

ANGEWANDTE CHEMIE

99. Jahrgang 1987
Heft 8
Seite 727-828

Der Nervenwachstumsfaktor: 35 Jahre später (Nobelvortrag)**

Von Rita Levi-Montalcini*

1. Neurogenese: die ersten experimentellen Untersuchungen

„Embryogenesis is in some way a model system. It has always been distinguished by the exactitude even puctilio, of its anatomical descriptions. An experiment by one of the great masters of embryology could be made the text of a discourse on scientific method. But something is wrong, or has been wrong. There is no *theory* of development in the sense in which Mendelism is a theory that accounts for the results of breeding experiments. There has therefore been little sense of progression or timeliness about embryological research. Of many papers delivered at embryological meetings, however good they may be in themselves ... one too often feels that they might have been delivered five years beforehand without making anyone much the wiser, or deferred for five years without making anyone conscious of a great loss.“^[1]

Das Gefühl der Frustration, das von Peter Medawar in diesen Betrachtungen so deutlich zum Ausdruck gebracht wird, beherrschte in den vierziger Jahren das Gebiet der experimentellen Embryologie, das in der Mitte der dreißiger Jahre mit lautem Beifall bedacht worden war, als die Oberlippe des Amphibienblastoporen diese Richtung biologischer Forschung in den Mittelpunkt des Interesses rückte. Der Zweig der experimentellen Neuroembryologie, der dem gemeinsamen Stamm entsprossen war und sich nur der Erforschung der trophischen Wechselwirkungen zwischen neuronalen Zellpopulationen sowie zwischen

diesen und den innervierten Organen und Geweben widmet, war damals in seiner ersten kräftigen Wachstumsphase. Dann wieder ließ der Enthusiasmus deutlich nach, der die Pioniere auf diesem Arbeitsgebiet beseelt hatte, seit R. G. Harrison 1935 seine gefeierte Vorlesung über dieses Thema vor der Royal Society in London gehalten hatte^[2]. Obwohl dieser Wechsel zwischen Wachstums- und Schrumpfungsphasen eher die Regel als die Ausnahme auf allen Gebieten menschlichen Strebens ist, ist bei den biologischen Wissenschaften die Schrumpfungsphase nur allzuoft Anzeichen eines gerechtfertigten Verlusts an Vertrauen in den intellektuellen und methodischen Ansatz, der vorher zu so viel Hoffnung Anlaß gegeben hatte.

Eine kurze Darstellung, wie die experimentelle Neuroembryologie in den vierziger Jahren aussah, als das Interesse an diesem Forschungsansatz schwand, ist notwendige Voraussetzung für ein Verständnis des gänzlich unvorhergesehenen Umschwungs, der schließlich zur Entdeckung des Nervenwachstumsfaktors (nerve growth factor, NGF) führte.

2. Experimentelle Neuroembryologie in den vierziger Jahren

1934 setzte Viktor Hamburger das Hühnerembryo an die Stelle der Amphibienlarve als Objekt der Wahl, um die Auswirkungen der Entfernung von Gliederknospen auf motorische Rückenmarksneuronen und sensorische Nervenzellen, die diese Glieder innervieren, studieren zu können^[3]. Dies war der Beginn einer langen Reihe von Untersuchungen, in deren Mittelpunkt die Analyse dieses und verwandter experimenteller Systeme in Vogelembryonen stand. Ich werde hier nur die wesentlichen Vorteile aufzählen, die das Hühnerembryo als Objekt neurologischer Forschung gegenüber der Amphibienlarve bot.

