
1972–1975	Awarded special diploma of Clinical Chemistry and Biochemistry, University of Parma, Italy
Post-doctoral career	
1972–1973	Assistant (post-doctoral fellow) at the Institute of Histology and Embryology, University of Parma, Italy
1974–1977	Assistant (post-doctoral fellow) at the Institute of Histology and Embryology, University of Geneva, with Prof. Orci
1978–1982	"Chargé de recherche" at the Institute of Histology and Embryology, University of Geneva
Present position	
From Oct. 1982	"Maître d'enseignement et de recherche" at the Institute of Histology and Embryology, University of Geneva.

CELL-EXTRACELLULAR MATRIX INTERACTIONS IN ORGANOGENESIS

Dr. Roberto Montesano

The molecular basis of development is a central problem of modern biology. Formation of a precisely organized functional tissue or organ (organogenesis) is one of the major phases of embryonic development, and represents the culmination of a series of specific cellular events. Throughout the various stages of organogenesis, macromolecules present in the extracellular matrix provide structural support, and act as a glue that binds together the different cell types in a complex tissue or organ. Since the pioneering studies of Grobstein [1], it has become increasingly clear that the extracellular matrix serves not only as an inert physical scaffolding for the developing tissues, but also provides environmental signals to the cells involved, thus playing an important instructive role in morphogenetic processes. In addition, the extracellular matrix represents the natural substratum through which various cell types migrate during embryogenesis and also in adult life in association with pathologic conditions, such as inflammation and tumor spread.

The theme of this presentation is centered on the role of cell-matrix interactions in organogenesis. Since these interactions are difficult to analyze and to manipulate experimentally in vivo, we sought a culture model in which to study the influence of specific extracellular matrix constituents* on the morphogenetic behavior of various cell types. Hydrated collagen gels [2] proved useful for this purpose. A major advantage of this technique over conventional monolayer cultures is that cells can be embedded within a three-dimensional lattice of reconstituted collagen fibrils mimicking, at least in part, the in vivo organization of the extracellular matrix. This culture method, therefore, allows for both cell-matrix interactions and three-dimensional growth. Initially, collagen gels were used mainly to study the behavior of fibroblasts and other mesenchymal cells, and only in the last few years has it been realized that epithelial cells can organize

* The extracellular matrix is composed essentially of collagen fibrils, other structural glycoproteins, and protein-bound carbohydrate chains (glycosaminoglycans) forming huge macromolecular complexes called proteoglycans.

into tissue-like structures when grown inside collagen gels. This has been demonstrated, for example, with mammary gland epithelial cells [3], thyroid follicular cells [4], and also with established epithelial cell lines [5]. We therefore used collagen gels as a tool to investigate the role of the extracellular matrix in morphogenetic processes.

The pancreatic islet model

We first addressed the question of whether cell-matrix interactions could contribute to the establishment of appropriate intercellular relationships in solid, heterocellular tissues. Pancreatic endocrine cells appeared particularly well suited for this study because in vivo they are associated into spheroidal aggregates, the islets of Langerhans, in which the four different endocrine cell types are not randomly distributed but have a characteristic topographical arrangement (i.e. a central mass of insulin-containing cells surrounded by a rim of glucagon-, somatostatin-, and pancreatic polypeptide-containing cells) [6]. By contrast, when pancreatic endocrine cells are grown in vitro under standard culture conditions [7], they form flattened clusters in which the characteristic cell distribution seen in intact islets is no longer recognizable. To establish whether an appropriate extracellular matrix environment could induce islet cells to re-express the specific patterns of three-dimensional association found in vivo, we cultured pancreatic endocrine cells on the surface of a collagen gel (Fig. 1), and then covered the culture with a second layer of collagen. This induced the monolayers of endocrine cells to reorganize, within a few days, into spheroidal aggregates of a size comparable to that of the islets of Langerhans [8]. When we examined the distribution of the various islet cell types by either immunofluorescence with antibodies against islet hormones (Fig. 2) or electron microscopy (Fig. 3), we found that insulin-containing B-cells were concentrated in the central portion of the aggregates, while the other endocrine cell types had a preferential distribution at the periphery, exactly as observed in islets of Langerhans in situ. These results show that pancreatic islet cells are able to self-associate in a well-defined topographical pattern when cultured in a three-dimensional extracellular matrix environment [8].

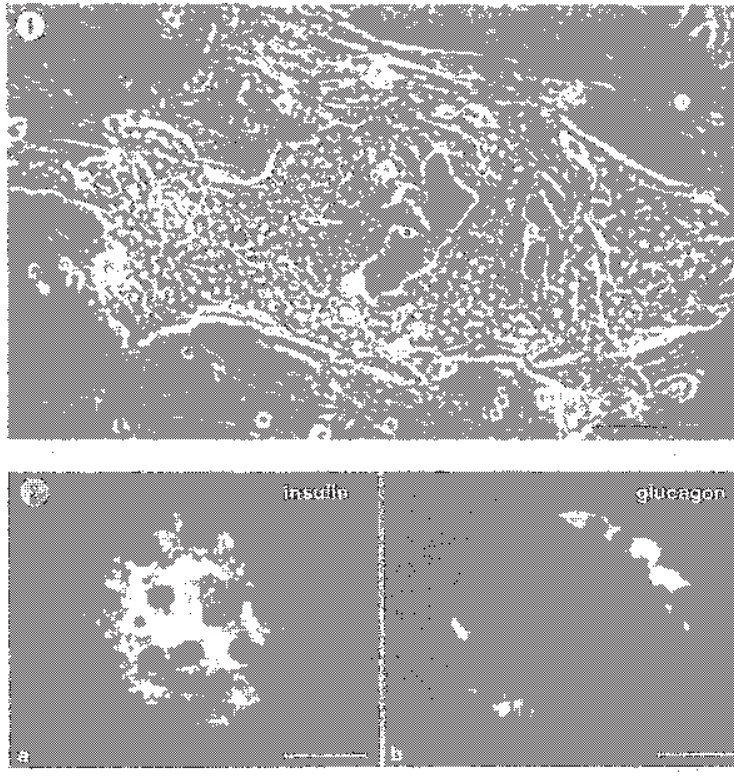


Fig. 1
Pancreatic islet cells grown on the surface of a collagen gel (phase contrast). The culture appears as a monolayer consisting of irregularly-shaped, flattened clusters of endocrine cells. Bar, 100 μm. (From the Journal of Cell Biology, 97, 935, 1983.)

Fig. 2
Consecutive semithin sections of a spheroidal islet cell aggregate formed inside a three-dimensional collagen matrix. The sections were stained by indirect immunofluorescence with anti-insulin and anti-glucagon antisera to visualize the topographical arrangement of the two endocrine cell types. Insulin-containing cells have a central location (a), while glucagon-containing cells are distributed at the periphery of the aggregate (b). Bar, 20 μm. (From the Journal of Cell Biology, 97, 935, 1983.)

