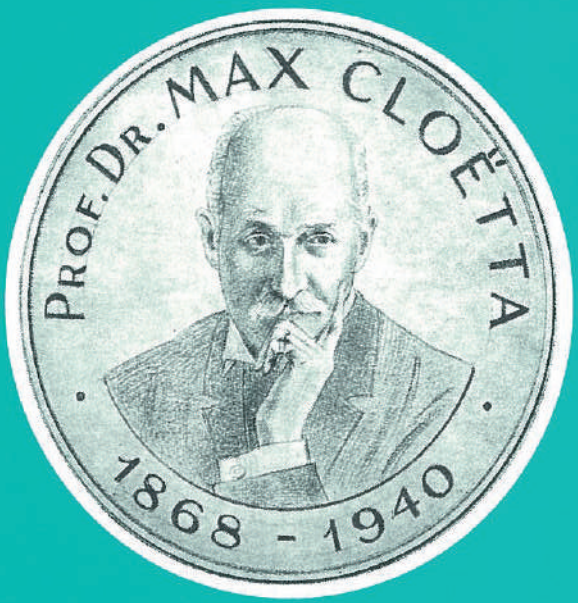



# Preisverleihung 1990

# STIFTUNG PROFESSOR DR. MAX CLOËTTA

Heft Nr. 18

Herr Professor Dr. Martin E. Schwab
«Entwicklung, Stabilisierung und Regeneration
von Faserverbindungen in Gehirn und Rückenmark:
Die Rolle von Nervenwachstums-Hemmstoffen»

Herr Professor Dr. Denis Monard
«Protéases et inhibiteurs extracellulaires
dans le système nerveux»

# STIFTUNG
# PROFESSOR DR. MAX CLOËTTA

## *Siebzehnte Preisverleihung*

19. November 1990
Zürich

Heft Nr. 18 der Schriftenreihe
Stiftung Professor Dr. Max Cloëtta
Kurhausstrasse 28, 8032 Zürich

# INHALT


Vorwort des Stiftungsrats 5

Laudatio von Herrn Professor Dr. Michel Cuénod auf den ersten Preisträger Herrn Professor Dr. Martin E. Schwab 7

Urkunde für Herrn Professor Dr. Martin E. Schwab 11

Kurzbiographie von Herrn Professor Dr. Martin E. Schwab 13

Festvortrag von Herrn Professor Dr. Martin E. Schwab über das Thema: «Entwicklung, Stabilisierung und Regeneration von Faserverbindungen in Gehirn und Rückenmark: Die Rolle von Nervenwachstums-Hemmstoffen» 15

Laudatio von Herrn Professor Dr. Max M. Burger auf den zweiten Preisträger Herrn Professor Dr. Denis Monard 39

Urkunde für Herrn Professor Dr. Denis Monard 43

Kurzbiographie von Herrn Professor Dr. Denis Monard 45

Festvortrag von Herrn Professor Dr. Denis Monard über das Thema: «Protéases et inhibiteurs extracellulaires dans le système nerveux» 47

Übersicht über die bisher erschienenen Publikationen der Schriftenreihe Stiftung Professor Dr. Max Cloëtta 64

Ehrentafel der Preisträger

# VORWORT

Die Stiftung Professor Dr. Max Cloëtta ist 1973 mit dem Ziel gegründet worden, die medizinische Forschung und diejenige ihrer Hilfswissenschaften zu fördern. Während der Gründer Dr. Antoine Cloëtta dabei zunächst an die Finanzierung von Forschungsprojekten in Zusammenarbeit mit Hochschulen und pharmazeutischen Unternehmen dachte, hat sich seither die Sicherung des universitären Nachwuchses als besonders wichtiges Problem gestellt. Im Zuge des Ausbaus unserer Universitäten und Kliniken reichen die öffentlichen Mittel hiefür nicht mehr aus.

Unsere Stiftung hat deshalb in den letzten Jahren die Unterstützung von jungen Forschern zu ihrer Hauptaufgabe gemacht, um ihnen eine akademische Tätigkeit an einer unserer Hochschulen und die spätere Übernahme eines Lehrstuhles zu ermöglichen. In dieser Absicht hat sie 1989 elf Forscher unterstützt und dafür rund 1,2 Mio. Franken zur Verfügung gestellt.

Wie bereits im letztjährigen Bericht angedeutet, haben einige schweizerische Universitäten die Initiative ergriffen, Medizinern ein Zweitstudium naturwissenschaftlicher Richtung zu ermöglichen. Damit soll der immer enger werdenden Verflechtung der Medizin mit den naturwissenschaftlichen Disziplinen Rechnung getragen werden. Unsere Stiftung hat sich grundsätzlich bereit erklärt, diese Initiative zu unterstützen, wenn möglich in Zusammenarbeit mit andern Institutionen und Stiftungen.

Der Stiftungsrat gratuliert den diesjährigen Preisträgern der Stiftung Professor Dr. Max Cloëtta, den Herren Prof. Dr. Martin E. Schwab und Prof. Dr. Denis Monard. Beide haben auf dem Gebiete der Regulierung der Zellentwicklung durchbrechende Resultate erzielt: der erstere hat einen Wachstumshemmer, der letztere einen Wachstumsfaktor isoliert. Diese Entwicklungen können für die weitere Forschung, wie aus den Würdigungen der Herren Professoren Dr. Michel Cuénod und Dr. Max M. Burger hervorgeht, von grundlegender Bedeutung sein.

Für die breite Unterstützung, die unsere Stiftung bei den medizinischen Fakultäten unserer Universitäten und andern Instituten bei

der Erfüllung ihrer Aufgaben gefunden hat, möchte der Stiftungsrat allen Freunden und Helfern seinen besten Dank aussprechen. Dieser Dank geht auch an die Angehörigen des Sekretariats, ohne deren Einsatz die Bewältigung des nicht unbeträchlichen Arbeitsanfalls nicht gegeben gewesen wäre.

Der Stiftungsrat

# LAUDATIO AUF PROFESSOR DR. MARTIN SCHWAB

*Professor Dr. Michel Cuénod*

Wir sind heute zusammengekommen, um zu feiern und um uns zu freuen, weil Martin Schwab und seinem Forschungsteam ein Durchbruch gelungen ist, der Hoffnung für alle bringt, deren Gehirn oder Rückenmark nach einer Läsion regenerieren sollte.
Seit Jahrhunderten weiss man, dass ein peripherer Nerv, der durchgeschnitten wurde, so zusammenwächst, dass er wieder funktionieren kann. Nach der Durchschneidung eines Nervenbündels im Gehirn oder im Rückenmark aber findet keine Regeneration mehr statt: Dem Patienten droht für den Rest seines Lebens eine Lähmung, die ihn zum Paraplegiker macht. Martin Schwab ist den grundlegenden Zellmechanismen nachgegangen, die dieses Phänomen erklären, so dass sie therapeutisch beeinflusst werden können. Dieser Durchbruch in der Neurobiologie, der möglicherweise der Klinik dienen wird, ist ein Erfolg, der viel Aufmerksamkeit für die Schweizer Neurowissenschaft bringen wird.
Die Neurowissenschaft – Neuroscience – ist heute eine anerkannte Disziplin in der Familie der Naturwissenschaften. Ihr Ziel ist es, die Struktur und Funktion des Nervensystems von Tieren und Menschen integrativ zu verstehen und eine Grundlage zu schaffen, um den neurologischen und psychiatrischen Patienten zu helfen oder sie gar zu heilen. Die Neurowissenschaft deckt ein sehr grosses Gebiet ab: Es erstreckt sich von den Molekülen und Zellen bis zu komplexen Systemen. Die Neuroscience umfasst die Molekularneurobiologie, die Biophysik, die Entwicklungsneurobiologie, die Neurochemie, die Neuroanatomie, die Neurophysiologie, die Verhaltensforschung und die Neuroinformatik, um nur die wichtigsten zu erwähnen. Die Neurologie, die in der Forschung lange von der Neurophysiologie und der Neuroanatomie dominiert wurde, wird in der Zukunft mehr und mehr von der Entwicklung der Neurobiologie, der Zellbiologie und der Immunologie profitieren können.

Die Universität Zürich hat eine lange Tradition auf diesem Gebiet: Forel, von Monakov, Minkovski, W. R. Hess sind Pioniere gewesen. Konrad Akert hat vor dreissig Jahren die Weitsicht gehabt, das erste Hirnforschungsinstitut in Europa und das einzige in der Schweiz zu gründen, das Institut, in dem Martin Schwab seit ein paar Jahren seine Projekte entwickelt.

Was braucht es, um ein erfolgreicher Forscher zu sein? Neben dem menschlichen Verstand eine gute Ausbildung, mindestens einen beispielhaften Lehrer, hohe Kenntnisse auf dem eigenen Gebiet und eine Neugier für Nachbargebiete, eine Begabung für die oft komplizierten Techniken, geeignete Arbeitsbedingungen und eine stimulierende wissenschaftliche Umgebung, die nötige finanzielle Unterstützung, die Führungskraft, um eine Gruppe zu leiten, Hartnäckigkeit, Disziplin, den Sinn, sogar das Flair für das Wichtige, Originelle und Machbare und, last but not least, eine Spur Glück.

Lieber Martin, ich glaube sagen zu dürfen, dass Du diese merkwürdige Mischung auf Dich konzentriert hast. 1949 geboren, hat Martin Schwab eine glänzende Karriere gemacht. In Basel hat er Biologie studiert, 1973 in der Zoologie doktoriert und sich 1978 im Biozentrum habilitiert. Dort hat er in Professor Hans Thoenen einen Lehrer gefunden, der ihn langfristig inspiriert hat. 1978–79 finden wir ihn in Boston, im Department of Neurobiology, Harvard Medical School. Dann folgt er Hans Thoenen nach München, wo er während sechs sehr fruchtbaren Jahren als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Neurochemie des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie tätig ist. 1985 wird er als Extraordinarius am Institut für Hirnforschung der Universität Zürich gewählt, wo er die Abteilung Morphologie leitet und wo er die Arbeiten geleistet hat, die ihm diesen Preis gebracht haben.

Martin Schwab interessiert sich für die funktionelle Biologie der Nervenzelle, für ihre Entwicklung und ihre Regeneration nach einer Läsion. Besonders hat er früher Faktoren studiert, die von den Nervenendigungen bis zum Zellkörper transportiert werden und die den funktionellen Zustand der Nervenzellen kontrollieren. Er hat es geschafft, die Konzepte und die Methodologien der Zellbiologie, der Biochemie, der Morphologie und neulich der Molekularbiologie innerhalb seines spezifischen Gebietes zusammenzubringen.

Obwohl Herrn Schwabs Arbeiten schon 1979 mit dem Bing-Preis der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaft honoriert wurden, ist es das Verdienst der Stiftung Professor Dr. Max Cloëtta, ihm als erste für seine jetzige Leistung einen schönen Preis zu verleihen. Wir freuen uns darüber, und ich gehe wohl nicht zu weit, wenn ich voraussage, dass weitere Ehrungen folgen werden. Wir möchten Dir, lieber Martin, zum Cloëtta-Preis gratulieren, wünschen Dir weiterhin viel Erfolg bei der Verfolgung Deiner Forschungsziele und hoffen, dass Du am Ende Deiner Karriere sowohl auf die wissenschaftliche als auch auf die menschliche Komponente Deiner ganzen Tätigkeit mit Zufriedenheit zurückblicken kannst.

DER CLOËTTA-PREIS 1990
WIRD

HERRN PROFESSOR DR. PHIL. II

# MARTIN E. SCHWAB

GEBOREN 1949 IN BASEL
PROFESSOR AM INSTITUT FÜR HIRNFORSCHUNG
DER UNIVERSITÄT ZÜRICH
IN ANERKENNUNG SEINER AUSSERORDENTLICHEN ARBEITEN
AUF DEM GEBIET DER ENTWICKLUNG UND
REGENERATION DES NERVENSYSTEMS
VERLIEHEN.

ZÜRICH, 19. NOVEMBER 1990

FÜR DEN STIFTUNGSRAT:

DER VIZEPRÄSIDENT: EIN MITGLIED:

EIN MITGLIED:

Professor Dr. Martin E. Schwab

## CURRICULUM VITAE

| | |
|---|---|
| Name: | Schwab, Martin E. |
| Born: | April 11, 1949, in Basle, Switzerland |
| Married since: | 1972 to Ruth Schwab-Handschin, artist, from Basle |
| Nationality: | Swiss |
| Education: | Diploma in Zoology (with Botany and Chemistry), University of Basle, 1972<br>Ph. D., University of Basle, 1973<br>Habilitation, Privatdozent, University of Basle, 1978 |

*Research and Professional Experience:*

Graduate Assistant, Dept. of Zoology, University of Basle
Febr. 1972–Dec. 1973
Research Associated, Dept. of Pharmacology (Prof. H. Thoenen), Biocenter of the University of Basle, Switzerland
Jan. 1974–Sept 1978
Research Fellow, Dept. of Neurobiology, Harvard Medical School, Boston, Mass., USA
Oct. 1978–Nov. 1979
Assistant Professor, Dept. of Neurochemistry, Max Planck Institute for Psychiatry, Martinsried/Munich, FRG
Dec. 1979–April 1985
Full Professor, Head of Dept. of Morphology, Brain Research Institute, University of Zurich, Switzerland
April 1985–present

*Honors:*

Robert Bing Price of the Swiss Academy of Medical Sciences, 1979 (together with Dr. P. Streit)

*Research Support:*

Swiss National Foundation of Scientific Research
European Training Programme in Brain and Behaviour Research

Sandoz Foundation for the Advancement of Medical Research
Swiss National Foundation for Scientific Research, Fellowship

*Present:*

Swiss National Science Foundation
Swiss Multiple Sclerosis Society
Regeneron Pharmaceuticals, Tarrytown, N.Y.
American Paralysis Association, Springfield, N.J.