[*] Prof. Dr. Rita Levi-Montalcini
Istituto di Biologica Cellulare
Consiglio Nazionale delle Ricerche
Via G. Romagnosi 18 A, I-00196 Rom (Italien)

[**] Copyright © The Nobel Foundation 1987. - Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

Im Vergleich mit dem Nervensystem der Amphibien ist das der Vögel viel sorgfältiger ausgearbeitet, und es eignet sich besser als das der niederen Wirbeltiere zu einer gründlichen Untersuchung seiner Nervenzentren. Ausführliche und grundlegende Studien über das Nervensystem des Hühnerembryos, unter Anwendung der extrem nützlichen Silberfärbtechniken von *Ramon y Cajal* et al., die kürzlich von mir und anderen noch erweitert wurden^[4,5], lieferten eine sehr genaue Beschreibung der meisten Nervenzentren und ihrer Entwicklungsgeschichte während der Neurogenese. Damit konnte man auch geringe Abweichungen von der normalen Entwicklung in experimentell manipulierten Embryonen erkennen. Im Unterschied zu den ontogenetischen Prozessen bei den Amphibien entfalten sich diese in Hühnerembryonen gemäß einem strengen Zeitplan, von dem nie abgewichen wird. Deshalb kann man zentrale und periphere Nervenzentren von Versuchs- und Kontrolltieren vergleichen, wenn man die Embryonen bei gleicher Temperatur und bei gleichen anderen Umweltbedingungen inkubiert. Die Untersuchungen bei der Amphibienlarve wurden auf das Gehirn, das Rückenmark und das periphere Nervensystem ausgedehnt; auch die Randbedingungen der Versuche wurden dabei variiert. Beim Hühnerembryo blieben die Untersuchungen darauf beschränkt, welche Folgen das Entfernen von Gliederansätzen oder die Implantation zusätzlicher Flügel- oder Beinknospen auf die sie innervierenden motorischen und sensorischen Nervenzentren hat. 1934 veröffentlichte *Viktor Hamburger* einen Artikel^[3] über die Auswirkungen der Amputation eines Flügelansatzes auf die Entwicklung des brachialen motorischen Rückenmarksegments und der sensorischen Spinalganglien. Er kam zu der Schlußfolgerung, daß die Hypoplasie motorischer Nervenzellen des Vorderhorns und anderer Nervenzellen des gleichen Rückenmarkabschnittes von einem Verlust an Reizen herrührte, die zentripetal von Nervenfasern der ersten differenzierten Neuronen übertragen wurden. Diese wirken normalerweise regulatorisch auf Proliferation und Differenzierung benachbarter Nervenzellen ein. Eine erneute Untersuchung der Folgen einer Gliedernospenamputation wies auf einen anderen Mechanismus hin, durch den Nervenzentren während ihrer Entwicklung durch peripheres Gewebe kontrolliert werden. Durch Reihenuntersuchungen silbergefärbter Embryonen kamen wir zu dem Schluß, daß die schwere Hypoplasie von Nervenzentren, die ihrer Innervierungsfelder beraubt waren, durch den Tod differenzierter Neuronen hervorgerufen wurde und nicht durch einen fehlenden Ersatz von Neuronen aus einem Pool noch nicht differenzierter Nervenzellvorläufer^[6,7]. 1947 lud mich *Hamburger* ein, mit ihm zusammen dieses Problem erneut zu untersuchen. Diese Einladung war der Beginn eines dreißigjährigen Aufenthaltes an der Washington University und meiner lebenslangen Freundschaft mit *Viktor*. Unser Artikel von 1949^[7] bestätigte die Hypothese, die zunächst von *G. Levi* und mir aufgestellt worden war. Die Freude über diese Bestätigung eines wichtigen theoretischen Sachverhalts und die erfolgreiche Untersuchung anderer neuroembryologischer Probleme wurde allerdings getrübt, als wir erkannten, wie niedrig das Auflösungsvermögen der Techniken war, mit denen wir die äußerst komplexen neurogenetischen Prozesse gründlich erforschen wollten^[8,9]. Wir erlagen dennoch nicht der Versuchung, die experimentellen

Studien zur Entwicklung des Nervensystems aufzugeben und auf das Feld der Phagenforschung überzuwechseln, das in den vierziger Jahren in voller Blüte stand. Grund dafür waren die nicht vorhersehbaren und äußerst glücklichen Ereignisse, die zu dieser Zeit eintraten und ein neues Zeitalter in der Entwicklungsneurobiologie eröffneten.