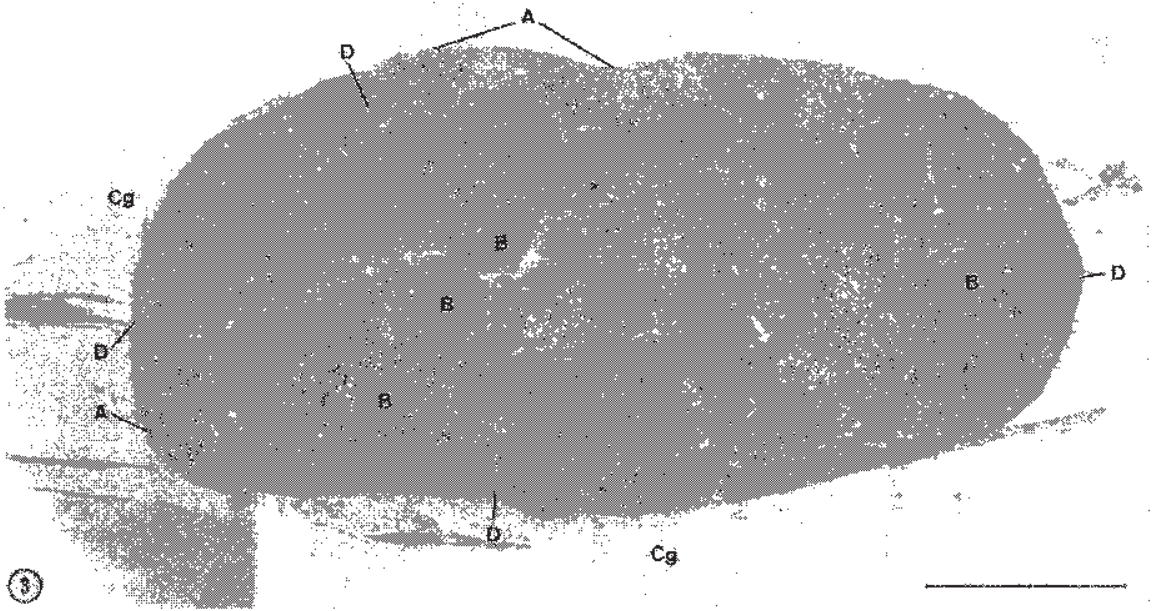
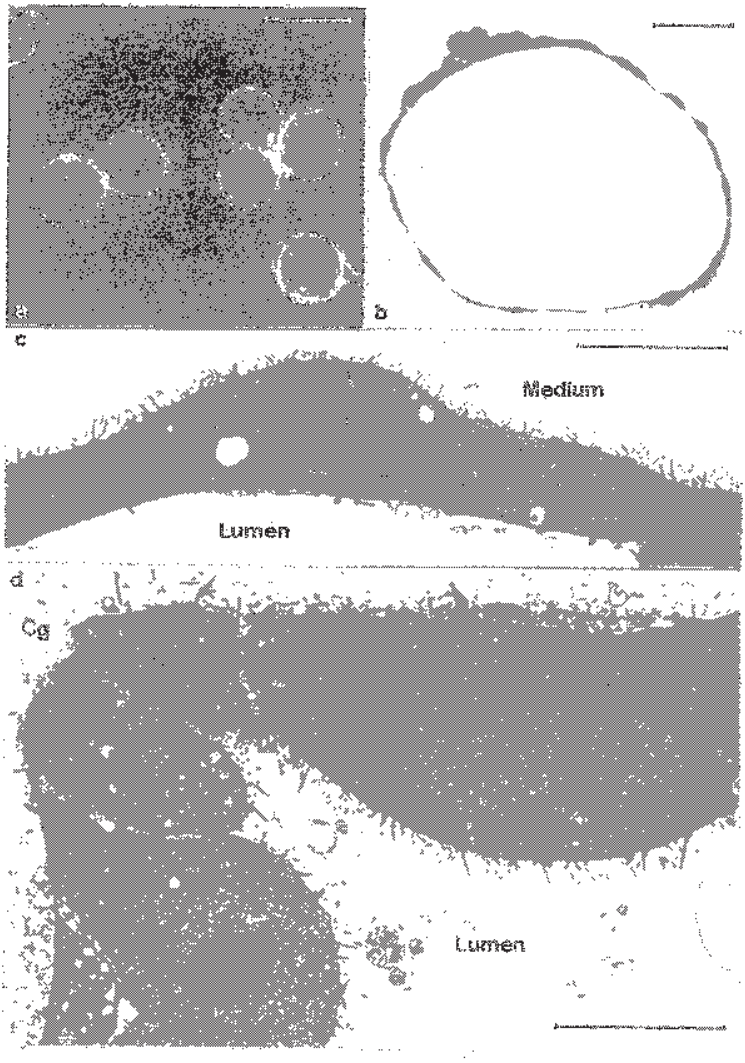


Fig. 3
Thin section perpendicular to the culture plane showing a three-dimensional islet cell aggregate embedded in a collagen gel. B cells are concentrated in the central portion of the aggregate, whereas A and D cells are in a peripheral position. B, B cells; A, A cells; D, D cells; Cg, collagen gel. Bar, 20 μm. (From the Journal of Cell Biology, *97*, 935, 1983.)

The kidney-derived LLC-PK$_1$ cells: a model for the study of epithelial polarity

The morphogenetic process leading to the formation of the various tissues and organs requires not only the ordered organization of individual cells into complex three-dimensional structures, but also the asymmetric spatial distribution of cellular components, that is cell polarization. To investigate the role of the extracellular matrix in the establishment of cell polarity, we took advantage of the property of a kidney-derived epithelial cell line (the LLC-PK$_1$ cell line, clone D$^+$) to form monolayers of polarized cells in culture. These studies involved two successive experimental steps [9]. We first seeded the LLC-PK$_1$/D$^+$ cells in tissue culture dishes coated with agarose, a non-adhesive substratum, to prevent the attachment of the cells to the bottom of the dishes. In these conditions, the cells aggregated in suspension and formed, within about one week, free-floating hollow spheres or cysts (Fig. 4a), lined by a monolayer of flattened cells (Fig. 4b). Electron microscopy showed that the cells forming the wall of the cysts had a microvilli-rich surface oriented towards the outside, and a smoother surface facing the lumen (Fig. 4c). These observations indicate that cell-to-cell contact, in the absence of attachment to a solid substratum, is a sufficient signal to induce the organization of D$^+$ cells into polarized cavitary structures [9]. However, the polarity of the cells lining the cysts was inverted with respect to that observed in kidney tubules (the proposed tissue of origin of LLC-PK$_1$ cells) as well as in other cavitary organs in vivo, in which the microvilli-rich apical surface is oriented towards the lumen of the cavity. In the second step of this study, we examined the influence of

Fig. 4
Reorganization of LLC-PK$_1$/D$^+$ cysts following embedding in collagen gels. (a) LLC-PK$_1$/D$^+$ cells after 4 days of culture in suspension. The cells have organized into free-floating, spherical, hollow cysts (dark field illumination). Bar, 200 μm. (b) Semithin section of a cyst. Bar, 50 μm. (c) Thin section through the wall of a cyst after 8 days of culture in suspension. The cells have a microvilli-rich surface oriented towards the outside and a smoother surface that faces the lumen of the cyst. Bar, 10 μm. (d) Inversion of cell polarity 42 hours after embedding a cyst in a collagen gel. The cells have a microvilli-rich surface oriented towards the lumen of the cyst. Cg, collagen gel. Bar, 10 μm. (From the Journal of Cellular Physiology, 1985, in press.)


a
b
c
Medium
Lumen
d
Cg
Lumen

the extracellular matrix on the polarity of the epithelial cysts [9]. For this purpose the cysts were embedded in collagen gels, thus exposing the apical cell surface to extracellular matrix components normally associated with basal surfaces. This resulted in a rapid and dramatic reorganization of the cyst structure, leading to an inversion of the original cell polarity: microvilli progressively disappeared from the outer surface of the cysts, while new microvilli formed on the surface facing the lumen (Fig. 4d). Thus, the new polarity induced by the contact with the collagen matrix corresponds to that observed in vivo. Similar results have been reported with thyroid follicular cells [4].