# ENTWICKLUNG, STABILISIERUNG UND REGENERATION VON FASERVERBINDUNGEN IN GEHIRN UND RÜCKENMARK: DIE ROLLE VON NERVENWACHSTUMS-HEMMSTOFFEN

*Martin E. Schwab,*
*Institut für Hirnforschung der Universität Zürich,*
*August-Forel-Strasse 1, 8029 Zürich*

Die enorm komplexen Faserverbindungen des Nervensystems entstehen alle während einer relativ kurzen Zeitspanne der Individualentwicklung. Zwar können Verknüpfungspunkte (Synapsen) und kürzere Nervenfaserzweige noch über lange Zeit, zum Teil sogar lebenslang, neu gebildet und umgewandelt werden, aber alle grossen und langen Faserzüge und Verbindungen in Gehirn, Rükkenmark und peripheren Nerven entstehen ausschliesslich während der Fötalperiode und einer kurzen Zeit nach der Geburt. Die gesamte Funktion des Nervensystems ist abhängig von den Verbindungen der einzelnen Nervenzentren und ihrer Nervenzellen. Der Aufbau dieses «Verschaltungsplans» ist deshalb einer der wichtigsten Schritte in der Entwicklung des Nervensystems. Die Frage nach den Mechanismen und Prinzipien der Entstehung dieser Faserverbindungen ist deshalb von grundlegender Bedeutung und steht im Zentrum des Interesses der Entwicklungs-Neurobiologie.
Wie die Entstehung des gesamten Organismus wird auch die Entstehung des Nervensystems durch die vorhandene genetische Information gesteuert. Da dem Menschen nur etwa 30000 Gene zur Verfügung stehen, im Nervensystem aber etwa $10^{12}$ Nervenzellen vorhanden sind, ist es völlig undenkbar, dass jede einzelne Zelle des Nervensystems in ihrer Entwicklung durch ein spezifisches Gen kontrolliert wird. Man suchte deshalb nach Mechanismen, durch welche grosse Populationen von Nervenzellen und Nervenfasern geleitet und spezifiziert werden können. Eine grundlegende Eigenschaft der Nervensystem-Entwicklung ist die intensive Kommunikation von Nervenzellen mit ihrer Umgebung, das heisst mit anderen Nervenzellen, peripheren Organen, die sie innervieren, und den

Hüllzellen (Glia-Zellen) des Nervensystems. Nervenzellen sind also keine «Eremiten», sondern höchst «soziale Wesen», die auf ständigen Informationsaustausch mit ihrer näheren und weiteren Umgebung angewiesen sind. Die «akute» Funktion des Nervensystems, die schnelle Verarbeitung äusserer und innerer Signale, besteht in einem Austausch elektrischer und chemischer Signale zwischen den Nervenzellen. Die involvierten chemischen Stoffe, die Neutrotransmittoren, sind meist kleine Moleküle wie Azetylcholin, Dopamin, Noradrenalin, spezifische Aminosäuren oder kleine Peptide. Zusätzlich zu diesem, die aktuelle Funktion tragenden Signalsystem existieren andere «Sprachen», durch die die Nervenzellen, insbesondere während der Entwicklung, kommunizieren. Die neueren zellbiologischen und neurobiologischen Forschungen haben zwei hauptsächliche Signalsysteme aufgezeigt: – Lösliche Proteine, die von gewissen Zellen produziert und in den Extrazellulärraum freigesetzt werden und spezifische Signale an Nachbarzellen vermitteln. Solche Moleküle werden als neurotrophe Faktoren, chemotaktische Faktoren und Differenzierungs-Faktoren bezeichnet. – Ein zweiter Weg der Zell-Zell-Kommunikation basiert auf der direkten Interaktion von Zellmembranen oder Interaktionen mit der extrazellulären Matrix. Diese Interaktionen sind bestimmend für die direkten Nachbarschaftsbeziehungen von Zellen, und insbesondere für das Auswachsen der Nervenfasern und die Bildung der grossen Faserzüge und Nerven. Biochemisch werden sie von membran-gebundenen oder matrix-gebundenen Proteinen und Proteinkomplexen vermittelt. Zell-Adhäsion, wahrscheinlich auch Zell-Erkennung, und Förderung und Ausrichtung des Nervenfaserwachstums sind die mit dieser Zell-Zell-Interaktion verbundenen Vorgänge. In neuester Zeit konnte nun ein weiterer regulatorischer Mechanismus der Zell-Zell-Interaktion gefunden werden: die *Hemmungsstoffe* des Nervenfaserwachstums.

*Regeneration des Nervenfaserwachstums als experimentelles System*

Da Vorgänge während der Embryonalphase insbesondere bei Säugetieren nur sehr schwer studiert werden können, wird oft die Ner-

venfaser-Regeneration, die in entscheidenden Punkten eine Wiederholung der Entwicklung ist, als Modell herangezogen (in vitro und in vivo). Allerdings ist nun seit sehr langer Zeit aus klinischen Befunden bekannt, dass ein grundlegender Unterschied besteht zwischen peripherem Nervensystem (Nerven überall im Körper und zugehörige Ganglien) und Zentralnervensystem (ZNS: Gehirn und Rückenmark) in bezug auf das Nachwachsen verletzter Nervenfasern. Während in peripheren Nerven ein Nachwachsen verletzter Fasern über lange Distanzen möglich ist, beobachtet man im ZNS eine zweiphasige Reaktion der verletzten Faserbahnen: – 1. Während der vom Zellkörper abgetrennte Teil der Nervenfaser degeneriert, bilden sich am amputierten Faserende rasch Wachstumsspitzen und neue Seitenzweige aus, die eine regenerative Sprossung einleiten. – 2. Diese Sprossung geht nun aber, anders als in peripheren Nerven, nicht in eine länger dauernde Wachstumsphase über, sondern stoppt nach 0,5–1 mm.

Schon kurz nach der Jahrhundertwende wurde in Tierexperimenten bewiesen, dass Nervenzellen des ZNS durchaus die Fähigkeit zur Langstrecken-Regeneration haben, sofern ihre Fasern in Transplantate peripherer Nervenstücke einwachsen können (1–4). Es ist also die *Mikroumgebung* der regenerierenden Fasern, die entscheidet, ob Langstrecken-Regeneration auftritt oder nicht. Diese Befunde wurden damals und bis noch vor kurzem als ein Mangel an neurotrophen Faktoren im ZNS gedeutet (2). In letzter Zeit mehrten sich allerdings die Befunde, dass eine Mehrzahl neurotropher Faktoren im ZNS vorhanden ist und sogar nach Läsion vermehrt gebildet werden (5–7). Erste eigene Experimente in Organkulturen zeigten, dass optimale Stimulation regenerierender Nervenzellen durch neurotrophe Faktoren keinerlei Einwachsen in zentralnervöses Gewebe bewirken konnte (8). Wir haben deshalb eine non-permissive oder inhibitorische Substratwirkung bestimmter Komponenten des ZNS-Gewebes auf die auswachsenden Nervenfasern postuliert. In nachfolgenden zellbiologischen und biochemischen Studien wurde diese Hypothese näher überprüft.

*ZNS-Myelin und Oligodendrozyten enthalten Inhibitoren des Nervenfaserwachstums*

Um die einzelnen Komponenten des ZNS-Gewebes in bezug auf ihre Interaktion mit wachsenden Nervenfasern zu prüfen, wurden Hüllzellen des ZNS dissoziiert, als Einzelzellen kultiviert und in ihrer Interaktion mit wachsenden Nervenfasern beobachtet (9). Es zeigte sich, dass die zwei Hauptklassen von Gliazellen des ZNS auf völlig unterschiedliche Weise mit Nervenfasern interagieren: Astrozyten, die im Gehirn Zellkörper und Nervenfortsätze dicht umgeben und mannigfache Funktionen ausüben, sind in Zellkultur bevorzugte Substrate für wachsende Nervenfasern. Durch eine Reihe von Zelladhäsions-Molekülen, die durch diese Zellen synthetisiert und in mehreren Labors eingehend untersucht werden, finden Wachstumsspitzen von Nervenfasern die Astrozyten attraktiv und zeigen ein schnelles und effizientes Wachstum auf diesen Zellen (z. B. 10). Ein völlig anderes Bild ergab sich bei der zweiten Hauptklasse der Gliazellen, den Oligodendrozyten. Oligodendrozyten umwickeln in vivo die Nervenfasern der grossen Faserstränge in Gehirn und Rückenmark mit ihren Membranen und bilden dadurch eine elektrische Isolationsschicht, das Myelin. In Kultur wurden Wachstumsspitzen, die Oligodendrozyten berührten, innerhalb von Minuten in ihrer Bewegung gehemmt und stellten das Wachstum ein (Fig. 1) (9, 11). Diese starke Hemmwirkung führte in den Langzeitkulturen zu «Fenstern» im sich formenden Nervenfaser-Netzwerk durch diese Oligodendrozyten (9). Im Gewebeverband scheint diese Hemmwirkung der Oligodendrozyten über die positiven Wirkungen der Astrozyten zu dominieren. Ausführliche anschliessende biochemische Studien führten uns schliesslich zum Resultat, dass zwei Membranproteine (Molekulargewicht 35 000 D und 250 000 D nach Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen) für diese Wirkung der Oligodendrozyten verantwortlich sind (Fig. 2) (12). Diese Wachstumsinhibitoren liegen in nativem Zustand als hochmolekularer Proteinkomplex vor. Die beiden Komponenten NI-35 und NI-250 sind immunologisch verwandt, die Aufklärung der molekularen Beziehungen steht aber noch aus. Diese zwei Moleküle sind die ersten charakterisierten Inhibitoren des Nervenfaserwachstums.

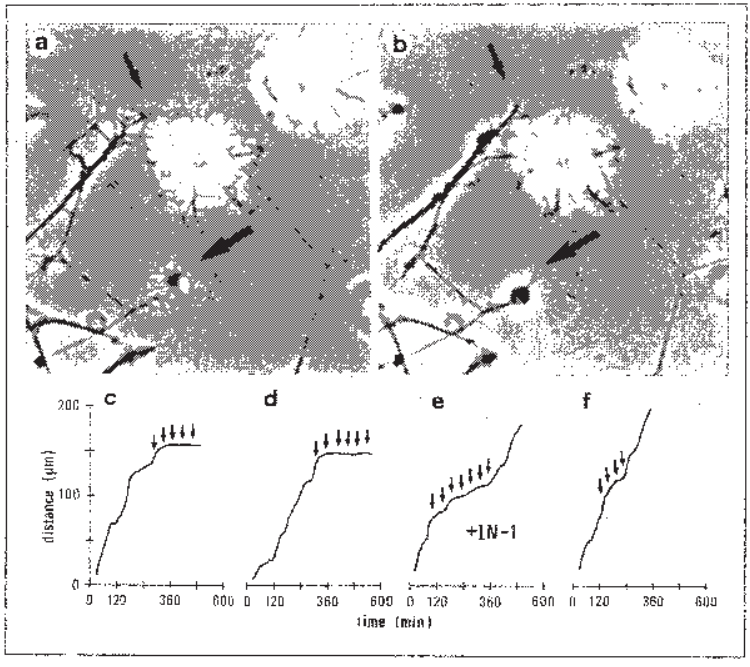



*Fig. 1* Interaktion von wachsenden Nervenfasern von Spinalganglienzellen mit Oligodendrozyten in Zellkultur. – a) Die grossflächigen, mit vielen Filopodien versehenen Wachstumsspitzen von Nervenfasern (Pfeile) kontaktieren mit ihren Filopodien einen Oligodendrozyten und dessen Fortsätze. – b) 60 Min. später sind die Wachstumsspitzen der Fasern geschrumpft, und viele Filopodien sind zurückgebildet. Das Wachstum der Nervenfasern stoppt vollständig. – c, d) Wachstum (in Millimetern) von Nervenfasern und Wachstumsstopp nach Kontakt mit Oligodendrozyten (Pfeile). – e) In Anwesenheit des die Nervenwachstumsinhibitoren neutralisierenden Antikörpers IN-1 findet höchstens eine Verlangsamung, aber kein Wachstumsstopp statt (Pfeile: Kontakt der Nervenfaserspitze mit Oligodendrozyt). – f) Kontaktiert eine Nervenfaser Astrozyten (Pfeile), läuft ihr Wachstum kontinuierlich weiter.
Vergrösserung: 600mal

In verschiedenen Arbeitsgruppen sind kürzlich Evidenzen für andere repulsive oder inhibitorische Komponenten gefunden worden (13–16). Möglicherweise existieren Familien von Inhibitormolekülen, analog zu den bekannten Familien der Adhäsionsmoleküle. Die molekulare Charakterisierung ist zur Zeit für mehrere dieser Komponenten auf dem Weg und wird auch die Werkzeuge lie-

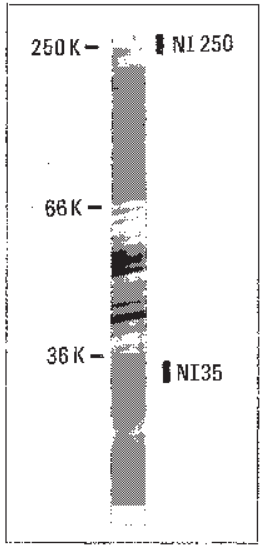



*Fig. 2* Auftrennung der Myelinproteine aus dem Rattenrückenmark nach ihrem Molekulargewicht durch SDS-PAGE. Nur die Molekulargewichtsfraktionen von 35 kD und 250 kD enthalten inhibitorische Aktivität. Die grosse Mehrheit der Myelinproteine ist nicht inhibitorisch (Gel von Dr. J. Kapfhammer).

fern (cDNAs, Antikörper), um das Expressionsmuster während der Entwicklung und im adulten Nervensystem zu studieren und so Hinweise auf die Funktionen dieser, das Nervenfaserwachstum negativ beeinflussenden Komponenten zu gewinnen.