3. Der unerwartete Durchbruch: ein Geschenk von Tumorgeweben

1948 veröffentlichte *Elmer Bueker*, ein ehemaliger Student von *Viktor Hamburger*, die Ergebnisse eines kühnen und geistreichen Experiments, in dem er Fragmente des Mäusesarkoms 180 in die Körperhülle drei Tage alter Hühnerembryonen verpflanzt hatte. Die histologische Untersuchung der Embryonen nach drei bis fünf Tagen ergab, daß sensorische Nervenfasern aus benachbarten Spinalganglien in das neoplastische Gewebe vorgestoßen waren, während motorische Nervenfasern nicht in den Tumor eindrangen^[10]. Der Autor folgerte daraus, daß histochemische Eigenschaften des schnell wachsenden Maussarkoms günstige Bedingungen für das Wachstum sensorischer Fasern schufen. Daraus wiederum ergab sich eine geringe, aber gleichmäßige Volumenzunahme dieser Ganglien im Vergleich mit den homologen Ganglien, die den gegenüberliegenden Flügel innervierten. *Viktor* und ich untersuchten von neuem dieses erstaunliche Phänomen und wandten dabei die Methodik an, die ich während meiner ersten neuroembryologischen Studien ausgearbeitet hatte. Jeden Tag sahen wir uns die Serienschnitte an, die von Kontroll- und Versuchstieren angelegt und mit spezifischen Silbertechniken angefärbt worden waren. Unsere Ergebnisse bestätigten die von *Bueker*, zeigten aber gleichzeitig andere Effekte der Transplantation des Maustumors auf, die kaum zu der Hypothese paßten, daß sie von der gleichen Größenordnung und gleichen Art seien wie diejenigen, die die Transplantation gesunden Embryonalgewebes hervorrief. Von letzteren unterschieden sie sich hauptsächlich in folgenden Punkten: es drangen nicht nur sensorische, sondern auch sympathische Fasern in die neoplastischen Gewebe ein, wo sie ein außerordentlich dichtes Netzwerk bildeten; Nervenfasern verzweigten sich ohne festes Muster zwischen den Tumorzellen, knüpften aber keine synaptischen Verbindungen zwischen diesen; sensorische und sympathische Ganglien, die den Tumor innervierten, nahmen stetig an Volumen zu, die sympathischen Ganglien waren schließlich etwa sechsmal größer als die entsprechenden Kontrollganglien^[11].

Nachfolgende Experimente enthüllten eine weitere erstaunliche Abweichung von der Norm in Embryonen, die ein Transplantat des Maussarkoms 180 oder eines anderen Tumors identischen Ursprungs, bekannt als Sarkom 37, trugen. Es stellte sich heraus, daß innere embryonale Organe, die in gesunden Tieren nicht innerviert werden, wie z. B. die Mesonephren (Urnieren), oder die erst spät während der Entwicklung spärlich innerviert werden, wie z. B. die Drüsen der Sexualorgane, die Schilddrüse und die Milz, von sympathischen Nervenfasern schon in frühen Embryonalstadien durchzogen wurden^[12]. Eine offenkundige Verletzung aller Regeln der Entwicklungsbiologie kam ans Licht, als wir dicke sympathi-

sche Faserbündel in den Venen der behandelten Tiere fanden, wo sie in der Form großer Neurome die Blutzirkulation behinderten (Abb. 1). Alle sympathischen Grenzstränge, und nicht nur die neben oder in direktem Kontakt mit