The formation of blood capillaries (angiogenesis)

The experiments performed with pancreatic endocrine cells and the kidney-derived cell line demonstrate that cell-matrix interactions play a crucial role in two essential steps of organogenesis: 1) the organization of epithelial cells into complex three-dimensional structures, and 2) the establishment of a correct cellular polarization. These encouraging results prompted us to investigate the role of cell-matrix interactions in a clinically-important process of organogenesis, i.e. the formation of capillary blood vessels or angiogenesis.
Angiogenesis takes place during embryonic development, but also occurs in a wide range of important biological processes in adult life. For example, wound healing could not take place without angiogenesis. However, there are conditions in which angiogenesis is deleterious to the organism. Folkman and coworkers [10] have shown that angiogenesis is necessary for the continuous growth of tumors: if a tumor cannot receive new capillary blood vessels from the surrounding host tissues, it stops growing. Therefore, therapeutic inhibition of the angiogenic process has been proposed as a strategy for the control of tumor growth [10]. There are other pathological situations in which angiogenesis has an adverse effect. For example, proliferating capillaries invade the vitreous humor of the eye in diabetes, leading to blindness, or the cartilage of the joints in rheumatoid arthritis, thereby participating in the destruction of the cartilage. Clearly, the ability to modulate the angiogenic process would provide a powerful tool in the management of a variety of malignant and non-malignant

diseases. Unfortunately, progress in this direction has been hampered by our still limited understanding of the mechanism of angiogenesis. It is well known that, in response to angiogenic stimuli, the endothelial cells of blood capillaries start to invade and to migrate through the extracellular matrix of the surrounding connective tissue, eventually forming a new capillary network [10]. However, we do not know how the migrating endothelial cells organize into new capillary tubes, nor how they can move through a dense matrix of collagen fibrils. Obviously, experiments aimed at answering these questions cannot be done in vivo. The recent development of techniques for the isolation and culture of capillary endothelial cells has provided an opportunity for the in vitro study of endothelial cell properties that are relevant to the process of angiogenesis. Despite this, conventional culture methods suffer from two major limitations, namely loss of cell-matrix interactions and two-dimensional growth. To approximate as closely as possible the in vivo situation, we cultured capillary endothelial cells in contact with a collagen matrix.

Collagen matrix promotes the organization of endothelial cells into capillary-like tubes

The first question we addressed was the following: "Does the extracellular matrix promote the organization of endothelial cells into capillary-like tubes?" To answer this question, we seeded capillary endothelial cells onto the surface of a collagen gel and subsequently covered the culture with a second layer of collagen, as we had done previously with pancreatic endocrine cells. In these conditions, the culture underwent a dramatic change: collagen overlay was followed by a progressive reorganization of the monolayer, which resulted, within about 2 days, in the formation of a network of branching and anastomosing cords of endothelial cells. By phase contrast microscopy, most of these cords showed a central, translucent cleft along their axis, which suggested the formation of a lumen. That this was indeed the case was demonstrated by sections perpendicular to the culture plane. Both semithin (Fig. 5a, b) and thin sections (Fig. 5c) clearly showed that the endothelial cells were organized so as to form tubular structures resembling blood capillaries. In addition, electron

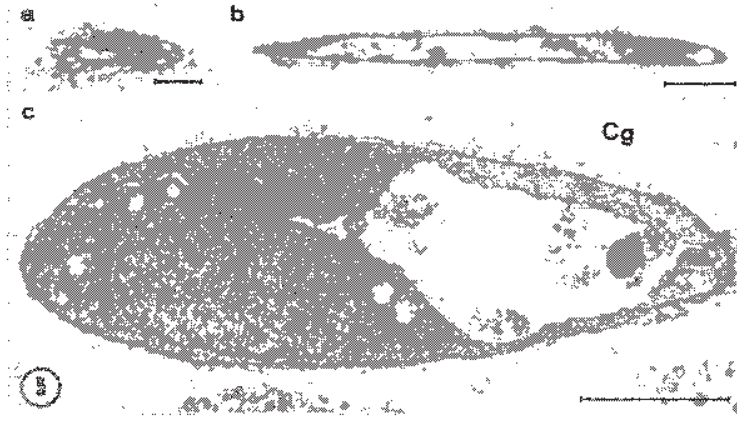


Fig. 5
Semithin (a and b) and thin (c) sections perpendicular to a culture of capillary endothelial cells grown on a collagen gel and subsequently overlaid with a second collagen layer. The endothelial cells are organised around narrow lumina so as to form capillary-like tubular structures. Cg, collagen gel. (a) Bar, 10 µm; (b) bar, 20 µm; (c) bar, 5 µm. (From the Journal of Cell Biology, 97, 1648, 1983.)

microscopy revealed the presence of a basal lamina at the interface between the endothelial cells and the collagen matrix – that is, in the same location as observed in vivo. These results demonstrate that an appropriate interaction with the extracellular matrix plays a critical role in the organization of endothelial cells into correctly-polarized capillary tubes [11].

In these experiments, capillary-like tubular structures were obtained by embedding the endothelial cells inside a three-dimensional collagen matrix, whereas during angiogenesis, new capillary blood vessels form by a process of active invasion of the extracellular matrix. Therefore, the next question we addressed was the following:

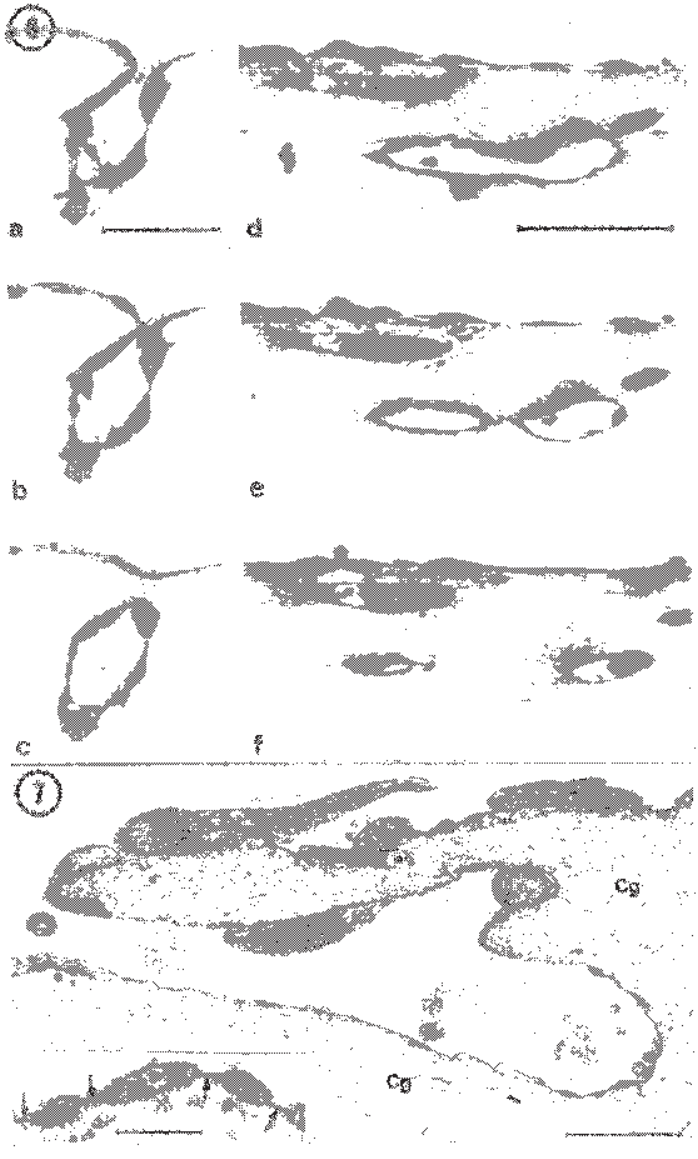
What changes occur in a quiescent endothelial cell that cause it to become invasive?