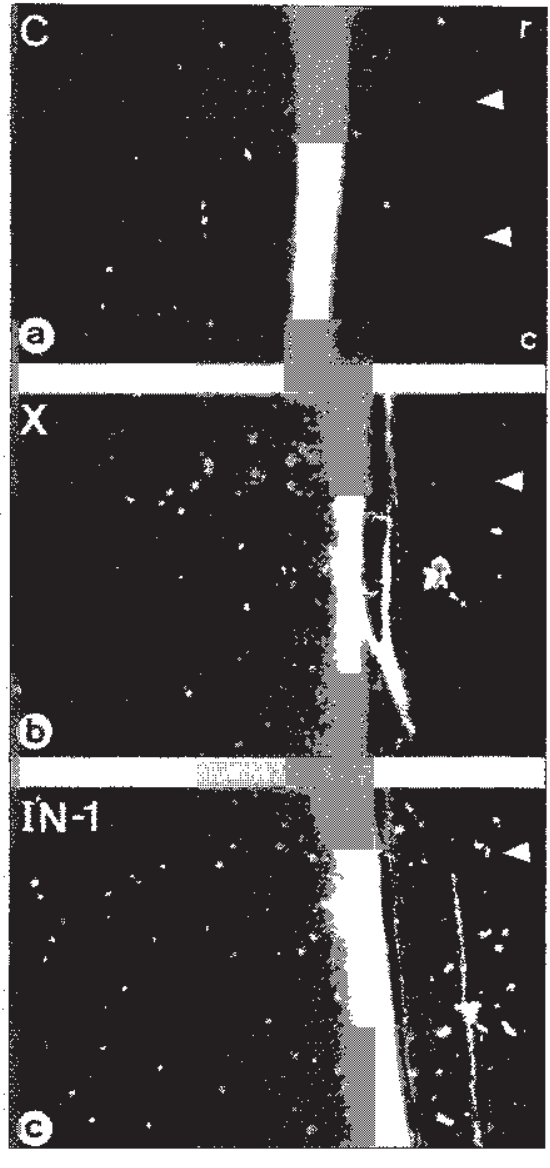
### *Antikörper können die Wirkung von Nervenfaserwachstums-Inhibitoren neutralisieren*

Die partiell gereinigten Inhibitoren NI-35 und NI-250 wurden zur Immunisierung verwendet, und es konnten Antiseren und monoklonale Antikörper erzeugt werden, die die Hemmaktivität beider Inhibitoren sowie des gesamten ZNS-Myelins aufheben (17). In Anwesenheit dieser Antikörper (z. B. des Antikörpers IN-1) stellen wachsende Nervenfasern nach dem Kontakt mit Oligodendrozytenzellen in Kultur ihr Wachstum nicht ein, sondern überqueren die Oligodendrozyten (Fig. 1) (17, 11, 18). Explantate von ZNS-Gewebe (z. B. optischer Nerv), die mit solchen Antikörpern inji-

ziert wurden, stellen nun ein permissives Substrat für kultivierte Nervenfasern dar: Während in Anwesenheit von Kontroll-Antikörpern keine Nervenfasern tiefer als 1 mm in solche Explantate einwuchsen, konnten in Anwesenheit des Antikörpers IN-1 Hunderte von Fasern über mehrere Millimeter in das zentrale Gewebe einwachsen (17). Diese Antikörper stellten deshalb ein ideales Werkzeug zur Überprüfung der möglichen In-vivo-Funktionen dieser Nervenwachstums-Inhibitoren dar.

*Nervenwachstums-Inhibitoren erscheinen spät in der ZNS-Entwicklung und können spät wachsende Faserzüge kanalisieren*

Die Differenzierung von Oligodendrozyten und die Bildung des Myelins erfolgt erst im letzten Drittel der ZNS-Entwicklung. In den einzelnen Faserzügen wird Myelin erst nach dem Abschluss des Nervenfaserwachstums gebildet. Allerdings reifen die verschiedenen Faserzüge in den einzelnen Hirn- und Rückenmarks-Regionen zu sehr unterschiedlichen Zeiten (z. B. 19). Es kommt daher zu einer zeitlich gestaffelten Expression der Nervenfaserwachstums-Inhibitoren in den unterschiedlichen Faserzügen und Regionen (20). Aus dieser Beobachtung entstand die Hypothese, dass diese Inhibitoren Grenzflächen aufbauen und das Nervenfaserwachstum stufenweise einschränken oder kanalisieren könnten. Tatsächlich haben wir im Rückenmark im Falle des Corticospinaltrakts Evidenzen für eine solche kanalisierende Funktion von NI-35/NI-250 gefunden (21). Die Verbindungen des Grosshirncortex zu den tiefer liegenden Zentren in Hirnstamm und Rückenmark laufen über einen grossen, spät entstehenden Faserzug, die Pyramidenbahn, die im Rückenmark Corticospinaltrakt (CST) genannt wird. Bei der Ratte wächst der CST bei Geburt ins Rückenmark ein und beendet sein Wachstum am postnatal Tag 10 (21). Die Bahn wächst in unmittelbarer Nachbarschaft zweier aufsteigender sensorischer Bahnen (Fasciculus cuneatus und Fasciculus gracilis) in den dorsalen Kolonnen des Rückenmarks. Zum Zeitpunkt der Geburt hat die Myelinisierung in diesen sensorischen Bahnen schon eingesetzt, und es lässt sich eine relativ scharfe Grenze, die durch Myelin markiert ist und sehr wahr-


C
r
c
a
X
b
IN-1
c

scheinlich auch NI-35/250 enthält, zwischen sensorischen Bahnen und CST beobachten. Zwei experimentelle Verfahren wurden nun eingesetzt, um die Myelinisierung im Rückenmark zu verhindern respektive die Nervenwachstums-Inhibitoren zu neutralisieren (21). Röntgenbestrahlung des Rückenmarks von neugeborenen Ratten führt zu einem selektiven Verlust der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und zu einem Ausbleiben der Myelinbildung. In Übereinstimmung mit der Abwesenheit von Myelin konnten auch die Inhibitoren NI-35/250 in diesem bestrahlten Gewebe nicht nachgewiesen werden. Als Alternative zu diesem Verfahren wurden normalen Tieren lokale Quellen des Antikörpers IN-1 implantiert. Die Myelinbildung wird dadurch nicht gestört, aber die Antikörper neutralisieren die Hemmwirkung von NI-35/250. In beiden Typen von Experimenten wurden sehr ähnliche Resultate erzielt: Die Ausbildung des CST wurde merklich gestört, insbesondere durch ein unpräzises Wachstum der CST-Fasern. Häufig konnten Fasern beobachtet werden, die in die sensorischen Bahnen einwuchsen (Fig. 3). Die normalerweise vorhandene scharfe Grenze zwischen den aufsteigenden sensorischen Bahnen und dem absteigenden CST ist unter diesen experimentellen Bedingungen unscharf und verwischt. Diese Daten zeigen deshalb, dass diesen zwei Wachstums-Inhibitoren eine wichtige Rolle als Leit-Moleküle (im Sinne von «Leitplanken») für diesen Faserzug zukommt. Diese ersten Hinweise auf die physiologische Bedeutung dieser Wachstums-Inhibitoren während der ZNS-Entwicklung werden nun in anderen Teilen des ZNS weiter untersucht.

Nervenfasern zeigen auch im normalen erwachsenen ZNS Wachstums-Phänomene, die zwar gering sind und vor allem sehr lokal (Distanzen unter 1 mm) bleiben. Diese Neubildung von axonalen

*Fig. 3* Dunkelfeldaufnahmen von Längsschnitten des Rückenmarks mit markiertem Corticospinaltrakt. – a) Normale 10tägige Ratte; der CST bildet ein kompaktes «Kabel» von etwa 100000 Axonen. – b) 10tägige Ratte ohne Myelin und Oligodendrozyten. Bündel von Fasern des CST weichen von ihrem Weg ab und wachsen in die aufsteigenden sensorischen Bahnen. – c) Rückenmark eines mit IN-1-Antikörpern behandelten Tieres. Die Inaktivierung der Nervenwachstumsinhibitoren führt ebenfalls zu abweichendem Faserwachstum des CST. – Pfeilspitzen: dorsale Oberfläche des Rückenmarks; r: rostral; c: caudal.
Vergrösserung: 50mal

und dendritischen Zweigen und Synapsen ist wahrscheinlich für die Adaptationsfähigkeit und Plastizität des Nervensystems von grösster Bedeutung. Es wäre denkbar, dass die beschriebenen Wachstums-Inhibitoren im erwachsenen ZNS die Zweigbildung und das Wachstum an unerwünschten Orten (z. B. in den grossen Faserzügen) aktiv verhindern und so die Bildung von Fehlverschaltungen und chaotischem Wachstum blockieren. Experimentelle Evidenz für eine solche Hypothese liegt zur Zeit allerdings noch keine vor.

*Nervenfaser-Regeneration im verletzten ZNS: die Rolle der Nervenwachstums-Inhibitoren*

Die Frage nach dem fehlenden Regenerationsvermögen verletzter Faserbahnen im adulten ZNS stand am Ausgangspunkt unserer Untersuchungen. Es war deshalb von grosser Bedeutung, die Rolle der Inhibitoren NI-35 und NI-250 für die Nervenfaser-Regeneration zu überprüfen. Wiederum wurden die zwei oben beschriebenen experimentellen Verfahren angewandt: Erzeugung von Myelin-freiem ZNS-Gewebe (Rückenmark) durch Bestrahlung von neugeborenen Ratten (22) oder Implantation einer Quelle des neutralisierenden Antikörpers IN-1 (23). In beiden Fällen wurde das Regenerationsvermögen des Corticospinaltrakts (CST) in 2–6 Wochen alten Ratten untersucht. Dabei wurde das Rückenmark im oberen Thorakalbereich beidseitig so durchgeschnitten, dass nur die ventralen Bahnen, die einen Teil der motorischen Koordination vermitteln, intakt gelassen wurden. Der im dorsalen Funikel laufende CST wurde vollständig durchtrennt. 2–4 Wochen nach der Operation wurde der CST durch einen anterograden neuroanatomischen Tracer (Weizenkeim-Agglutinin gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase, WGA-HRP) markiert und histochemisch dargestellt. In unbehandelten Kontrolltieren sowie in Tieren, die mit einem Kontroll-Antikörper behandelt wurden, ergab sich ein identisches, aus vielen früheren Untersuchungen bekanntes Bild: Die CST-Axone bilden rostral von der Läsion eine Sprossungszone aus, und einigen Fasern gelingt es, um die Läsion herumzuwachsen. Dieses Wachstum stoppt allerdings innerhalb von 0,1–1 mm caudal von der Läsion (Fig. 4c). Wie

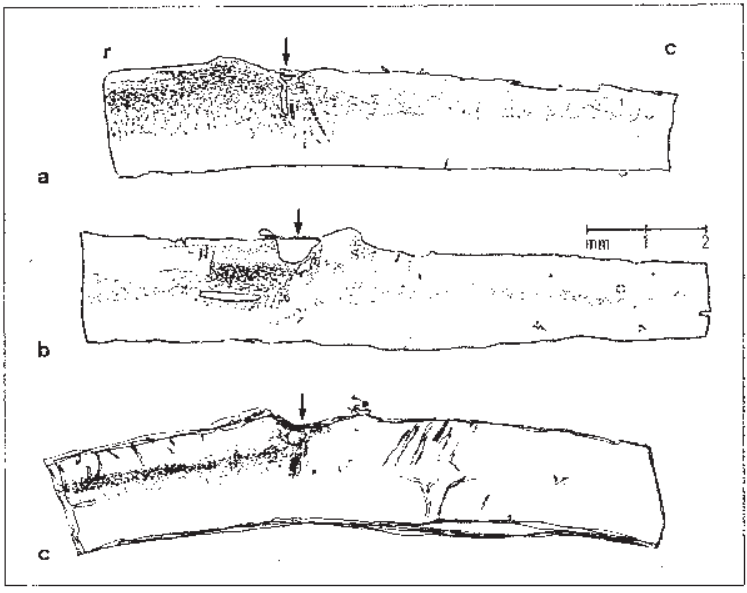



*Fig. 4* Rekonstruktionen von Längsschnitten durch das Rückenmark von Ratten, 2–3 Wochen nach einer partiellen Durchschneidung (Pfeil). Der von rostral (r) kommende Corticospinaltrakt ist durch die Läsion vollkommen unterbrochen. – a, b) Mit Antikörpern IN-1 behandelte Tiere. Einzelne regenerierende CST-Fasern (feine Punkte rechts von der Läsion) können bis zum Schnittende in caudaler Richtung verfolgt werden. – c) Tier, das mit einem Kontrollantikörper behandelt wurde. Die CST-Fasern sprossen an der Läsionsstelle, bleiben aber auf diese beschränkt.
Vergrösserung: 10mal

so oft schon beobachtet, tritt also spontan eine Sprossung auf, die aber nicht in ein regeneratives Langstrecken-Wachstum der Fasern übergeht. Dies steht nun im Gegensatz zum Befund in Myelinfreiem Rückenmark oder in Anwesenheit des die Hemmstoffe neutralisierenden Antikörpers IN-1: In allen diesen Tieren konnte ein weitergehendes Wachstum der CST-Fasern in caudaler Richtung beobachtet werden (Fig. 4a, b) (22, 23). Die Wachstums-Distanzen schwankten zwischen 2 und 18,7 mm, wobei die meisten Tiere eine Regeneration von 4–7 mm in 2–3 Wochen aufwiesen. Diese Distanzen genügen, um die CST-Fasern in ihre ehemaligen Endigungsgebiete zurückzuführen. Die Regenerations-Distanz war unabhängig

vom Alter der Tiere. Zum Teil konnten extensive Aufzweigungen der regenerierten Fasern in der grauen Substanz des Rückenmarks beobachtet werden. Es liegen aber zur Zeit noch keine elektronenmikroskopischen Befunde vor, um die Synapsenbildung und deren Spezifität zu beurteilen. Auch Verhaltens-Untersuchungen über eine mögliche funktionelle Restitution von CST-Funktionen liegen noch nicht vor, stellen aber ein wichtiges Ziel für zukünftige Untersuchungen dar. Diese Resultate zeigen zum ersten Mal, dass Regeneration von verletzten Faserverbindungen im ZNS möglich ist.
Ein weiteres Problem in diesem Gebiet der Faserregeneration nach ZNS-Verletzungen stellen die Bedingungen und Reaktionen an den Läsionsstellen selber dar. In unseren Experimenten am Rückenmark der Ratte war ersichtlich, dass nur relativ wenige Fasern des CST um und durch die Läsionsstelle wachsen konnten und den Anschluss ans caudale Rückenmark fanden. An der Stelle der Läsion bildeten sich häufig Zysten und Kavernen sowie Gebiete mit nekrotischem Gewebe und Astrozytennarben. Die Überbrückung der Läsionsstelle mit Material, das ein gutes Faserwachstum durch die Läsion erlauben würde, ist bis jetzt nicht gelungen, weder in mehreren anderen Labors noch in unseren eigenen Studien. Für eine zukünftige klinische Anwendung unserer Befunde werden solche Brücken von grosser Bedeutung sein. In kombinierten Studien versuchen wir zur Zeit, an den Modellen des Rattenrückenmarks zusätzlich zu den Inhibitor-Antikörpern auch neurotrophe Faktoren als Stimulatoren der Sprossung und des Faserwachstums und verschiedene Typen von Läsionsbrücken einzusetzen. Gleichzeitig hoffen wir, aus der molekularbiologischen Charakterisierung von NI-35 und NI-250 sowie aus den zellbiologischen Studien zum Wirkungsmechanismus dieser Inhibitoren neue Information zu gewinnen, die die Anwendung dieser Erkenntnisse auf ZNS-Läsionen im Menschen ermöglichen könnte.