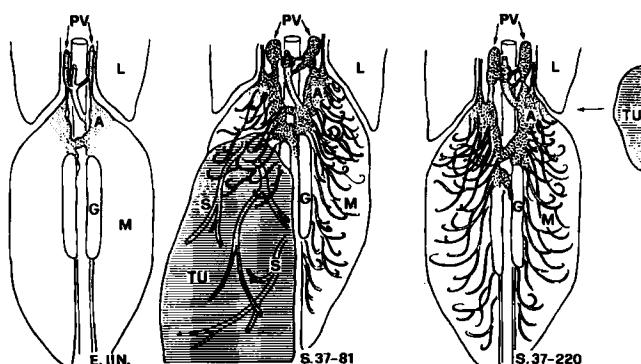


Abb. 1. Halbschematische Rekonstruktion eines normalen 11 Tage alten Hühnerembryos (E. II N.), eines 11 Tage alten Embryos mit einem intraembryonalen Transplantat eines Maussarkoms (S. 37-81) und eines 11 Tage alten Embryos mit einem Transplantat des Sarkoms 37 auf der Atmungsmembran (S. 37-220). Man beachte das hyperplastische Wachstum des prävertebralen Ganglionstranges in Embryonen mit Tumortransplantaten. Nervenfasern für die inneren Organe dringen aus diesem Strang in die in der Nähe gelegenen Mesonephren ein. A: Nebenniere; G: Gonadenanlage; L: Lunge; M: Mesonephron; PV: prävertebrale Ganglien; S: sensorische Nerven; Tu: Tumor (Quelle [12]).

dem neoplastischen Gewebe, waren außerordentlich vergrößert. Wir vermuteten, die neoplastischen Zellen könnten eine lösliche und diffusionsfähige Substanz freisetzen, die die Differenzierungs- und Wachstumseigenschaften ihrer Zielzellen veränderte und so diese ungewöhnlichen Effekte mit sich brachte. Diese Hypothese wurde vollständig bestätigt, als wir jeweils den einen der beiden Maustumoren auf die Atmungsmembran vier bis sechs Tage alter Hühnerembryonen verpflanzten, so daß direkter Kontakt zwischen embryonalem und neoplastischem Gewebe nicht möglich war (Abb. 2). Embryonales und Tumorgewebe standen aber über das Kreislaufsystem miteinander in Verbindung. Diese Transplantate außerhalb des Embryos hatten die gleichen Auswirkungen wie innerembryonale; somit war schlüssig bewiesen, daß der tumorale, das Nervenwachstum fördernde Faktor frei diffundieren kann^[12, 13].

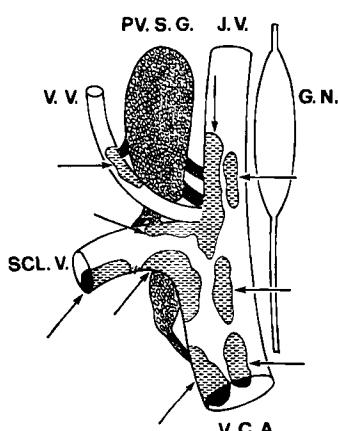


Abb. 2. 16 Tage alter Hühnerembryo mit intraembryonalem Tumor (Sarkom 180). Sympathische Nervenfasern wachsen in die Vena iugularis (J. V.), Vena vertebralis (V. V.), Vena subclavia (SCL. V.) und Vena cava anterior (V. C. A.). G. N.: Ganglion nodosum; PV. S. G.: prävertebrales sympathisches Ganglion. Pfeile deuten auf Nervenagglomerationen hin (Quelle [12]).

Ohne Erfolg blieben Versuche, diese Effekte auch durch Implantation getrockneter Tumorpellets oder durch Injektion von Sarkomextrakten hervorzurufen. Daraufhin dachte ich daran, auf die Technik der Gewebekultur zurückzugreifen, die ich mit G. Levi schon an der Universität Turin angewendet hatte. Da wir auf diesem Gebiet im Institut für Zoologie der Washington University apparativ nicht gut ausgestattet waren, fragte ich Professor Carlos Chagas, der Direktor am biophysikalischen Institut der Universität von Brasilien in Rio de Janeiro war, ob er mich als wissenschaftlichen Gast an seinem Institut aufnehmen würde. Dort hatte Hertha Meyer, eine Freundin von mir, eine sehr leistungsfähige Abteilung für Gewebekultur aufgebaut und war deren Direktor. Nach Billigung und Einladung durch Professor Chagas flog ich nach Rio de Janeiro. In meinem Gepäck hatte ich zwei Mäuse, die Transplantate der Sarkome 180 und 37 trugen.