Several investigators have proposed that cellular invasiveness in various biological processes (for example, the implantation of the em-

bryo into the uterine wall and the spread of cancer) requires the elaboration of proteolytic enzymes (proteases) capable of degrading the extracellular matrix [12]. A similar hypothesis was proposed to explain endothelial cell invasiveness during angiogenesis [13]. To test this in an in vitro system, we took advantage of the ability of the phorbol ester, phorbol myristate acetate (PMA), to markedly increase the secretion of proteases by capillary endothelial cells [13]. Phorbol esters, the active principles of croton oil, are potent tumor promoters: they trigger the formation of tumors in animals that have been exposed to a subthreshold dose of a carcinogen, although they are not able to induce tumors when applied alone [14]. Phorbol esters elicit an amazing variety of effects on cells in culture [14]. Among their most characteristic effects is the stimulation of protease secretion. In particular, capillary endothelial cells have been shown to produce a markedly increased amount of the proteases collagenase and plasminogen activator following treatment with PMA [13]. Collagenase is an enzyme that specifically degrades collagen fibrils, whereas plasminogen activator converts the proenzyme plasminogen to its active form, plasmin, an enzyme of broad substrate specificity. In addition to degrading fibrin and certain noncollagenous components of the extracellular matrix, such as fibronectin, plasmin is also able to activate other enzymes, including collagenase, which is usually secreted in a latent form [12]. To determine whether production of these proteases could promote endothelial cell invasiveness, capillary endothelial cells grown on the surface of a thick, three-dimensional gel of collagen fibrils were incubated with either normal culture medium or medium containing PMA (see below).

Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis in vitro

Endothelial cells grown in normal medium formed a confluent monolayer at the fluid/matrix interface, and did not infiltrate the underlying collagen lattice. Within 2–6 hours after the addition of 20 ng/ml PMA, the flattened endothelial cells became more refractile and took on an irregular shape with long cell processes. After about 18 hours of treatment, scattered cells with an elongated or dendritic morphology and whose plane of focus was obviously beneath the surface monolayer could be recognized. Examination with a high


8
a
d
b
e
c
f
7
Cg
Cg

power phase contrast objective (40 ×) clearly showed that these cells had invaded and migrated through the three-dimensional collagen matrix. Within 2–3 days after the addition of PMA, the invading cells formed branching cords which tended to anastomose with one another. These endothelial cell cords frequently had translucent clefts along their axis, and many of them enclosed large, clear spaces, indicating the formation of capillary-like tubular structures. Therefore, PMA treatment of endothelial cell cultures resulted in the formation of a monolayer of irregularly-shaped cells at the surface of the collagen gel and a network of tube-like cords extending throughout the collagen matrix, as demonstrated also by sections perpendicular to the culture plane (Fig. 6). These sections also revealed in many instances a continuity between the endothelial cells delimiting the tubular structures and those at the surface of the gel (Figs. 6a–c, and 7).

To determine whether the above effects of PMA required de novo protein synthesis, cultures were preincubated for 2 h with 1 μg/ml cycloheximide, an inhibitor of protein synthesis, then treated with PMA in the continuous presence of cycloheximide. Cycloheximide did not inhibit the early morphological effect of PMA, that is the change of cell shape, but completely prevented its late effect, that is the invasion of the collagen matrix and the formation of capillary-like tubes. Endothelial cells treated with both PMA and cyclohexim-

Fig. 6
Invasion of collagen gels and formation of vessel-like structures by PMA-treated capillary endothelial cells (semithin sections perpendicular to the culture plane). (a–c) Consecutive serial sections showing the continuity between the endothelial cells forming the surface monolayer and those delimiting a tube-like structure inside the collagen matrix. (d–f) Serial semithin sections showing the dichotomy of a vessel-like structure into two smaller tubes that progressively separate from one another; (d) and (e) are consecutive sections, whereas (f) is three sections farther. Bars = 50 μm. (From Cell, *42*, 469, 1985.)

Fig. 7
Thin section showing the continuity between the endothelial cells that line a capillary-like tube formed inside the collagen gel (Cg) and those present at the surface of the gel. Bar, 20 μm. Inset: endothelial pores with fenestral diaphragms (arrows). Bar = 0.2 μm. (From Cell, *42*, 469, 1985.)

ide had an altered morphology, similar to that induced by PMA alone, but remained entirely confined to the surface of the collagen gel. This inhibition was reversible: within 2 days after removal of cycloheximide, PMA-treated endothelial cells started to infiltrate into the underlying matrix, and a network of tubelike structures was formed within 3 to 5 days. These results indicate that PMA has two distinct, morphologically recognizable effects on cultured capillary endothelial cells: an early shape change which appears to be independent of protein synthesis, and a late effect, the invasion of the collagen gels, which is first detectable after about 18 hours of treatment and requires de novo protein synthesis. This suggests that PMA modifies the endothelial cell behavior by inducing the synthesis of specific proteins that are essential for invasion to take place.

The role of proteolytic enzymes

The experiments described so far demonstrated that treatment with PMA induced capillary endothelial cells to invade the underlying collagen matrix, where they formed an extensive network of capillary-like tubular structures, and that this process required protein synthesis [15]. However, they still did not provide information as to the involvement of proteases in this phenomenon. We therefore performed further experiments specifically aimed at elucidating the following questions: 1) is the PMA-induced invasion of collagen gels accompanied by collagen degradation? 2) does the invasive behavior of PMA-treated endothelial cells require protease activity? To answer the first question, we cultured the endothelial cells on gels prepared from collagen radiolabelled with [^{3}H]acetic anhydride. The collagenolytic activity of control and PMA-treated endothelial cells was determined by measuring the release of radioactivity from the collagen matrix into the supernatant culture medium (Table 1). Control cultures released only small amounts of label. In contrast, PMA-treated endothelial cells caused a markedly enhanced amount of radioactivity to be released between the 2nd and 4th day of culture, concomitant with extensive invasion of collagen gels as seen by phase contrast microscopy. Between the 4th and 6th day, PMA-treated endothelial cells induced the release of up to 30 times more label

than did control endothelial cells (Table 1). These data indicate that PMA-induced invasion of collagen gels is associated with the degradation of collagen fibrils [15].