*Zusammenfassung und Schlussfolgerung*

Ausgehend von einer ursprünglich klinischen Fragestellung sind wir durch ein multidisziplinäres Vorgehen, das sich auf Zellbiologie,

Biochemie, Molekularbiologie und Tierexperimente abstützt, zu einem neuen Konzept bezüglich des Nervenfaser-Wachstums im Zentralnervensystem gekommen: dem Vorhandensein von spezifischen Hemmfaktoren für das Faserwachstum. Als Bestandteil des Myelins konnten zwei Proteine definiert werden, die eine starke inhibitorische Wirkung auf das Wachstum verschiedener Typen von Nervenfasern haben. Diese Proteine hemmen auch die Ausbreitung und Migration anderer Zelltypen, zum Beispiel von Fibroblasten und Astrozyten, und invasive Glioblastomzellen besitzen einen spezifischen proteolytischen Mechanismus, um diese Inhibitoren abzubauen und sich dadurch im Gehirn ausbreiten zu können (24). Die normale physiologische Bedeutung dieser Inhibitoren im adulten ZNS der höheren Wirbeltiere ist noch weitgehend unklar. Plausibel erscheint eine generelle stabilisierende Funktion, die dadurch wichtig wird, dass viele Typen von Nervenzellen auch im erwachsenen ZNS eine ständige Wachstums-Tendenz aufweisen. Erste Experimente während der Entwicklung zeigen, dass spät wachsende Faserzüge wie der Corticospinaltrakt durch diese Inhibitoren geleitet und kanalisiert werden können. Die Experimente nach Rückenmarks-Verletzungen bei Ratten (Myelin-freies Rückenmark oder neutralisierende Antikörper gegen die Inhibitoren) zeigen, dass diesen Hemmstoffen eine grundlegende Bedeutung im Zusammenhang mit der fehlenden Regeneration verletzter Nervenfaserbahnen zukommt. Molekulare Charakterisierung, Aufklärung des zellulären Wirkungsmechanismus, weiteres Verständnis der physiologischen Rolle im sich entwickelnden und erwachsenen Gehirn und weiterführende Studien zur Regeneration sind deshalb die wichtigsten Facetten unserer derzeitigen und zukünftigen Arbeit in diesem Projekt.

*Danksagung*

Mein Dank geht in erster Linie an alle Mitarbeiter meiner Arbeitsgruppe hier in Zürich, die in hervorragender Zusammenarbeit quer über die verschiedenen methodischen Disziplinen diese Projekte bearbeiten und vorantreiben. Viele grundlegende Vorstellungen und

Anregungen erhielt ich während meiner langen und fruchtbaren Zusammenarbeit mit Prof. Hans Thoenen, am Biozentrum in Basel und später am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München. Für eine produktive Atmosphäre und kollegiale Unterstützung hier am Institut für Hirnforschung danke ich insbesondere meinen beiden Kollegen Prof. M. Cuénod und Prof. B. Gähwiler. Unsere Arbeit wäre nicht möglich ohne die grosszügige Unterstützung durch Universität und Erziehungsdirektion des Kantons Zürich, den Schweizerischen Nationalfonds, die Schweizerische-Multiple-Sklerose-Stiftung, die Dr.-E.-Slack-Gyr-Stiftung, Zürich, Regeneron Pharmaceuticals, New York, und die American Paralysis Association, Springfield, New Jersey.

# REFERENZEN


1. Tello, F. 1911. La influencia del neurotropismo en la regeneración de los centros nerviosos. Trab. Lab. Invest. Biol. *9:* 123–159.
2. Ramón y Cajal, S. 1928. Degeneration and Regeneration of the Nervous System (Engl. transl. and reprint, 1959, Hafner, New York).
3. David, S. and Aguayo, A.J. 1981. Axonal elongation into peripheral nervous system «bridges» after central nervous system injury in adult rats. Science *241:* 931–933.
4. Keirstead, S.A., Rasminsky, M., Fukuda, Y., Carter, D.A., Aguayo, A.J. and Vidal-Sanz, M. 1989. Electrophysiologic responses in hamster superior colliculus evoked by regenerating retinal axons. Science *246:* 255–257.
5. Whittemore, S.R., Nieto-Sampedro, M., Needels, D.L. and Cotman, C.W. 1985. Neuronotrophic factors for mammalian brain neurons: injury induction in neonatal, adult and aged rat brain. Dev. Brain Res. *20:* 169–178.
6. Barde, Y.-A. 1989. Trophic factors and neuronal survival. Neuron *2:* 1525–1534.
7. Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., Thoenen, H. and Barde, Y.-A. 1989. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. Nature *341:* 149–152.
8. Schwab, M.E. and Thoenen, H. 1985. Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors. J. Neurosci. *5:* 2415–2423.
9. Schwab, M.E. and Caroni, P. 1988. Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. J. Neurosci. *8:* 2381–2393.
10. Neugebauer, K.M., Tomaselli, K.J., Lilien, J. and Reichardt, L.F. 1988. N-cadherin, NCAM, and integrins promote retinal neurite outgrowth on astrocytes in vitro. J. Cell Biol. *107:* 1177–1187.
11. Bandtlow, C.E., Zachleder, T. and Schwab, M.E. 1990. Oligodendrocytes arrest neurite growth by contact inhibition. J. Neurosci., in press.
12. Caroni, P. and Schwab, M.E. 1988. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. J. Cell Biol. *106:* 1281–1288.
13. Cox, E.C., Miller, B. and Bonhoeffer, F. 1990. Axonal guidance in the chick visual system: posterior tectal membranes induce collapse of growth cones from the temporal retina. Neuron *2:* 31–37.
14. Davies, J.A., Cook, G.M.W., Stern, C.D., Keynes, R.J. 1990. Isolation from chick somites of a glycoprotein fraction that causes collapse of dorsal root ganglion growth cones. Neuron *2:* 11–20.
15. Raper, J.A. and Kapfhammer, J. 1990. The enrichment of a neuronal growth cone collapsing activity from embryonic chick brain. Neuron *2:* 21–29.
16. Pesheva, P., Spiess, E. and Schachner, M. 1989. J1–160 and J1–180 are oligodendrocyte-secreted nonpermissive substrates for cell adhesion. J. Cell Biol. *109:* 1765–1778.

17. Caroni, P. and Schwab, M. E. 1988. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. Neuron *1:* 85–96.

18. Savio, T. and Schwab, M. E. 1989. Rat CNS white matter, but not gray matter, is nonpermissive for neuronal cell adhesion and fiber outgrowth. J. Neurosci. *9:* 1126–1133.

19. Schwab, M. E. and Schnell, L. 1989. Region-specific appearance of myelin constituents in the developing rat spinal cord. J. Neurocytol. *18:* 161–169.

20. Caroni, P. and Schwab, M. E. 1989. Codistribution of neurite growth inhibitors and oligodendrocytes in rat CNS: appearance follows nerve fiber growth and precedes myelination. Dev. Biol. *136:* 287–295.

21. Schwab, M. E. and Schnell, L. 1990. Channelling of developing rat corticospinal tract axons by myelin-associated neurite growth inhibitors. J. Neurosc., in press.

22. Savio, T. and Schwab, M. E. 1990. Lesioned corticospinal tract axons regenerate in myelin-free rat spinal cord. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87:* 4130–4133.

23. Schnell, L. and Schwab, M. E. 1990. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. Nature *343:* 269–272.

24. Paganetti, P. A., Caroni, P. and Schwab, M. E. 1988. Glioblastoma infiltration into central nervous system tissue in vitro: involvement of a metalloprotease. J.Cell Biol. *107:* 2281–2291.

# PUBLIKATIONSLISTE


1. Schwab, M. E.: Some new aspects about the prosencephalon of Lampetra fluviatilis (L.). Acta anat. *86:* 353–375, 1973.

2. Schwab, M. E.: Variation in the rhombencephalon. *In:* Biology of the reptilia, vol. 10, Neurology B, C. Gans, R. G. Northcutt and P. Ulinski eds., Academic Press, London, 201–246, 1979.

3. Schwab, M. E. and Durand, M.: An autoradiographic study of neuroblast proliferation in the rhombencephalon of a reptile, Lacerta sicula. Z. Anat. Enwickl.-Gesch. *145:* 29–40, 1974.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

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

8. 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.

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. Schwab, M. E.: Ultrastructural localization of a nerve growth factor – horseradish peroxidase (NGF-HRP) coupling product after retrograde axonal transport in adrenergic neurons. Brain Res. *130:* 190–196, 1977.

13. 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.

14. Bizzini, B., Stöckel, K. and Schwab, M.: An antigenic polypeptide fragment isolated from tetanus toxin: chemical characterization, binding to gangliosides and retrograde axonal transport in various neuron systems. J. Neurochem. *28:* 529–542, 1977.

15. Saito, H., Suda, K., Schwab, M. and Thoenen, H.: Potentiation of the NGF-mediated nerve fiber outgrowth by ginsenoside $Rb_1$ in organ cultures of chicken dorsal root ganglia. Jap. J. Pharmacol. *27:* 445–451, 1977.

16. Winkler, H., Gagnon, C., Pfaller, W., Fischer, W. M., Schwab, M. and Thoenen, H.: Increased content of dopamine ß-hydroxylase per unit of chromaffin granule membrane following reserpine treatment. J. Neurochem. *28:* 853–856, 1977.

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

18. Schwab, M. E. and Thoenen, H.: Retrograde axonal and transsynaptic transfer of macromolecules: Physiological and pathophysiological importance. Agents and Actions *7:* 361–368, 1977.

19. 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 Cytodifferentiation", J. Papaconstantinou and W. J. Rutter, eds., Academic Press, New York, 101–118, 1978.

20. Schwab, M. E. and Thoenen, H.: Selective binding, uptake and retrograde transport of tetanus toxin by nerve terminals in the rat iris. J. Cell Biol. *77:* 1–13, 1978.

21. Thoenen, H., Schwab, M. and Barde, Y. A.: Transfer of information from effector organs to innervating neurons by retrograde axonal transport of macromolecules. *In:* "The Neurobiologic Mechanisms on Manipulative Therapy", I. M. Korr, ed., Plenum Press, New York, 311–331, 1978.

22. Schwab, M. E., Javoy-Agid, F. and Agid, Y.: Labeled wheat germ agglutinin (WGA) as a new, highly sensitive retrograde tracer in the rat brain hippocampal system. Brain Res. *152:* 145–150, 1978.

23. 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.

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

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

26. 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.

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

28. 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.

29. 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.

30. Schwab, M.E. and Agid, Y.: Labelled wheat germ agglutinin and tetanus toxin as highly sensitive retrograde tracers in the CNS: the afferent fiber connections of the rat nucleus caudatus. Int. J. Neurol. *13:* 117–126, 1979.

31. Otten, U., Goedert, M., Schwab, M. and Thibault, J.: Immunization of adult rats against 2.5S NGF: effects on the peripheral sympathetic nervous system. Brain Res. *176:* 79–90, 1979.

32. Thoenen, H., Barde, Y.-A., Edgar, D., Hatanaka, H., Otten, U. and Schwab, M.: 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 Biochemical Press, Amsterdam, Vol. *51:* 95–107, 1979.

33. Thoenen, H. and Schwab, M.E.: Retrograde axonal transport of specific macromolecules. TIPS *1:* 74–80, 1979.

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

35. Schwab, M.E. Axonaler Transport von der Nervenendigung zum Nervenzellkörper: ein Weg für trophische Signale und Neurotoxine. Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss. *336:* 7–19, 1980.

36. 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. Nuñez (eds.) Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 15–34, 1981.

37. Warembourg, M., Otten, U. and Schwab, M. E.: Labelling of Schwann and satellite cells by $^3$H dexamethasone in a rat sympathetic ganglion and sciatic nerve. Neuroscience *6:* 1139–1143, 1981.

38. Schwab, M. and Landis, S.: Membrane properties of cultured rat sympathetic neurons: morphological studies of adrenergic and cholinergic differentiation. Dev. Biol. *84:* 67–78, 1981.

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

40. 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. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. *46:* 125–133, 1981.

41. 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.

42. Wakade, A. R., Wakade, T.D., Müller, C. and Schwab, M.: Epinephrine as a tool of investigate the question of recycling of sympathetic storage vesicles in the heart: Chemical and morphological studies. J. Pharmacol. & Exp. Therap. *221:* 820–827, 1982.

43. 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. *2:* 1554–1566, 1982.

44. 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.

45. Schwab, M. E. and Thoenen, H.: Mechanism of uptake and retrograde axonal transport of noradrenaline in sympathetic neurons in culture: Reserpine-resistant large dense-core vesicles as transport vehicles. J. Cell Biol. *96:* 1538–1547, 1983.

46. Gnahn, 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.

47. 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 (Grisolia, Guerri, Samson, Norton, and Reinoso-Suárez, eds.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 101–107, 1983.

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

49. Schwab, M. E. and Thoenen, H.: Retrograde axonal transport. *In:* "Handbook of Neurochemistry", Vol. 5, A. Lajtha, ed. Plenum Press, New York, pp. 381–404, 1983.

50. Schwab, M. E.: Cell biological aspects of neuronal communication: trophic interactions in the developing and adult nervous system. *In:* "Synergetics of the brain", E. Basar, H. Haken, and A. J. Mandell, eds., Springer, Berlin, p. 42–49, 1983.

51. Schwab, M. E., Müller, Ch. and Schmid-Tannwald, I.: Fast and reliable culture method for cells from 8–10 week trophoblast tissue. Lancet *8345:* 1082, 1984.

52. Seiler, M. and Schwab, M. E.: Specific retrograde transport of nerve growth factor (NGF) from neocortex to nucleus basalis in the rat. Brain Res. *300:* 33–39, 1984.

53. Heumann, R., Schwab, M. E., 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.

54. Schwab, M. E. and Vassella, F.: Synopsis: Gangliosidoses. Neuropediatrics *15:* Suppl., 107–109, 1984.

55. Hefti, F., Hartikka, J., Eckenstein, F., Gnahn, H., Heumann, R. and Schwab, M. E.: Nerve growth factor (NGF) increases choline acetyltransferase but not survival or fiber outgrowth of cultured septal cholinergic neurons. Neurosci. *14:* 55–68, 1985.

56. 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.

57. Schwab, M. E. and Thoenen, H.: Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors. J. Neurosci. *5:* 2415–2423, 1985.

58. Heumann, R. and Schwab, M. E.: The production of NGF mRNA in peripheral organs. Trends in Neurosci. *8:* 373–374, 1985.

59. Haselbacher, G. K., Schwab, M. E., Pasi, A. and Humbel, R. E.: Insulin-like growth factor II (IGF II) in human brain: Regional distribution of IGF II and of higher molecular mass forms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *82:* 2153–2157, 1985.

60. Schwab, M. E. and Thoenen, H.: Factors influencing axonal growth; central vs. peripheral nerve explants as substrates *in vitro*. *In:* "Processes of recovery from neural trauma", G. Gilad and G. W. Kreutzberg, eds., Exp. Brain Res. *13:* Springer-Verlag, Berlin, 1986, pp. 205–214.

61. Marchand, C. F. and Schwab, M. E.: Binding, uptake and retrograde axonal transport of herpes virus suis in sympathetic neurons. Brain Res., *383:* 262–270, 1986.

62. Johnson, J. E., Barde, Y.-A., Schwab, M. E. and Thoenen, H.: Brain-derived neurotrophic factor support the survival of cultured rat retinal ganglion cells. J. Neurosci., *6:* 3031–3038, 1986.

63. Wekerle, H., Schwab, M. E., Linington, C. and Meyermann, R.: Antigen presentation in the peripheral nervous system: Schwann cells present endogenous myelin autoantigens to lymphocytes. Eur. J. Immunol., *16:* 1551–1557, 1986.

64. Bandtlow, C. E., Heumann, R., Schwab, M. E. and Thoenen, H.: Cellular localization of nerve growth factor synthesis by *in situ* hybridization. EMBO Journal, *6:* 891–899, 1987.

65. Bandtlow, C. E., Heumann, R., Schwab, M. E. and Thoenen, H.: Cellular localization of nerve growth factor synthesis in various organs of the peripheral nervous system. *In:* Neuronal Plasticity and Trophic Factors. (G. Biggio, P. F. Spano, G. Toffano, S. H. Appel, G. L. Gessa, eds.) Fidia Research Series, Symposia in Neuroscience, Vol. 7, 35–44, 1988, Liviana Press, Padova/Italy.

66. Landis, S. C., Siegel, R. E. and Schwab, M. E.: Evidence for neurotransmitter plasticity in vivo. II. Immuno-cytochemical studies of rat sweat gland innervation during development. Dev. Biol., *126:* 129–140, 1988.

67. Schwab, M. E. and Caroni, P.: Oligodendrocytes and CNS myelin are non-permissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading *in vitro*. J. Neurosci., *8:* 2381–2393, 1988.

68. Caroni, P., Savio, T. and Schwab, M. E.: CNS regeneration: oligodendrocytes and myelin as non-permissive substrates for neurite growth. Progr. Brain Res., *78:* 353–370, 1988.

69. Caroni, P. and Schwab, M. E.: Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. J. Cell Biol., *106:* 1281–1288, 1988.

70. Caroni, P. and Schwab, M. E.: Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. Neuron, *1:* 85–96, 1988.

71. Paganetti, P., Caroni, P. and Schwab, M. E.: Glioblastoma infiltration into central nervous system tissue in vitro: involvement of a metalloprotease. J. Cell Biol., *107:* 2281–2291, 1988.

72. Dutly, F. and Schwab, M. E.: How is oligodendrocyte differentiation and myelin formation regulated? Schweizer Archiv für Neurol. Psych. *140:* 1, 19–21, 1989.

73. Fontana, A., Frei, K., Malipiero, U.V., Leist, T. P. and Schwab, M. E.: On the production of immunoglobulins in the central nervous system: an involvement of B cell stimulatory factors 2/interleukin 6 produced intrathecally? Schweizer Archiv für Neurol. Psych. *140:* 1, 38–39, 1989.

74. Savio, T. and Schwab, M. E.: Rat CNS white matter, but not gray matter, is nonpermissive for neuronal cell adhesion. J. Neurosci., *9:* 1126–1133, 1989.

75. Schwab, M. E. and Schnell, L.: Region-specific appearance of myelin constituents in the developing rat spinal cord. J. Neurocytol., *18:* 161–169, 1989.

76. Frei, K., Malipiero, U.V., Leist, T.P., Zinkernagel, R.M., Schwab, M.E. and Fontana, A.: On the cellular source and function on interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. Europ. J. Immunol., *19:* 689–694, 1989.

77. Caroni, P. and Schwab, M. E.: Codistribution of neurite growth inhibitors and oligodendrocytes in rat CNS: appearance follows nerve fiber growth and precedes myelination. Dev. Biol., *136:* 287–295, 1989.

78. Schwab, M. E.: Neurite growth inhibitors in the mammalian central nervous system. IBRO News, *17:* No. 3, 1989.

79. Schnell, L. and Schwab, M. E.: Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. Nature, *343:* 269–272, 1990.

80. Savio, T., Schnell, L. and Schwab, M. E.: Myelin-associated inhibitory substrate components: role in CNS regeneration. *In:* Brain Repair (A. Björklund, A. J. Aguayo, D. Ottoson, eds.), MacMillan Press, London, Vol. *56:* 145–153, 1990.

81. Schwab, M. E., Schnell, L. and Bandtlow, C. E.: Expression of inhibitory substrates: a new role for oligodendrocytes. *In:* Differentiation and Functions of Glial Cells (G. Levi, ed.), Alan R. Liss, New York, 1990, pp. 181–187.

82. Vanselow, J., Schwab, M. E. and Thanos, S.: Responses of regenerating rat retinal ganglion cell axons to contacts with central nervous myelin in vitro. Europ. J. Neurosci., *2:* 121–125, 1990.

83. Savio, T. and Schwab, M. E.: Lesioned corticospinal tract axons regenerate in myelin-free rat spinal cord. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, *87:* 4130–4133, 1990.

84. Schwab, M. E.: Myelin-associated inhibitors of neurite growth and regeneration in the CNS. Trends in Neurosci., 1990, in press.

85. Schwab, M. E. and Schnell, L.: Channelling of developing rat corticospinal tract axons by myelin-associated neurite growth inhibitors. J. Neurosci., 1990, in press.

86. Schwab, M. E.: Myelin-associated inhibitors of neurite growth. Exp. Neurol., *109:* 2–5, 1990.

87. Bandtlow, C. E., Zachleder, T. and Schwab, M. E.: Oligodendrocytes arrest neurite growth by contact inhibition. J. Neurosci., 1990, in press.

# LAUDATIO AUF PROFESSOR DR. DENIS MONARD

*Professor Dr. Max M. Burger*

> «Das einzelne fasziniert mich. Die Einzelheiten sind es, die das Gesamte machen ... die die Schönheit einer Form machen.»
>
> *Alberto Giacometti (aus einem Gespräch mit André Parinaud, Galerie Beyeler, 1964)*

Bei der Fülle von Publikationen, die Erwartetes bestätigen, ist es erfrischend, sich in der «Freizeit» damit zu beschäftigen, wie konzeptionell ungelöste Probleme theoretisch angegangen werden können. Wenn auch leider nicht mehr das tägliche Brot für den Durchschnittsforscher, so ist es doch das Neuland, das Unerforschte, das den jungen – und manchmal auch nicht mehr so jungen – Forscher bei seiner Arbeit motiviert.

Morphogenese bleibt weiterhin unerklärtes Neuland. Auch wenn wir wissen, dass primitive Tiere wie Schwämme in einzelne Zellen dissoziiert werden können und dann nach der Aggregation wieder die ursprüngliche Form eines Schwammes mit all seinen Organen aufbauen können, haben wir praktisch noch keine Ahnung, wie genau diese Bausteine ein differenziertes Organ zusammenbauen können.

Auch wenn wir wissen, dass gewisse Nerven – nicht nur bei einfachen Tieren – nach ihrer Durchtrennung den Weg zurück zu ihrem Organ finden können, haben wir nicht einmal ein überzeugendes Konzept davon, was sich auf zellulärer oder molekularer Ebene genau abspielt, das diese wichtige Unterart der Formfindung, die Regeneration, erklären kann.

Auch wenn wir wussten, dass Wachstumsfaktoren, wie der Nerve Growth Factor, für dessen Entdeckung der Nobelpreis vor wenigen Jahren vergeben wurde, mitbeteiligt sein können beim Auswachsen gewisser Nervenfortsätze, wussten wir nicht genau, auf welches Zielmolekül diese Nervenwachstumsfaktoren wirken.

Prof. Denis Monard ist es gelungen, in einer konsequenten Folge von zielstrebigen Arbeiten über die letzten 17 Jahre hinweg die unerwartete Wirkung eines von ihm selbst gefundenen und isolierten Nervenwachstumsfaktors aufzudecken.
Nach einer Dissertation in Mikrobiologie an der ETH Zürich bei den Herren Hütter und Ettlinger erweiterte er seine Ausbildung als Postdoctoral Fellow in Denver mit einem Projekt über die Regulation des ersten «second messenger», das heisst des zyklischen Adenosinmonophosphates. Mit 29 Jahren kam er ans neugegründete Friedrich Miescher-Institut in Basel und wurde damit einer der jüngsten Forschungsgruppenleiter an diesem Institut.
In Basel widmete er sich von Anfang an der Frage des Wachstums von Nervenfortsätzen und entdeckte ein Protein, das von Glia- und nicht von Nervenzellen hergestellt und sezerniert wird und das das Auswachsen von verschiedenartigen Nervenzellfortsätzen in Kultur fördert. Mit bewundernswertem Durchhaltevermögen reinigte er diesen in kleinsten Mengen vorkommenden Faktor mit einem mühseligen Testsystem, das auf dem Auswachsen von Nervenfortsätzen in Kultur beruhte. Dem Biochemiker, der es gewohnt ist, mit Isotopen und photometrischen Testsystemen einen Enzymaktivitätspunkt in 30 oder weniger Sekunden zu messen, sei in Erinnerung gerufen, dass eine einzige solche Aktivitätsmessung Tage, das heisst 10000mal länger, dauert und solche Wachstumsfaktorreinigungen mehr als ein Quentchen Geduld und Stamina von seiten des Forschers wie auch jener, die diese Forschung unterstützen, voraussetzen.
Entre parenthèses sei bemerkt, dass solche Forschung, bei der manchmal für längere Zeit keine oder nur wenige Publikationen erscheinen können, nicht ein Privileg von Stiftungen, wie dem FMI, sind, sondern auch von Universitäten und sogar vom Nationalfonds getragen werden, wenn der Forscher vertrauenswürdige Vorarbeit und Publikationen vorzuweisen hat. Ein Beispiel dafür sind die Gruppen Froesch und Humbel in Zürich, aus denen auch der Cloëttapreisträger Zapf stammt, die insulinwirksame Wachstumsfaktoren ebenso mühselig isoliert haben. Hoffen wir, dass solche zeitraubende Fernzielforschung mit grösseren «Trockenperioden» bei guten Gruppen weiterhin unterstützt werden kann und auch wird.

Nach 12 Jahren ist es Herrn Monard endlich gelungen, den Faktor nicht nur zu isolieren und zu reinigen, sondern auch zu sequenzieren. Nachdem er schon einige Jahre zuvor die damals noch nicht im Zusammenhang gesehene Beobachtung gemacht hat, dass Proteasehemmung das Auswachsen von Nervenfasern beschleunigt, fügten sich die einzelnen Teile des Puzzels schlagartig damit zusammen, dass der gereinigte Gliafaktor Proteasehemmfunktion zeigte und auch verschiedene Proteasen, wie Trypsin, Thrombin und Urokinase, bindet. Mit der Sequenzhomologie zu anderen Serine-Protease-Inhibitoren war die erste Entdeckung einer molekular genau definierten, möglichen Funktion eines Nervenwachstumsfaktors perfekt.

Dass dieser Wachstumsfaktor nicht nur ein experimentelles In-vitro-Artefakt ist, geht aus den letzten Arbeiten von Monard wie auch von anderen Gruppen hervor, die die Relevanz seiner Arbeiten entdeckt haben und nun weiter ausbauen helfen. So hat er mit seiner Gruppe am FMI wie auch zusammen mit anderen Laboratorien zeigen können, dass nach der Durchtrennung peripherer Nerven der Gliafaktor im Wundgewebe neu induziert wird und dass in jenen Zonen im Hirn, wo ständig Nervenregeneration stattfindet, wie zum Beispiel in den Riechnerven, der Faktor auch ständig hergestellt wird.

Solche bahnbrechenden experimentellen Arbeiten führen beim Kliniker wie auch beim Patienten rasch zur Frage, ob dieser oder andere Nervenwachstumsfaktoren, wie jener von Barde und dem ehemaligen Cloëttapreisträger Thoenen in München gefundene Hirnfaktor, allgemein die Nervenregeneration stimulieren könnten. Monards letzter Beitrag, dass auch Pyramidenzellen des Rattenhirn-Hippocampus nach Gliafaktorbehandlung Nervenfortsätze auswachsen lassen, gibt dieser Hoffnung Nahrung. Bis zu einer zuverlässigen Anwendung von irgendeinem dieser Faktoren beim Menschen bei Unfall-Paraplegien, thromboembolischen Ausfällen oder gar beim Alzheimer-Syndrom werden nicht nur Neurobiologen, sondern Biotechnologen und Neurologen und nicht zuletzt auch Pharmakologen und klinische Pharmakologen wesentliche Beiträge leisten müssen. Diese Entwicklung in die Breite ist aber vorgezeichnet und insofern auch vorhanden, als schon Klein-

und zum Teil Grossfirmen solche Nervenwachstumsfaktoren herzustellen beginnen.
Der Anfang ist gemacht. Dazu wesentlich beigetragen zu haben, gratuliere ich Ihnen, Herr Monard, und ebenso dem Max-Cloëtta-Stiftungsrat, der seit längerer Zeit die überdurchschnittliche Stärke der schweizerischen Neurobiologie im internationalen Rahmen durch wohlplazierte Preisverleihungen zu ehren und zu fördern verstand.

DER CLOËTTA-PREIS 1990
WIRD

HERRN PROFESSOR DR. SC. NAT.

# DENIS MONARD

GEBOREN 1949 IN NEUCHÂTEL
VIZEDIREKTOR AM FRIEDRICH MIESCHER-INSTITUT
UND PROFESSOR FÜR ZELLBIOLOGIE AN DER UNIVERSITÄT BASEL
IN ANERKENNUNG SEINER AUSSERORDENTLICHEN ARBEITEN
AUF DEM GEBIET DER WACHSTUMSKONTROLLE VON
NERVENFASERN IN VITRO UND IN VIVO
VERLIEHEN.