To answer the second question, that is whether the invasive behavior of PMA-treated endothelial cells requires protease activity, we studied the effect of a wide spectrum of protease inhibitors. Proteases are usually classified in four groups on the basis of the chemical nature of the active site responsible for the catalytic activity of the enzyme: serine-proteases (which include plasmin and plasminogen activator), thiol-proteases, carboxy-proteases, and metallo-proteases (which include collagenase) [16]. The following inhibitors, directed against

Table I

Collagen degradation associated with invasion of collagen gels and formation of capillary-like tubes by PMA-treated capillary endothelial cells

Day	Total cpm recovered in the medium			Net cpm released by the cells (= collagen degradation)	
	Gels without cells (background)[1]	Control endothelial cells	PMA-treated endothelial cells	Control endothelial cells	PMA-treated endothelial cells
2	3,382 ± 46	4,250 ± 88	6,247[2] ± 130	868	2,865
4	2,592 ± 31	3,055 ± 105	10,810[2] ± 347	463	8,218
6	2,152 ± 109	2,455 ± 111	12,135[2] ± 357	330	10,010

Capillary endothelial cells were grown to confluency on three-dimensional gels prepared from collagen radiolabelled with [^{3}H]acetic anhydride, and further incubated with 500 µl of either control medium or medium containing PMA (20 ng/ml) for 6 days. The culture medium was changed at 2-day intervals, at which time the total radioactivity recovered in the medium was measured. The radioactivity recovered in the medium overlying gels without cells (background non-specific release) was also determined, and this value subtracted from the corresponding value obtained from gels with cells to calculate the net release of radioactivity due to the presence of the endothelial cells. Each value in the Table represents the mean ± s.e.m. of 4 replicate cultures.

[1] The release of radioactivity from cell-free gels was not modified by the addition of PMA. A total of 2.4×10^5 c.p.m. was recovered from each 200 µl collagen gel after complete dissolution with bacterial collagenase.

[2] $p << 0.001$ versus control endothelial cell values (Student's t-test).

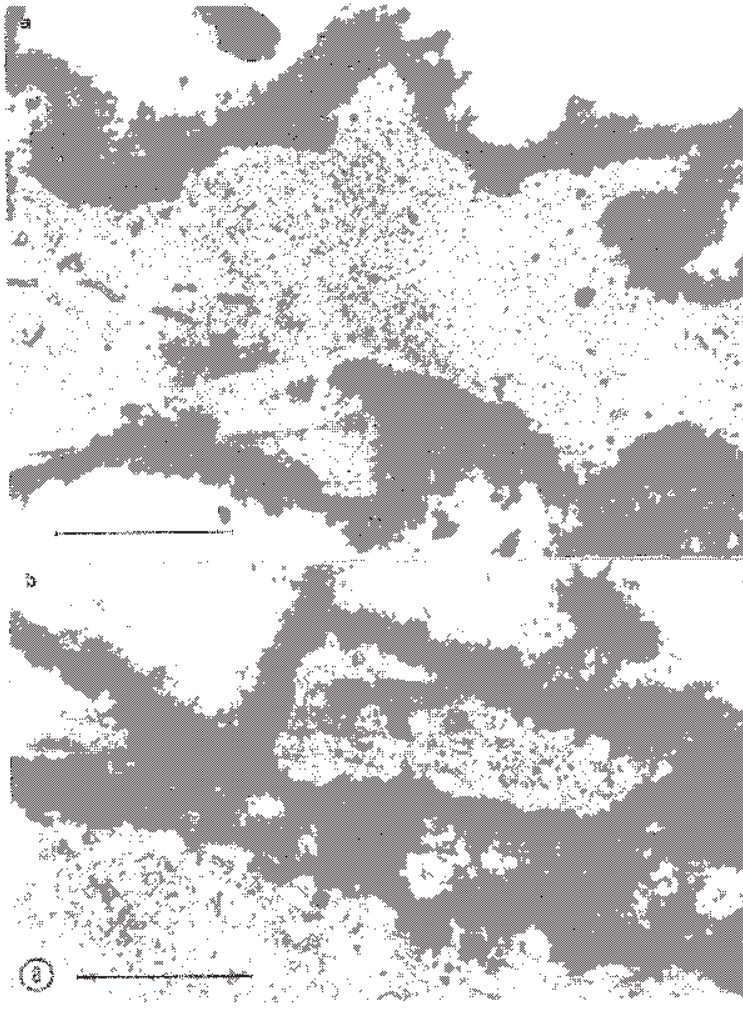
each of these four classes of proteases, were added to the cultures at the concentrations indicated in Table II: benzamidine, soybean trypsin inhibitor, ε-aminocaproic acid, Trasylol, chymostatin, p-nitrophenylguanidinobenzoate and α_1-proteinase inhibitor (α_1-antitrypsin), all inhibitors of serine proteases; antipain and leupeptin, which inhibit some serine proteases as well as thiol proteases; pepstatin, an inhibitor of carboxyproteases; the metallo-protease inhibitor, 1,10-phenanthroline; and α_2-macroglobulin, a physiological broad spectrum protease inhibitor which reacts with the majority of proteases from all four groups [16]. We found that inhibitors active against serine-, thiol- and carboxy-proteases did not prevent the effect of PMA. Although a relative resistance of membrane-bound proteases to inhibitors present in the extracellular fluid cannot be ruled out, these results suggest that the activity of proteases from these three classes may not be required for endothelial cells to invade, and to migrate through, a lattice of collagen fibrils. In contrast, the effect of PMA was prevented by the metalloprotease inhibitor 1,10-phenanthroline, a result which is compatible with the involvement of a metalloprotease (e.g. collagenase) in the invasive process [15].

Taken together, the experiments with PMA demonstrate that a well defined chemical signal can switch the behavior of capillary endothelial cells from non-invasive to highly invasive and trigger, in vitro, phenomena that closely mimick the angiogenic process occurring in vivo. Although phorbol esters are not physiologically occurring substances, they cause a variety of effects in cultured cells, many of which are also elicited by hormones or growth factors [14]. Recent evidence indicates that the molecular target of phorbol esters is protein kinase C, an enzyme that plays a crucial role in the transduction of extracellular signals [17]. Phorbol esters are thought to activate kinase C by substituting for the endogenous messenger, diacylglycerol, which is produced from the breakdown of membrane phosphoinositides in response to external stimuli [17]. It is therefore possible that PMA triggers endothelial cell invasiveness by mimicking the action of physiological mediators that stimulate phosphoinositide metabolism, and it would be of interest to establish whether known angiogenic factors induce such biochemical changes in endothelial cells. In any event, we believe that this in vitro system provides a unique opportunity for the experimental dissection of the

molecular mechanisms of angiogenesis. A better understanding of how these phenomena are regulated at the biochemical level could allow the identification of specific angiogenesis inhibitors, and may help to throw light on the mechanism of cell invasiveness in other important biological processes, including cancer.

Effect of interleukins on endothelial cells

Angiogenesis-inducing factors have been isolated from tumors as well as from a variety of normal tissues and cells, including retina, corpus luteum, adipocytes, lymphocytes and macrophages [10]. Production of angiogenesis factors by lymphocytes and monocytes-macrophages is of particular interest because of the frequent occurrence of vascular proliferation during certain immune reactions (such as those responsible for graft rejection and delayed hypersensitivity reactions) and chronic inflammation [18]. It is well known that mononuclear leukocytes (lymphocytes and monocytes) that have been activated by antigens or lectins secrete in their culture medium an array of soluble factors (collectively called lymphokines or interleukins) which have a wide spectrum of regulatory activities on both lymphoid and non-lymphoid cells [19]. In collaboration with Professor P. Vassalli, we have studied the effect of interleukins on cultured endothelial cells. For this purpose, human umbilical vein endothelial cells were incubated with interleukin-rich culture medium (supernatant) from phytohemagglutinin-activated human peripheral blood mononuclear leukocytes (here abbreviated PBL). The PBL supernatants had a dramatic effect on the morphology of cultured endothelial cells as well as on their production of extracellular matrix [20, 21]. Whereas normal endothelial cells have a characteristic polygonal, epithelial morphology, cells incubated with PBL supernatants assumed, within 2–5 days, an elongated fibroblastic appearance and/or a dendritic shape with long cell processes. These morphological changes were accompanied by a marked reorganization of the three main components of the cytoskeleton (microfilaments, microtubules and intermediate filaments; for details, see ref. 20). However, the most striking change observed in endothelial cultures incubated with PBL supernatants was the elaboration of a highly organized extracellular material that was not detectable in untreated cultures [21].


a
b
a

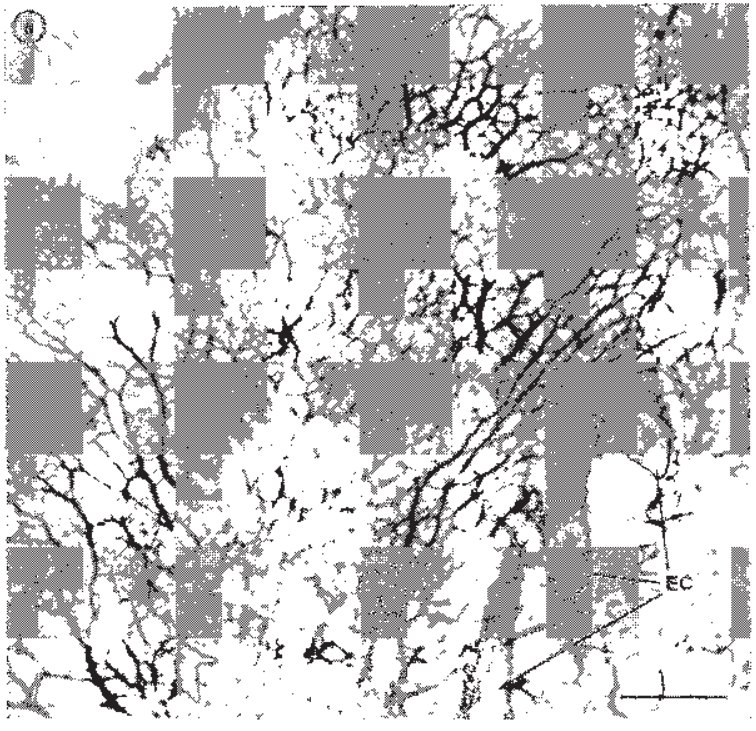


Fig. 9
Thin section of an endothelial cell culture passing tangentially to the bottom of the Petri dish. A network of Alcian blue-stained extracellular fibrils extensively coats the culture substrate (grayish upper and left part of the micrograph). EC, endothelial cell processes. Bar, 2 μm. (From the Journal of Cell Biology, *99*, 1706, 1984.)

Fig. 8
Thin sections of human umbilical vein endothelial cells exposed to supernatants of activated human mononuclear leukocytes. A network of electron-dense extracellular fibrils forms a cage around the cell periphery (a) and extends between contiguous cells (b). Glutaraldehyde-Alcian blue fixation. (a) Bar, 5 μm; (b) bar, 2 μm. (From the Journal of Cell Biology, *99*, 1706, 1984.)

This material, which was not recognizable by electron microscopy unless the cationic dye, Alcian blue, was added to the fixative, appeared as a network of branching and anastomosing fibrils (Fig. 8a) that extended between contiguous endothelial cells (Fig. 8b) and coated the culture substrate (Fig. 9). What is the chemical nature of this material? To answer this question, we used techniques of enzymatic digestion: living endothelial cell cultures were incubated with a variety of enzymes capable of degrading specific components of the extracellular matrix, then fixed and processed for electron microscopy. We found that the Alcian blue-stainable material was no longer visible after incubation of the cultures with crude Flavobacterium heparinum heparinase, a mixture of enzymes which degrades virtually all classes of glycosaminoglycans. To define more precisely the chemical nature of the extracellular material induced by treatment with PBL supernatants, we turned to the use of enzymes that selectively degrade specific classes of glycosaminoglycans. We found that the alcianophilic matrix was also susceptible to digestion with chondroitinase ABC (which acts on chondroitin sulfates and hyaluronic acid), but was resistant to human platelet heparitinase (which is specific for heparan sulfate and heparin). This indicates that the alcianophilic material contains chondroitin sulfate and/or hyaluronic acid. Since supernatants from cultures of activated mononuclear leukocytes contain a variety of released products, we examined the effect of purified interleukins on endothelial cells. While recombinant human interleukin 2 had no effect, combined treatment with both recombinant γ-interferon and purified interleukin 1 reproduced the effects of PBL supernatants, that is the change of cell shape and the elaboration of a glycosaminoglycan-rich extracellular matrix [21]. This suggests a synergistic action of γ-interferon and interleukin 1 on endothelial cells, and might shed new light on leukocyte/endothelial cell interactions in immune responses and inflammation. Although the precise meaning of the production of a glycosaminoglycan-rich matrix by interleukin-treated endothelial cells remains to be established, it is of interest that glycosaminoglycans surrounding newly-formed blood vessels differ in arrangement and composition from those associated with mature vessels [22]. Thus, an attractive hypothesis, presently under investigation, is that the endothelial cell changes we have observed after interleukin stimulation represent the

in vitro equivalent of a phenomenon occurring during angiogenesis in vivo.

At the present stage of our work, we have defined experimental conditions that allow endothelial cells to organize into capillary-like structures, and we have identified leukocyte mediators capable of modifying the behavior of endothelial cells. With these tools in hand, we are now in a good position to study the regulation of angiogenesis at the molecular level, the ultimate goal being the pharmacological modulation of the angiogenic process.

In conclusion, our experiments clearly support the emerging concept [23] of a reciprocal interaction between cells and extracellular matrix. On the one hand, extracellular macromolecules can profoundly affect cell behavior; on the other, the cells can modulate their own production of extracellular matrix in response to appropriate regulatory signals. We are confident that further studies of cell-matrix interactions using in vitro models such as those we have described will greatly improve our understanding of phenomena that are too difficult or impossible to investigate in the intact organism.

SELECTED REFERENCES

1. Grobstein, C.: Tissue interaction in the morphogenesis of mouse embryonic rudiments in vitro. In "Aspects of Synthesis and Order in Growth". Rudnick, G. (ed.) Princeton University Press, Princeton, NJ (1954), pp. 233–256.

2. Elsdale, T., and Bard, J.: Collagen substrata for studies on cell behavior. J. Cell Biol. *54*, 626–637 (1972).

3. Yang, J., Richards, J., Bowman, P., Guzman, R., Enami, J., McKormick, K., Hamamoto, S., Pitelka, D., and Nandi, S.: Sustained growth and three-dimensional organization of primary mammary tumor epithelial cells embedded in collagen gels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *76*, 3401–3405 (1979).

4. Chambard, M., Gabrion, J., and Mauchamp, J.: Influence of collagen gel on the orientation of cell polarity: follicle formation from isolated thyroid cells and from preformed monolayers. J. Cell Biol. *91*, 157–166 (1981).

5. Hall, H. G., Farson, D. A., and Bissell, M. J.: Lumen formation by epithelial cell lines in response to collagen overlay: a morphogenetic model in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *79*, 4672–4676 (1982).