ZÜRICH, 19 NOVEMBER 1990

FÜR DEN STIFTUNGSRAT:

DER VIZEPRÄSIDENT: EIN MITGLIED:

EIN MITGLIED:

Professor Dr. Denis Monard

# CURRICULUM VITAE

| | |
|---|---|
| Name: | Denis Monard |
| Date of birth: | July 23, 1941 (Neuchâtel) |
| Nationality: | Swiss |
| Marital status: | Married; 2 children (1965, 1967) |
| Languages: | French, English and German |
| Professional address: | Friedrich Miescher-Institut<br>P.O. Box 2543, Basel, Switzerland |
| Telephone: | 061 697 66 58 / 697 66 59 |
| 1960–1964 | Swiss Federal Institute of Technology, Zurich. Diploma in Natural Sciences, programme biological chemistry. |
| 1964–1968 | Scientific collaborator and assistant at the Institute of Microbiology of the Swiss Federal Institute of Technology, Zurich. |
| 1968 | Ph.D. at the same Institute. Thesis on "Contribution à l'étude du métabolisme d'Acetobacter aceti." |
| 1968–1970 | Postdoctoral Fellow, then Research Associate with Professor H.V. Rickenberg, National Jewish Hospital and Department of Microbiology, University of Colorado, Denver, USA. |
| 1970– | Staff scientist and group leader at the Friedrich Miescher-Institut, Basel. |
| 1974– | Deputy Director at the Friedrich Miescher-Institut. |
| 1976–1982 | Head of the Section Neurobiology at the Friedrich Miescher-Institut. |
| 1977–1982 | Ad interim Head of the section Molecular Biology at the Friedrich Miescher-Institut. |
| 1977–1985 | Member of the Advisory Committee of the Research Programme "Dynamique du neurone et des ensembles neuronaux." Division du Fonds de Recherche, Secrétariat d'Etat à la Recherche, Paris. |

| | |
|---|---|
| 1979–1989 | Privatdozent at the University of Basel. |
| 1981–1987 | Member of the Advisory Committee of the Research Programme "Biochemie des Nervensystems," Deutsche Forschungsgesellschaft, Bonn. |
| 1985–1987 | Member of the Programme Committee for the Joint Meeting of the International Society for Neurochemistry and of the American Society of Neurochemistry, La Guaira, Venezuela. |
| 1986 | Board of Advisors for the "Zentrum für Molekulare Neurobiologie," Hamburg. |
| 1986 | Co-organizer of a Titisee Conference (Boehringer Foundation) on "Molecular factors involved in the development of the nervous system." |
| 1986– | Member of the "Conseil Scientifique de la Fondation Suisse de Recherche sur les Maladies Musculaires." |
| 1989– | Professor of Neurobiology at the University of Basel. |

*Teaching experience*

| | |
|---|---|
| 1975– | Courses on cellular neurobiology at the Biocenter of the University of Basel. |
| 1978–1984 | Invited lecturer on cellular neurobiology in the Department of Biochemistry at the University of Geneva. |

*Professional organizations*

Member of the Swiss Society for Cell and Molecular Biology.
Member of the Swiss Society for Microbiology.
Member of the European Neuroscience Association (ENA).
Member of the International Society for Neurochemistry (ISN).
Member of the International Brain Research Organization (IBRO).

# PROTÉASES ET INHIBITEURS EXTRACELLULAIRES DANS LE SYSTÈME NERVEUX

*Denis Monard*

## *Introduction*

La plasticité est une propriété étonnante et constante du système nerveux. Elle se retrouve non seulement au niveau des fonctions globales, mais aussi à celui des cellules et des molécules. Pendant le développement du système nerveux, les neuroblastes, les cellules nerveuses encore immatures, vont d'abord migrer pour atteindre l'endroit où elles devront exercer leurs fonctions spécifiques. Les phénomènes qui régissent cette migration représentent déjà une forme de plasticité. Leur influence va avoir des conséquences importantes sur la différentiation ultérieure des cellules. Si, par exemple, une cellule de grain du cervelet n'arrive pas à atteindre la couche où elle devrait normalement établir des connections, elle ne pourra pas se différencier selon le programme qui lui est propre. La plupart du temps, les neuroblastes «égarés» ne vont même pas être capables de survivre. Arrivés à destination, les neuroblastes, comme première étape dans leur différentiation, vont former de longs prolongements appelés neurites. Ces neurites doivent se frayer un chemin à travers une jungle composée d'une multitude d'éléments de la matrice extracellulaire. Dans cet exercice, le cône de croissance, c'est-à-dire la structure située à l'extrémité des neurites, joue un rôle prépondérant. Le cône de croissance est caractérisé par la présence de filopodes et de «microspikes» doués d'une extrême motilité. Les mouvements du cône de croissance dépendent de plusieurs types de molécules qui vont influencer le cheminement et l'élongation du neurite et, par conséquent, les cibles qui seront atteintes, puis innervées par la cellule neuronale.

Les connections établies restent cependant toujours plastiques, même dans le système nerveux différencié et fonctionnel. Ce phénomène est particulièrement observable lorsque certains neurones dégénèrent et que des cellules adjacentes forment de nouveaux neu-

rites («sprouting») pour essayer de rétablir les contacts interrompus. Cet exposé vise à estimer la contribution des protéases et de leurs inhibiteurs extracellulaires dans ces phénomènes de plasticité neuronale.

*Protéases et inhibiteurs associés et sécrétés par les cellules du système nerveux*

La synthèse et la sécrétion d'enzymes protéolytiques par des cellules en phase de migration ont été mises en évidence dans plusieurs systèmes biologiques. Dans le système nerveux, la présence d'activateur du plasminogène a été démontrée chez les cellules de grain qui migrent pendant une phase bien précise du développement du cervelet (Krystosek et Seeds, 1981a). L'activateur tissulaire du plasminogène, l'urokinase et une métalloprotéase dépendante du calcium sont enrichis au niveau du cône de croissance (Krystosek et Seeds, 1981b; Pittman, 1985). On postule que cette protéolyse extracellulaire contribue à assurer l'alternance des phénomènes d'adhésion et de déadhésion qui régissent l'invasion des cellules migratrices ou l'extrême motilité du cône de croissance. Ces enzymes protéolytiques pourraient ainsi générer la force de pénétration requise par le cône de croissance qui doit faire son chemin à travers la matrice extracellulaire.

En utilisant des méthodes de culture de tissus, nous avons pu démontrer que les cellules gliales, considérées comme des cellules de soutien dans le système nerveux, sécrètent un facteur de promotion neuritique qui, une fois purifié, s'est avéré un potent inhibiteur de protéase à sérine telles que la thrombine, l'urokinase ou l'activateur du plasminogène (Guenther et al., 1985). L'utilisation des méthodes de biologie moléculaire nous a permis d'établir la séquence primaire de cette protéine et de confirmer à ce niveau ses caractéristiques d'inhibiteur de protéase. La séquence de l'ADN complémentaire qui code pour cette protéine de 43 000 daltons a établi que cet inhibiteur est un membre de la famille des serpines (*sér*ine *p*rotease *in*hibitors) qui comprend également l'antithrombin III, l'$\alpha_1$-antitrypsine ou les inhibiteurs endothéliaux de l'activateur

du plasminogène (Gloor et al., 1986; Sommer et al., 1987). La partie aminoterminale étant alors identique à une séquence partielle connue pour un inhibiteur de thrombine appelé protéase nexine I et sécrété par les fibroblastes humains (Scott et al., 1985), ce facteur de promotion neuritique a donc été appelé GDN (pour *G*lia-*D*erived *N*exin). Il a par la suite été démontré que GDN et protéase nexine I sont identiques au niveau de la structure primaire (McGrogan et al., 1988). Les propriétés structurelles et biochimiques de GDN ont récemment été récapitulées (Monard, 1990). GDN a une affinité préférentielle pour la thrombine (Stone et al., 1988). En présence d'héparine, l'affinité pour la thrombine augmente 40 fois et GDN perd sa faculté d'inhiber d'autres protéases telles que l'urokinase ou l'activateur tissulaire du plasminogène. Quelques nanogrammes de thrombine suffisent à antagoniser la promotion neuritique causée par GDN (Monard et al., 1983). Les mêmes quantités de thrombine peuvent également provoquer une rétraction des neurites (Gurwitz et Cunningham, 1988).

Il n'est pas encore possible d'expliquer le mode d'action d'un inhibiteur de protéase tel que GDN dans la promotion de la croissance neuritique. Des expériences actuellement en cours visent à confirmer ou à infirmer certains points de l'hypothèse de travail suivante: comme mentionné plus haut, on considère que l'activité protéolytique au niveau du cône de croissance est impliquée dans la motilité des filopodes et des microspikes (Figure 1). Des études cinématographiques détaillées ont cependant indiqué que l'élongation neuritique ne peut s'effectuer sans que certains des filopodes se stabilisent et soient utilisés comme support (Bray et Chapman, 1985). GDN pourrait contribuer à cette stabilisation en inhibant localement les enzymes protéolytiques associés aux filopodes ou libérés dans leur voisinage. L'équilibre entre protéase(s) et inhibiteur(s) pourrait donc déterminer la vitesse de croissance neuritique (Figure 2). Un excès d'activité protéolytique entraînerait une vaine hypermotilité des filopodes sans entraîner une élongation et un excès d'inhibiteurs empêcherait tout mouvement, c'est-à-dire diminuerait la motilité, donc la force de pénétration du cône de croissance qui est également nécessaire à l'élongation (Monard, 1988). La caractérisation de toutes les protéases libérées au niveau du cône de croissance reste

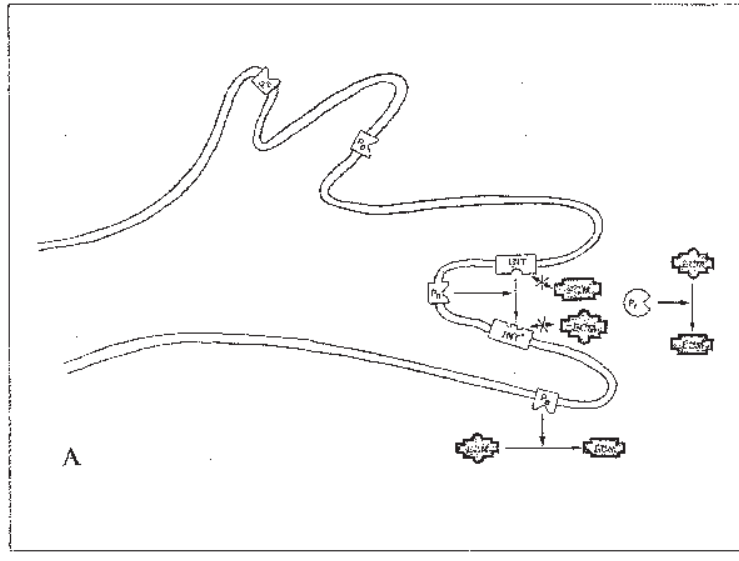



*Figure 1:* Contribution des protéases à la motilité du cône de croissance. L'activité protéolytique associée (Pa) ou libérée au niveau des filopodes peut dégrader certains composants de la matrice extracellulaire (ECM devenant ECM$^{\bullet}$) qui ne peuvent plus réagir avec leurs récepteurs spécifiques appelés intégrines (INT). Les intégrines peuvent aussi être inactivées par clivage protéolytique en une forme (INT$^{\bullet}$) qui ne peut plus réagir avec la matrice extracellulaire. Ce type de mécanisme contribue aux phénomènes d'adhésion transitoire qui caractérisent les mouvements du cône de croissance.

encore à faire. Cependant, vu la récente démonstration de la synthèse de thrombine par des cellules du système nerveux, il convient d'envisager que GDN pourrait agir avant tout en tant qu'inhibiteur de thrombine.

Cette hypothèse de travail considère également que GDN pourrait agir en étant lié à certains composants de la matrice extracellulaire ou que, une fois l'activité protéolytique réduite, le complexe protéase-GDN serait lui-même capable de promouvoir une meilleure adhésion. Ces possibilités ont récemment été supportées expérimentalement. GDN et le complexe GDN-thrombine se lient à la vitronectine et à la laminine, éléments de la matrice extracellulaire

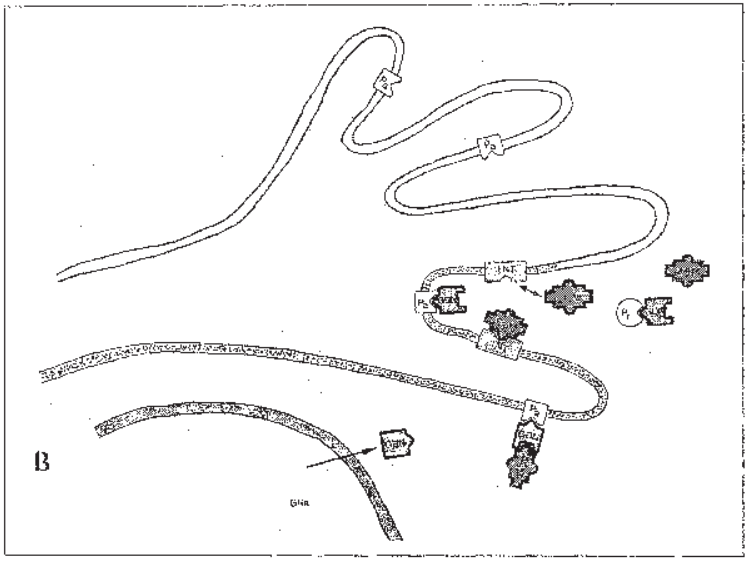



*Figure 2:* Mode d'action hypothétique des protéases et de leurs inhibiteurs dans l'élongation neuritique. Les inhibiteurs du type GDN libérés par les cellules gliales du voisinage neutralisent rapidement et localement l'activité protéolytique. La matrice extracellulaire et les intégrines ne sont plus détruites et leurs interactions provoquent une stabilisation de certains filopodes. Le complexe protéase / protéase inhibiteur (Pa-GDN) peut lui-même contribuer à ce phénomène en se liant à certains composants de la matrice extracellulaire. Le filopode stabilisé (pointillé) supporte une translation du cône de croissance entraînant ainsi une élongation du neurite.

(Rovelli et al., 1990), l'affinité du complexe GDN-thrombine étant plus forte que celle du GDN natif. Dans le but de mieux définir le mode d'action de GDN, il devient donc très intéressant de caractériser les domaines de la protéine qui pourraient être impliqués dans ces interactions avec la matrice extracellulaire.