6. Orci, L.: Macro- and micro-domains in the endocrine pancreas. Diabetes *31*, 538–565 (1982).

7. Lambert, A. E., Blondel, B., Kanazawa, Y., Orci, L., and Renold, A. E.: Monolayer cell culture of neonatal rat pancreas: light microscopy and evidence for immunoreactive insulin synthesis and release. Endocrinology *90*, 239–248 (1972).

8. Montesano, R., Mouron, P., Amherdt, M., and Orci, L.: Collagen matrix promotes reorganization of pancreatic endocrine cell monolayers into islet-like organoids. J. Cell Biol. *97*, 935–939 (1983).

9. Wohlwend, A., Montesano, R., Vassalli, J.-D., and Orci, L.: LLC-PK$_1$ cysts: a model for the study of epithelial polarity. J. Cell Physiol., in press.

10. Folkman, J.: Tumor angiogenesis. Adv. Cancer Res. *43*, 175–203 (1985).

11. Montesano, R., Orci, L., and Vassalli, P.: In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. J. Cell Biol. *97*, 1648–1652 (1983).

12. Mullins, D. E., and Rohrlich, S. T.: The role of proteinases in cellular invasiveness. Biochim. Biophys. Acta *695*, 177–214 (1983).

13. Gross, J. L., Moscatelli, D., Jaffe, E. A., and Rifkin, D. B.: Plasminogen activator and collagenase production by cultured capillary endothelial cells. J. Cell Biol. *95*, 974–981 (1982).

14. Blumberg, P. M.: In vitro studies on the mode of action of the phorbol esters, potent tumor promoters. CRC Crit. Rev. Toxicol. *8*, 153–197 (1980).

15. Montesano, R., and Orci, L.: Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis in vitro. Cell, *42*, 469–477 (1985).

16. Barrett, A. J.: The many forms and functions of cellular proteinases. Fed. Proc. *39*, 9–14 (1980).

17. Nishizuka, Y.: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. Nature *308*, 693–698 (1984).

18. Auerbach, R.: Angiogenesis-inducing factors. A review. *In:* "Lymphokines". E. Pick, ed. Academic Press, Inc. New York, Vol. 4, 1981, pp. 69–88.

19. Rocklin, R. E., Bendtzen, K., and Greineder, D.: Mediators of immunity: lymphokines and monokines. Adv. Immunol. *29*, 55–126 (1980).

20. Montesano, R., Orci, L., and Vassalli, P.: Human endothelial cell cultures: phenotypic modulation by leukocyte interleukins. J. Cell Physiol. *122*, 424–434 (1985).

21. Montesano, R., Mossaz, A., Ryser, J. E., Orci, L., and Vassalli, P.: Leukocyte interleukins induce cultured endothelial cells to produce a highly organized, glycosaminoglycan-rich pericellular matrix. J. Cell Biol. *99*, 1706–1715 (1984).

22. Ausprunk, D. H., Boudreau, C. L., and Nelson, D. A.: Proteoglycans in the microvasculature. II. Histochemical localization in proliferating capillaries of the rabbit cornea. Am. J. Pathol. *103*, 367–375 (1981).

23. Bissell, M. J., Hall, H. G., and Parry, G.: How does the extracellular matrix direct gene expression? J. Theor. Biol. *99*, 31–68 (1982).

LIST OF PUBLICATIONS

Dr. R. Montesano

Montesano R., Friend D.S., Perrelet A. and L. Orci: In vivo assembly of tight junctions in fetal rat liver. J. Cell Biol. *67*, 310–319 (1975).

Gabbiani G., Montesano R., Tschweber B., Salas M. and L. Orci: Phalloidin-induced hyperplasia of actin filaments in rat hepatocytes. Lab. Invest. *33*, 562–569 (1975).

Montesano R.: Junctions between sinusoidal endothelial cells in fetal rat liver. Am. J. Anat. *144*, 387–391 (1975).

Montesano R., Gabbiani G., Perrelet A. and L. Orci: In vivo induction of tight junctions proliferation in rat liver. J. Cell Biol. *68*, 793–798 (1976).

Blazquez E., Rubalcava S., Montesano R., Orci L. and R. Unger: Development of insulin and glucagon binding and the adenylate cyclase response in liver membranes of the prenatal, postnatal, and adult rat: evidence of glucagon "resistance". Endocrinology *98*, 1014–1023 (1976).

Montesano R., Gabbiani G., Friend D.S., Perrelet A. and L. Orci: In vivo modulation of tight junctions in the liver. *In:* The Liver, Quantitative Aspects of Structure and Function. 2nd Int. Gstaad Symp. Gstaad 1975 (R. Preisig, J. Bircher, G. Paumgartner Eds.) 1976, pp. 62–69.

Humbert F., Montesano R., Perrelet A. and L. Orci: Junctions in developing human and rat kidney: a freeze-fracture study. J. Ultrastr. Res. *56*, 202–214 (1976).

Humbert F., Montesano R., Grosso A., De Sousa R.C. and L. Orci: Particle aggregates in plasma and intracellular membranes of toad bladder (granular cell). Experientia *33*, 1364–1367 (1977).

Montesano R. and P. Nicolescu: Fenestrations in endothelium of rat liver sinusoids revisited by freeze-fracture. Anatomical Record *190*, 861–870 (1978).

Montesano R., Mira-Moser F., Stefan Y., Perrelet A. and L. Orci: Tight junctions in fetal rat liver explants grown in vitro. J. Ultrastr. Res. *64*, 182–190.

Montesano R.: Inhomogeneous distribution of filipin-sterol complexes in the smooth muscle cell plasma membrane. Nature *280*, 328–329 (1979).

Montesano R.: Inhomogeneous distribution of filipin-sterol complexes in the ciliary membrane of rat tracheal epithelium. Am. J. Anat. *156*, 139–145 (1979).

Montesano R., Perrelet A., Vassalli P. and L. Orci: Absence of filipin-sterol complexes from large coated pits on the surface of culture cells. Proc. Natl. Acad. Sci. *76*, 6391–6395 (1979).

Brown D. and R. Montesano: Membrane specialisation in the rat epididymis. I. Rod-shaped intramembrane particles in the apical ("mitochondria-rich") cell. J. Cell Science *45*, 187–198 (1980).

Orci L., Montesano R. and D. Brown: Heterogeneity of toad bladder granular cell luminal membranes: distribution of filipin-sterol complexes in freeze-fracture. Biochim. Biophys. Acta *601*, 443–452 (1980).

Montesano R., Vassalli P., Perrelet A. and L. Orci: Distribution of filipin-cholesterol complexes at sites of exocytosis. A freeze-fracture study of degranulating mast cells. Cell Biol. Int. Rep. *4*, 975–984 (1980).

Orci L., Miller R.G., Montesano R., Perrelet A., Amherdt M. and P. Vassalli: Opposite polarity of filipin-induced deformations in the membrane of condensing vacuoles and zymogen granules. Science *210*, 1019–1021 (1980).

Montesano R.: Intramembrane events accompanying junction formation in a liver cell line. Anat. Rec. *198*, 403–415 (1980).

Montesano R. and M.-M. Philippeaux: Membrane particle arrays in SV40-transformed 3T3 cells. J. Cell Sci. *47*, 311–330 (1981).