Comme l'héparan sulfate est également un des constituants de la matrice extracellulaire, la potentiation de la formation du complexe GDN-thrombine par l'héparine pourrait être d'importance pour la fonction biologique de GDN. Nous cherchons donc actuellement de définir le ou les épitopes de GDN qui lient l'héparine. Vu qu'il a été possible de produire de grandes quantités de protéine par son

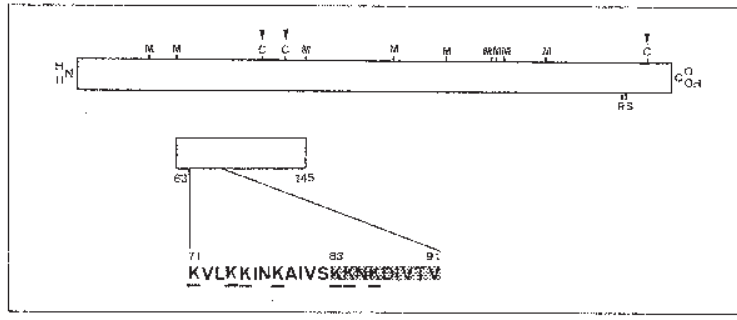



*Figure 3:* Représentation schématique de la séquence primaire de GDN. Le site réactif de l'inhibiteur (RS) est situé dans la région carboxyterminale. Le traitement au bromure de cyanogène clive la protéine au niveau des résidus méthionine (M). Un des fragments obtenus (résidus 63 à 145) interfère avec la potentiation par l'héparine. Une délétion des résidus 83 à 91 (pointillé) entraîne la perte de la potentiation par l'héparine. Il reste cependant possible que d'autres résidus lysine (K) adjacents à ce domaine soient également impliqués dans la liaison avec l'héparine. La position des résidus cystéine (C) importants pour une configuration active de GDN est aussi indiquée.

expression dans la levure (Sommer et al., 1989), GDN a été fragmenté en divers peptides par traitement au bromure de cyanogène (Figure 3). Le fragment qui comprend les acides aminés 63 à 145 est capable d'interférer avec la potentiation de la formation du complexe GDN-thrombine par l'héparine. Pour pouvoir aller plus loin, il est devenu nécessaire d'utiliser les méthodes de biologie moléculaire qui permettent d'omettre ou de remplacer certains acides aminés par mutagenèse dirigée et d'en étudier les conséquences pour l'activité de la protéine. Les modifications sont apportées au niveau de l'ADN. La nouvelle séquence de nucléotides est alors transfectée dans des cellules cultivées *in vitro*. Ces cellules vont ainsi synthétiser et sécréter une nouvelle protéine dont les propriétés peuvent être comparées à l'originale. En utilisant cette méthodologie, il est possible d'obtenir un GDN où les acides aminés 83 à 91 manquent et où la potentiation par l'héparine est abolie sans que l'inhibition de la thrombine soit affectée. Le fragment 83–91 comprend 3 résidus lysines dont les charges positives en font des points possibles d'interaction avec l'héparine. Une mutagenèse dirigée où chacune des lysines de ce fragment et de la région adjacente a été individuellement rem-

placée par différents acides aminés n'a pas altéré la potentiation par l'héparine. Il semble donc qu'aucune de ces lysines ne soit absolument nécessaire mais que plusieurs d'entre elles participent simultanément à l'interaction avec l'héparine. Il faudra donc remplacer 2, 3 voire 4 de ces lysines simultanément pour pouvoir éventuellement perdre la potentiation par l'héparine.
La même technique de mutagenèse dirigée a été utilisée pour étudier l'importance des 3 cystéines comprises dans la séquence du GDN de rat. Deux de ces résidus (117 et 131) sont conservés exactement à la même position dans la séquence humaine; le troisième se trouve en position 360 chez le rat et en position 209 chez l'homme. Un remplacement de l'un ou l'autre de ces résidus cystéine par une sérine con-

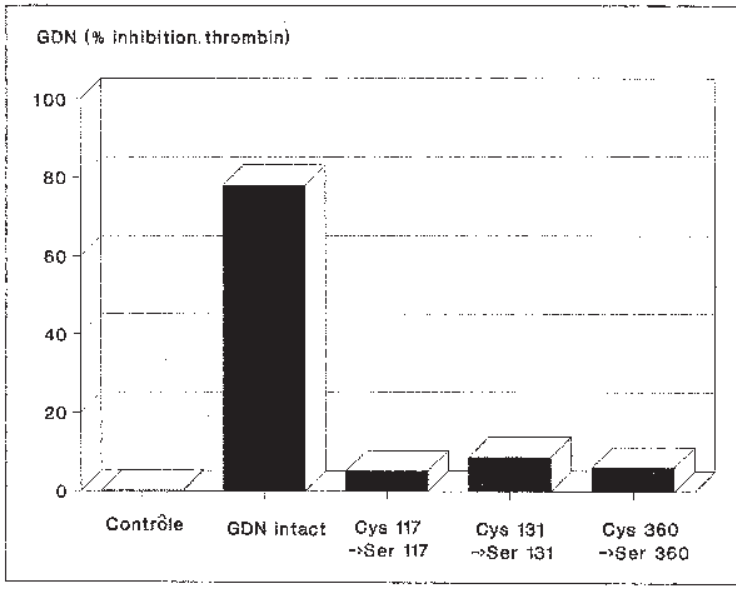



Figure 4: Les cystéines 117, 131 ou 360 ont été mutées en sérine (Cys 117-> Ser 117; Cys 131->Ser 131; Cys 360->Ser 360). Après transfection de cellules COS avec l'ADN modifié, les protéines mutantes sécrétées dans le milieu de culture ont pratiquement perdu la faculté d'inhiber la thrombine. Un dosage immunologique a indiqué que la même quantité de GDN est sécrétée dans chaque cas (résultats non illustrés).

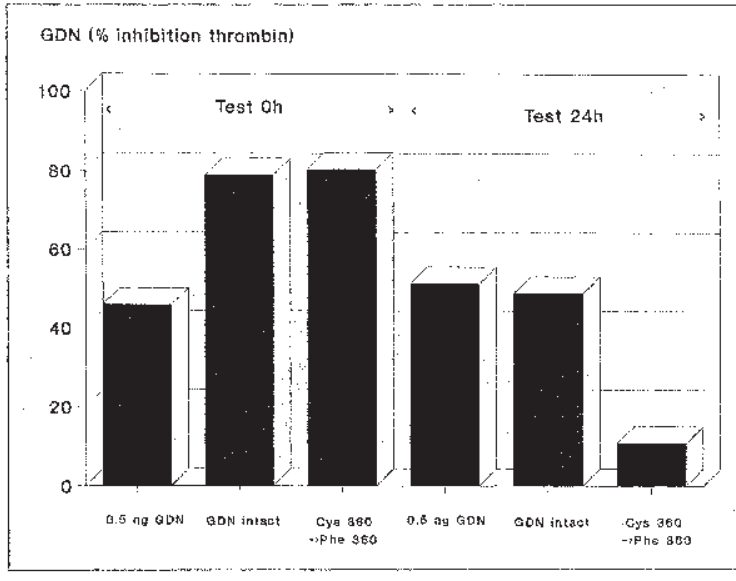



*Figure 5:* La cystéine 360 a été remplacée par une phénylalanine (Cys-> Phe 360). L'activité de ce mutant est comparable au GDN intact lorsque le milieu conditionné par les cellules transfectées est testé frais. La protéine mutante est cependant très sensible à un stockage de 24 h à 4°C. 0,5 ng de GDN ont été utilisés dans chaque test comme référence.

duit à la synthèse d'une protéine inactive (Figure 4). Si la cystéine 360 du rat est mutée en une phénylalanine (le résidu qui se trouve dans cette position dans la séquence humaine), la protéine résultante n'est pas inactive, mais très instable (Figure 5). Ces expériences ne sont pas définitives mais elles indiquent que les trois cystéines contribuent de façon déterminante à la structure active de GDN. Ces différents mutants seront finalement d'une grande utilité pour étudier la relevance biologique de GDN *in vivo*.

*Présence de GDN* in vivo

La fonction de GDN est suggérée par son activité décelée en culture de tissus. Pour définir une fonction *in vivo*, il convient de caractéri-

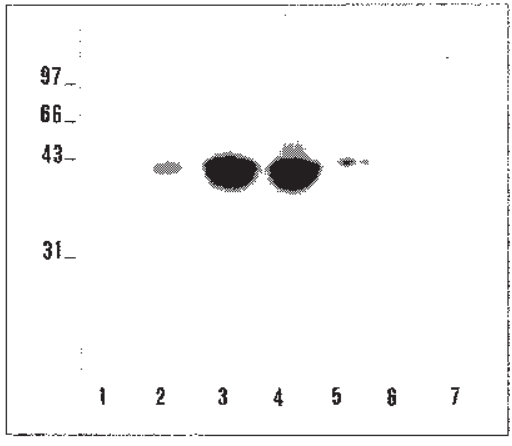



*Figure 6:* GDN détecté par immunoblot 7 jours après lésion du nerf sciatique du rat. Les homogénats du nerf contralatéral intact (1), du nerf opéré mais non lésé (2), du nerf compressé (3) ou sectionné (4) sont comparés à 50 ng (5) et 25 ng (6) de GDN. La colonne 7 représente un contrôle de l'immunoblot en utilisant un anticorps monoclonal non spécifique. Chaque échantillon analysé contient 50µg de protéines.

ser, dans une première approche, la présence de cette protéine dans l'animal. L'analyse immunochimique et le dosage de l'ARN messager démontrent que GDN est constitutivement exprimée au niveau de l'épithélium et du bulbe olfactif, des structures connues pour une constante dégénération et régénération de cellules neuronales (Reinhard et al., 1988). La synthèse de GDN est de plus induite pendant la période qui suit une lésion du nerf sciatique (Meier et al., 1989) (Figure 6). Une lésion de la structure CA1 de l'hippocampe provoquée par ischémie cause également une induction localisée de GDN. Le rôle de GDN *in vivo* reste encore à élucider. Comme les protéases libérées par les cellules jouent un rôle déterminant dans les phénomènes de dégénération cellulaire, on peut cependant considérer qu'une fonction primordiale de GDN serait de réduire un excès de protéolyse. On retrouve ainsi l'idée que la balance adéquate entre les quantités de protéases et d'inhibiteurs extracellulaires serait déterminante pour l'intégrité, voire la survie des connections neuronales.

*Conclusion*

La découverte d'un domaine caractéristique des inhibiteurs de protéases à sérine dans la séquence codant pour le précurseur du peptide amyloïde que l'on trouve dans les plaques caractérisant la maladie d'Alzheimer, a accentué l'intérêt pour le rôle des protéases et de leurs inhibiteurs dans le système nerveux (Kitaguchi et al., 1988; Ponte et al., 1988; Tanzi et al., 1988). Un des premiers produits de dégradation de la protéine membranaire qu'est le précurseur de l'amyloïde s'avère désormais être la protéase nexin II, un inhibiteur sécrété réagissant avec la chymotrypsine, l'estéropeptidase du complexe Nerve Growth Factor (γ-NGF) ou la protéine liant le facteur de croissance épidermique (EGF-binding protein) (Oltersdorf et al., 1989; Van Nostrand et al., 1989). La présence de α1-antichymotrypsine est également décelable dans les plaques d'Alzheimer (Abraham et al., 1988).
La protéolyse extracellulaire joue certainement un rôle prépondérant lors des phénomènes de dégénération neuronale. La caractérisation des substrats qui y sont le plus susceptibles reste à faire. Il faudra également établir si cette protéolyse représente une cause ou plutôt un des maillons qui accentuent la dégénération. La nature des protéases impliquées et la détermination de leurs inhibiteurs spécifiques représentent des étapes essentielles pour la compréhension de l'étiologie des maladies dégénératives du système nerveux.

*Remerciements*

Tous le travaux reportés ici ont été effectués à l'Institut Friedrich Miescher à Bâle. Sans les options à long terme, la compréhension et les encouragements du Conseil d'experts et du Conseil de Fondation de cette institution, il n'aurait pas été possible de surmonter les années fastidieuses qui furent nécessaires à la purification de cette protéine pour atteindre le stade vraiment captivant du projet. Permettez-moi une pensée spéciale pour Hubert Bloch, Howard Rickenberg et Frank Solomon qui ont influencé ma carrière scientifique par leur amitié et leurs argumentations. Il ne m'est pas possible

de mentionner et de remercier tous les collaborateurs qui, de près ou de loin, ont contribué à l'avancement de ces recherches. Je tiens toutefois à exprimer des remerciements spéciaux à Yvonne Schürch-Rathgeb, Joachim Guenther, Hanspeter Nick, Sergio Gloor, Jürg Sommer, Eva Reinhard, Roland Meier, Giorgio Rovelli et Melitta Dihanich qui ont posé des jalons essentiels dans notre démarche. J'adresse enfin par dessus tout ma profonde reconnaissance à mon épouse Arlette et à mes filles Sandrine et Viviane qui m'ont toujours soutenu et su accepter les contrecoups de la démarche scientifique sur la vie de famille.

# BIBLIOGRAPHIE


Abraham, C.R., Selkoe, D.J. and Potter, H.: Immunochemical identification of the serine protease inhibitor alpha-1 antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. Cell *52:* 487–501 (1988).

Bray, D. et Chapman, K.: Analysis of microspike movements on the neuronal growth cone. J. Neurosci. *5:* 3204 -3213 (1985).

Dano, K., Andreasen, P.A., Grondahl-Hansen, J., Kristensen, P., Nielsen, L.S. and Skriver, L.: Plasminogen activators, tissue degradation and cancer. Adv. Cancer Res. *44:* 139–266 (1985).

Gloor, S., Odink, K., Guenther, J., Nick, H. and Monard, D.: A glia-derived neurite promoting factor with protease inhibitory activity belongs to the protease nexins. Cell *47:* 687–693 (1986).

Guenther, J., Nick, H. and Monard, D.: A glia-derived neurite-promoting factor with protease inhibitory activity. EMBO J. *4:* 1963–1966 (1985).

Gurwitz, D. and Cunningham, D.D.: Thrombin modulates and reverses neuroblastoma neurite outgrowth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *85:* 3440–3444 (1988).

Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, J., Shiojiri, S. and Hirataka, J.: Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. Nature *331:* 530–532 (1988).

Krystosek, A. and Seeds, N.W.: Plasminogen activator secretion by granule neurons in cultures of developing cerebellum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *78:* 7810–7814 (1981a).

Krystosek, A. and Seeds, N.W.: Plasminogen activator release at the neuronal growth cone. Science *213:* 1532–1534 (1981b).

Lindner, J., Guenther, J., Nick, H., Zinser, G., Antonicek, H., Schachner, M. and Monard, D.: Modulation of granule cell migration by a glia-derived protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *83:* 4568 -4571 (1986).

McGrogan, M., Kennedy, J., Li, M.P., Hsu, C., Scott, R.W., Simonsen, C.C. and Baker, J.B.: Molecular cloning and expression of two forms of human protease nexin I. Biotechnology *6:* 172–177 (1988).

Meier, R., Spreyer, P., Ortmann R., Harel, A. and Monard, D.: Induction of glia-derived nexin after lesion of a peripheral nerve. Nature *342:* 548–550 (1989).

Monard, D.: Cell-derived proteases and protease inhibitors as regulators of neurite outgrowth. Trends Neurosci. *11:* 541–544 (1988).

Monard, D.: A glia-derived nexin acting as a neurite-promoting factor. In: Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 95/II Peptide Growth Factors and Their Receptors II, ed. M.B. Sporn, A.B. Roberts, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 167–177 (1990).

Monard, D., Niday, E., Limat, A. and Solomon, F.: Inhibition of protease activity can lead to neurite extension in neuroblastoma cells. Prog. Brain Res. *58:* 359–364 (1983).

Oltersdorf, T., Fritz, L.C., Schenk, D.B., Lieberburg, I., Johnson-Wood, K.L., Beattie, E.C., Ward, P.J., Blacher, R.W., Dovey, H.F. and Sinha, S.: The secreted form of the Alzheimer's amyloid precursor protein with the Kunitz domain is protease nexin-II. Nature *341*, 144–147 (1989).

Pittman, R.: Release of plasminogen activator and a calcium-dependent metalloprotease from cultured sympathetic and sensory neurons. Dev. Biol. *110*: 91–101 (1985).

Ponte, P., Gonzalez-De Whitt, P., Schilling, J., Miller, J., Hsu, D., Greenberg, B., Davis, K., Wallace, W., Lieberburg, I., Fuller, F. and Cordell, B.: A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine protease inhibitors. Nature *331*: 525–527 (1988).

Reinhard, E., Meier, R., Halfter, W., Rovelli, G. and Monard, D.: Detection of glia-derived nexin in the olfactory system of the rat. Neuron *1*: 387–394 (1988).

Rovelli, G., Stone S.R., Preissner, K.T. and Monard, D.: Specific interaction of vitronectin with the cell-secreted protease inhibitor glia-derived nexin (GDN) and the GDN-thrombin complex. Eur. J. Biochem., in press.

Scott, R.W., Bergman, B.L., Bajpai, A., Hersh, R.T., Rodriguez, H., Jones, B.J., Barreda, C., Watts, S. and Baker, J.B.: Protease nexin: properties and a modified purification procedure. J. Biol. Chem. *260*: 7029–7034 (1985).

Sommer, J., Gloor, S.M., Rovelli, G.F., Hofsteenge, J., Nick H., Meier, R. and Monard, D.: cDNA sequence coding for a rat glia-derived nexin and its homology to members of the serpin superfamiliy. Biochemistry *26*: 6407–6410 (1987).

Sommer, J., Meyhack, B., Rovelli G., Bürgi, R. and Monard, D.: Expression of glia-derived nexin in yeast. Gene *85*: 453–459 (1989).

Stone, S., Nick, H., Hofsteenge, J. and Monard, D.: Glia-derived neurite-promoting factor is a slowbinding inhibitor of trypsin, thrombin, and urokinase. Arch. Biochem. Biophys. *252*: 237–244 (1987)

Tanzi, R.E., McClatchery, A.I., Lamperti, E.D., Villa-Komaroff, L., Gusella, J.F. and Neve, R.L.: Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor: mRNA associated with Alzheimer's disease. Nature *331*: 528–530 (1988).

Van Nostrand, W.E., Wagner, S.L., Suzuki, M., Choi, B.H., Farrow, J.S., Geddes, J.W., Cotman, C.W. and Cunningham, D.D.: Protease nexin-II, a potent antichymotrypsine, shows identity to amyloid ß-protein precursor. Nature *341*: 546–549 (1989).

# PUBLICATIONS


1. Monard, D., Hütter, R. et Ettlinger, L.:
Auxotrophie dictée par la source d'énergie chez Acetobacter aceti.
Path. Microbiol. *30:* 966–971 (1967).

2. Monard, D., Janecek, J. and Rickenberg, H.V.:
The enzymatic degradation of 3', 5' cyclic AMP in strains of *E. coli* sensitive and resistant to catabolite repression.
Biochem. Biophys. Res. Comm. *35:* 584–591 (1969).

3. Monard, D., Janecek, J. and Rickenberg, H.V.:
Cyclic adenosine monophosphate diesterase activity and catabolite repression in *E. coli.* p. 393–400.
*In:* The Lactose Operon Meeting, J. Beckwith and D. Zinser, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1970).

4. Nielsen, L.D., Monard, D. and Rickenberg, H.V.:
Cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate phosphodiesterase of *Escherichia coli.*
J. Bacteriol. *116:* 857–866 (1973).

5. Solomon, F., Monard, D. and Rentsch, M.:
Stabilization of colchicine-binding activity of neuroblastoma.
J. Mol. Biol. *78:* 569–573 (1973).

6. Monard, D., Solomon, F., Rentsch, M. and Gysin, R.:
Glia-induced morphological differentiation in neuroblastoma cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA *70:* 1894-1897 (1973).

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

8. Solomon, F., Gysin, R., Rentsch, M. and Monard, D.:
Purification of tubulin from neuroblastoma cells: absence of covalently bound phosphate in tubulin from normal and morphologically differentiated cells.
FEBS Letters *63:* 316-319 (1976).

9. Monard, D., Lindsay, R. and Schürch-Rathgeb, Y.:
Problems in the detection of glial factor activity.
Arzneimittel Forschung *272:* 447 (1977).

10. Monard, D., Rentsch, M., Schürch-Rathgeb, Y. and Lindsay, R.M.:
Morphological differentiation of neuroblastoma cells in medium supplemented with delipidated serum.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA *74:* 3893–3897 (1977).

11. Monard, D.:
Cell differentiation and cell interactions: glial-neuronal interactions.
*In:* "Biology of Brain Tumors," O.D. Laerum, D.D. Bigner and M.F. Rajewski (eds.), UICC Technical Report Series, Vol *30:* 65–73 (1978).

12. Schürch-Rathgeb, Y. and Monard, D.:
Brain development influences the appearance of glial factor-like activity in rat brain primary cultures.
Nature *273:* 308–309 (1978).

13. Barde, Y.A., Lindsay, R.M., Monard, D. and Thoenen, H.:
A new glial factor which supports the survival and growth of dissociated sensory neurons.
Nature *274:* 818 (1978).

14. Monard, D.:
Multiplying growth factors.
Nature *282,* 365 (1979).

15. Hinnen, R. and Monard, D.:
Involvement of calcium ions in neuroblastoma neurite extension.
*In:* "Control Mechanisms in Animal Cells," L. Jimenez de Asua et al. (eds.), pp. 315–323, Raven Press, New York (1980).

16. Schürch-Rathgeb, Y. and Monard, D.:
Dissociated brain cell cultures and established cell lines as tools to study the cellular regulation of neurite extension.
*In:* "Tissue Culture in Neurobiology," E. Giacobini et al. (eds.), pp. 321–331, Raven Press, New York (1980).

17. Murato, K. and Monard, D.:
Inhibition of S-adenosylmethionine-linked methylation can lead to neurite extension in neuroblastoma cells.
FEBS Letters *144:* 321–325 (1982).

18. Monard, D., Niday, E., Limat, A. and Solomon, F.:
Inhibition of protease activity can lead to neurite extension in neuroblastoma cells.
Progr. Brain Res. *58:* 359–364 (1983).

19. Monard, D. and Guenther, J.:
Inhibition of proteolytic activity as modulation of neurite outgrowth.
*In:* "The Role of Cell Interactions in Early Neurogenesis," Duprat, A.-M., Kato, A.C. and Weber, M. (eds.), Plenum Publishing Corporation, pp. 307–309 (1984).

20. Monard, D.:
Neuronal behaviour: modulation by protease inhibitors derived from non-neuronal cells.
Cell Biology International Reports *9:* 297–305 (1985).

21. Monard, D., Murato, K. and Guenther, J.:
Glia-induced neurite extension as a model to detect some biochemical interactions between glia and neurons.
*In:* "Hormones and Cell Regulation," Vol. 9, Dumont, J.E. and Hamprecht, B. (eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 391–398 (1985).

22. Monard, D.:
Implications of proteases and protease inhibitors in neurite outgrowth. 36. Colloquium-Mosbach 1985, Neurochemistry, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 7–12 (1985).

23. Guenther, J., Nick H. and Monard, D.:
A glia-derived neurite-promoting factor with protease-inhibitory activity.
EMBO J. *4:* 1963–1966 (1985).

24. Lindner, J., Guenther, J., Nick, H., Zinser, G., Antonicek, H., Schachner, M. and Monard, D.:
Modulation of granule cell migration by a glia-derived protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA *83:* 4568–4571 (1986).

25. Gloor, S., Odink, K., Guenther, J., Nick, H.P. and Monard, D.:
A glia-derived neurite promoting factor with protease inhibitory activity belongs to the protease nexins.
Cell *47:* 687–693 (1986).

26. Stone, S., Nick, H., Hofsteenge, J. and Monard, D.:
Glia-derived neurite-promoting factor is a slow-binding inhibitor of trypsin, thrombin and urokinase.
Arch. Biochem. and Biophys. *252:* 237–244 (1987).

27. Monard, D.:
Role of protease inhibition in cellular migration and neuritic growth.
Biochem. Pharmacology *36:* 1389–1392 (1987).

28. Sommer, J., Gloor, S., Rovelli, G., Hofsteenge, J., Nick, H.P., Meier, R. and Monard, D.:
cDNA sequence coding for a rat glia-derived nexin and its homology to members of the serpin superfamily.
Biochemistry *26:* 6407–6410 (1987).

29. Monard, D.:
Rate limiting events in neurite outgrowth.
*In:* "Cellular and Molecular Aspects of Neural Development and Regeneration," B. Haber (ed.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 115–124 (1988).

30. Halfter, W., Diamantis, I. and Monard, D.:
Migratory behvior of cells on embryonic retina basal lamina.
Devel. Biol. *130:* 259–275 (1988).

31. Zurn, A., Nick, H. and Monard, D.:
A glia-derived nexin promotes neurite outgrowth in cultured chick sympathetic neurons.
Dev. Neurosci. *10:* 17–24 (1988).

32. Monard, D.:
Glia-derived nexins and neurite outgrowth.
*In:* "Current Issues in Neural Regeneration research," P. Reier (ed.), Alan R. Liss, New York, Vol. *48:* 159–165 (1988).

33. Monard, D:
Cell-derived proteases and protease inhibitors as regulators of neurite outgrowth.
TINS, *11:* 541–544 (1988).

34. Reinhard, E., Meier, R., Halfter, W., Rovelli, G. and Monard, D.:
Detection of glia-derived nexin in the olfactory system of the rat.
Neuron *1:* 387–394 (1988).

35. Halfter, W., Reinhard, E., Liverani, D., Ortmann, R. and Monard, D.:
Immunocytochemical localization of glia-derived nexin, laminin and fibronectin on the surface or extracellular matrix of C6 rat glioma cells, astrocytes and fibroblasts.
Eur. J. Neuroscience *1:* 297–308 (1989).

36. Meier, R., Sprayer, P., Ortmann, R., Harel, A. and Monard, D.:
Induction of glia-derived nexin after lesion of a peripheral nerve.
Nature *342:* 548–550 (1989).

37. Monard, D.:
Moleküle, die Zellen wachsen lassen. Der epidermale Wachstumsfaktor.
*In:* "Aus Forschung und Medizin – Moleküle des Lebens," F. Hucho and A. Maelicke (eds.), Schering AG, Berlin, Heft *1:* 47–53 (1989).

38. Monard, D.:
A glia-derived nexin acting as a neurite-promoting factor.
*In:* "Handbook of Experimental Pharmacology: Peptide Growth Factors and their Receptors II," A.B. Roberts and M.B. Sporn (eds.), Springer-Verlag, Vol. *95:* 167–178 (1990).

39. Sommer, J., Meyhack, B., Rovelli, G., Bürgi, R. and Monard, D.:
Expression of glia-derived nexin in yeast.
Gene, *85:* 453–459 (1989).

40. Nick, H., Holsteenge, J., Shaw, E., Rovelli, G. and Monard, D.:
Functional sites of glia-derived nexin (GDN): Importance of the site reacting with the protease.
Biochemistry, *29:* 2417–2421 (1990).

41. Farmer, L., Sommer, J. and Monard, D.:
Glia-derived nexin potentiates neurite extension in hippocampal pyramidal cells in vitro.
Dev. Neurosci., *12:* 73–80 (1990).

42. Rovelli, G., Stuart, S.R., Preissner, K.T. and Monard, D.:
Specific interaction of vitronectin with the cell-secreted protease inhibitor glia-derived nexin (GDN) and the GDN-thrombin complex.
Eur. J. Biochem., in press.

*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:
«Beiträge der Retroviren zur Aufklärung grundlegender biologischer Prozesse»
Professor Dr. Jean-François Borel:
«Entwicklung und Bedeutung des Ciclosporins»

Heft Nr. 13:
Preisverleihung 1985
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Dr. Hans Thoenen:
«Entwicklungsneurobiologie; von der deskriptiven Analyse zum molekularen Verständnis»
Dr. Roberto Montesano:
«Cell-Extracellular Matrix Interactions in Organogenesis»

Heft Nr. 14:
Preisverleihung 1986
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Dr. Ueli Schibler:
«Mechanismen der gewebespezifischen Regulation von Genen»
Professor Dr. Walter Schaffner:
«Enhancer-Sequenzen und die Regulation der Gen-Transkription»

Heft Nr. 15:
Preisverleihung 1987
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Dr. Jacques Louis:
«Rôle des lymphocytes T spécifiques sur l'évolution des lésions induites par leishmania major, un parasite vivant dans les macrophages de leur hôte»
Professor Dr. Joachim H. Seelig:
«Magnetische Resonanz -- ein „magnetisches Auge" zur Untersuchung der Lebensvorgänge in vivo»

Heft Nr. 16:
Preisverleihung 1988
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Jean-Dominique Vassalli:
«Protéolyse et migrations cellulaires: Multiples facettes du contrôle d'une cascade enzymatique»
PD Dr. Hans Hengartner:
«Über die immunologische Toleranz»

Heft Nr. 17:

Preisverleihung 1989
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Dr. Heini Murer:
«Parathormon: Auf dem Weg zum Verständnis seiner Wirkung im proximalen Tubulus»
Dr. Hugh Robson MacDonald:
«Selection of the T Cell Antigen Receptor Repertoire during Development»