Orci L., Montesano R., Meda P., Malaisse-Lagae F., Brown D., Perrelet A. and P. Vassalli: Heterogeneous distribution of filipin-cholesterol complexes across the cisternae of the Golgi apparatus. Proc. Natl. Acad. Sci. *78*, 293–297 (1981).

Brown D., Montesano R. and L. Orci: Strech induces granule exocytosis in toad urinary bladder. Cell Biol. Int. Rep. *5*, 275–285 (1981).

Montesano R., Vassalli P. and L. Orci: Structural heterogeneity of endocytic membranes in macrophages as revealed by the cholesterol probe, filipin. J. Cell Sci. *51*, 95–107 (1981).

Orci L., Montesano R. and A. Perrelet: Exocytosis-endocytosis as seen with morphological probes of membrane organization. *In:* Methods in Cell Biology, Vol. *23*, Basic Mechanisms of Cellular Secretion. A.R. Hand and C. Oliver, Eds. Academic Press, New York, 1981, pp. 283–300.

Orci L., Amherdt M., Montesano R., Vassalli P. and A. Perrelet: Topology of morphologically detectable protein and cholesterol in membranes of polypeptide-secreting cells. *In:* The Control of Secretion. The Royal Society. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. *296*, 1981, pp. 47–54.

Brown D. and R. Montesano: Membrane specialization in the rat epididymis. II. The clear cell. Anat. Rec. *201*, 477–483 (1981).

Tartakoff A., Vassalli P. and R. Montesano: Plasma cell endocytosis: is it related to immunoglobulin secretion? Eur. J. Cell Biol. *26*, 188–197 (1981).

Montesano R., Didier P. and L. Orci: The ciliary junction: a unique membrane specialization in the ciliate, Glaucoma ferox. J. Ultrastr. Res. *77*, 360–365 (1981).

Montesano R., Roth J., Robert A. et L. Orci: Visualisation ultrastructurale de la liaison et de l'internalisation des toxines du choléra et du tétanos. C.R. Acad. Sci. *293*, 563–566 (1981).

Montesano R., Roth J., Robert A. et L. Orci: Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. Nature *296*, 651–653 (1982).

Brown D., Montesano R. and L. Orci: Patterns of filipin-sterol complex distribution in intact erythrocytes and intramembrane particle-aggregated ghost membranes. J. Histochem. Cytochem. *30*, 702–706 (1982).

Montesano R., Ravazzola M. and L. Orci: Filipin labelling of lipid droplets in lactating rat mammary gland. Cell Biol. Int. Rep. *7*, 194 (1983).

Montesano R., Mossaz A., Vassalli P. and L. Orci: Specialization of the macrophage plasma membrane at sites of interaction with opsonized erythrocytes. J. Cell Biol. *96*, 1227–1233 (1983).

Orci L., Perrelet A. and R. Montesano: Differential filipin-labelling of the luminal membranes lining the pancreatic acinus. J. Histochem. Cytochem. *31*, 952–955 (1983).

Montesano R., Mouron P., Amherdt M. and L. Orci: Collagen matrix promotes reorganization of pancreatic endocrine cell monolayers into islet-like organoids. J. Cell Biol. *97*, 935–939 (1983).

Montesano R., Orci L. and P. Vassalli: In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. J. Cell Biol. 97, 1648–1652 (1983).

Lombardi T. and R. Montesano: A simple method of preparing extracellular matrix substrata for cell culture. Cell Biol. Int. Rep. *8*, 635 (1984).

Montesano R., Mossaz A., Ryser J.-E., Orci L. and P. Vassalli: Leukocyte interleukins induce cultured endothelial cells to produce a highly organized, glycosaminoglycan-rich pericellular matrix. J. Cell Biol. *99*, 1706–1715 (1984).

Lombardi T., Montesano R., Wohlwend A., Amherdt M., Vassalli J.-D. and L. Orci: Evidence for polarization of plasma membrane domains in pancreatic endocrine cells. Nature *315*, 694–696 (1985).

Montesano R., Orci L. and P. Vassalli: Human endothelial cell cultures: phenotypic modulation by leukocyte interleukins. J. Cell Physiol. *122*, 424–434 (1985).

Wohlwend A., Montesano R., Vassalli J.-D. and L. Orci: LLC–PK_1 cysts: a model for the study of epithelial polarity. J. Cell Physiol. In press.

Montesano R. and L. Orci: Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis in vitro. Cell, *42*, 469, 1985.

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

Heft Nr. 1 (2. Auflage 1981):
Vorwort von Bundesrat Dr. Hans Hürlimann
Biographie von Professor Dr. Max Cloëtta
Biographie von Dr. Antoine 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»

Heft Nr. 7:
Preisverleihung 1979
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Dr. Theodor Koller:
«Die strukturelle Organisation des genetischen Apparates höherer Organismen»
Professor Dr. Jean-Pierre Kraehenbuehl:
«Hormonal Control of the Differentiation of the Mammary Gland»

Heft Nr. 8:
Preisverleihung 1980
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Dr. Edward W. Flückiger:
«Neuere Aspekte der Mutterkorn-Pharmakologie»
PD Dr. Albert Burger:
«Ein Vierteljahrhundert nach Entdeckung des aktivsten Schilddrüsenhormons (Trijodothyronin)»

Heft Nr. 9:
Preisverleihung 1981
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Dr. Rolf Zinkernagel:
«„Selbst"-Erkennung in der Immunologie»
Professor Dr. Peter A. Cerutti:
«A role for active oxygen species in human carcinogenesis?»

Heft Nr. 10:
Preisverleihung 1982
Festvorträge der beiden Preisträger
PD Dr. Jürgen Zapf:
«Wachstum und Wachstumsstörungen: ein gemeinsames Forschungsziel der klinischen und experimentellen Endokrinologie»
PD Dr. Jean-Michel Dayer:
«Le monocyte-macrophage: un pivot entre le système immun et le tissu conjonctif dans le processus inflammatoire de l'arthrite rhumatoïde»

Heft Nr. 11:
Preisverleihung 1983
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Dr. Peter Böhlen:
«Peptides and Proteins as messengers in the communication between cells and organs»
PD Dr. Claes B. Wollheim:
«Regulation of insulin release by intracellular calcium»

Heft Nr. 12:
Preisverleihung 1984
Festvorträge der beiden Preisträger
Frau Professor Dr. Heidi Diggelmann:
«Beitrag der Retroviren zur Aufklärung grundlegender biologischer Prozesse»
Professor Dr. Jean-François Borel:
«Entwicklung und Bedeutung des Ciclosporins»

EHRENTAFEL
DER PREISTRÄGER

1974	Dr. Urs A. Meyer
1975	PD Dr. Hans Bürgi
1976	Dr. Rui de Sousa
1977	Prof. Dr. Franz Oesch
1978	Dr. Susumu Tonegawa
1979	Prof. Dr. Theodor Koller Prof. Dr. Jean-Pierre Kraehenbuehl
1980	Prof. Dr. Edward W. Flückiger PD Dr. Albert Burger
1981	Prof. Dr. Rolf M. Zinkernagel Prof. Dr. Peter A. Cerutti
1982	PD Dr. Jürgen Zapf PD Dr. Jean-Michel Dayer
1983	Prof. Dr. Peter Böhlen PD Dr. Claes B. Wollheim
1984	Prof. Dr. Heidi Diggelmann Prof. Dr. Jean-François Borel
1985	Prof. Dr. Hans Thoenen Dr. Roberto Montesano