4. Der Nervenwachstumsfaktor: erste Auftritte in vitro und in vivo

„The tumor had given a first hint of its existence in St. Louis but it was in Rio de Janeiro that it revealed itself, and it did so in a theatrical and grand way, as if spurred by the bright atmosphere of that explosive and exuberant manifestation of life that is the Carnival in Rio.“^[14]

Die Entdeckung, daß Wachstum durch eine lösliche Substanz aus dem Tumor angeregt werden kann, zeigte auch, daß Nervenzellen während ihrer Entwicklung für bisher unbekannte humorale Faktoren empfänglich waren und öffnete so ein völlig neues Forschungsgebiet. Der biologische in-vitro-Test erwies sich als ein praktisches und wertvolles Werkzeug, mit dessen Hilfe man den Faktor jetzt genau charakterisieren konnte, und er ebnete den Weg zur Untersuchung seines Wirkungsmechanismus. Tuschezeichnungen, die ich mehreren Briefen an Viktor aus Rio beilegte, geben beredt Zeugnis über die spektakuläre Art und Weise, auf die sich die noch unbekannte Substanz selbst offenbarte. Verpflanzte man sensorische und sympathische Ganglien aus acht Tage alten Hühnerembryonen in einem Nährmedium in die Nähe von Fragmenten der Maussarkome 180 oder 37, ohne daß sie mit diesen in direktem Kontakt standen, so entwickelten sie in 24 Stunden einen extrem dichten Kranz von Nervenfasern auf der dem Tumor zugewandten Seite (Abb. 3b)^[15]. Der euphorische Zustand aufgrund dieser Entdeckung wurde aber kurz danach wieder etwas gedämpft, als wir herausfanden, daß im Unterschied zum Embryonalgewebe des Huhns gesundes Gewebe der Maus einen schwächeren, aber im wesentlichen gleichen Effekt wie die Maussarkome hervorrief (Abb. 3a). Zurückblickend hätte uns das schon damals auf einen neuen und noch bedeutsameren Aspekt dieser in-vitro-Experimente aufmerksam machen müssen, nämlich die weite Verbreitung des Faktors mit Nervenwachstum fördernder Aktivität in gesunden und neoplastischen Geweben. Daß wir die Bedeutung dieses „Maus-Effekts“ nicht erkannten, war aber eher von Nutzen, da während der nächsten beiden Jahre unsere Aufmerksamkeit ganz auf die Untersuchung der chemischen Natur des Faktors gerichtet war, der von den beiden Maussarkomen in viel größeren Mengen als von gesundem Gewebe der Maus freigesetzt wurde.

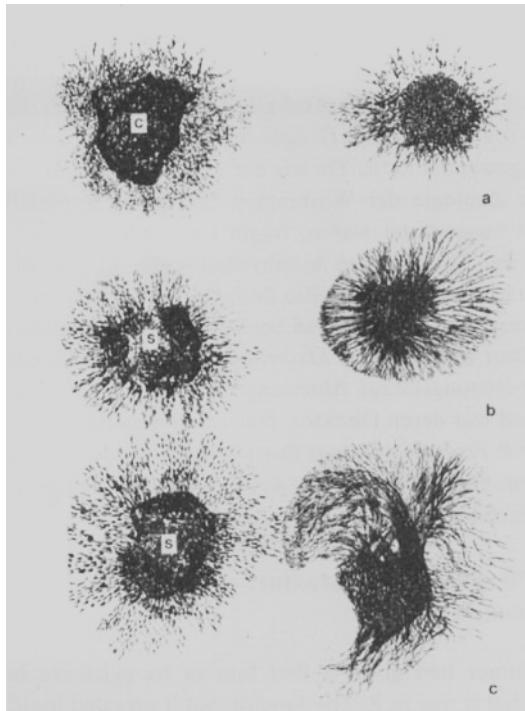


Abb. 3. Zeichnungen des in-vitro-Strahlenkranz-Effekts bei acht Tage alten sensorischen Ganglien von Hühnerembryonen, die 24 (b) oder 48 (c) Stunden in Gegenwart von Fragmenten des Maussarkoms 180 kultiviert wurden. In (a) zeigt das Ganglion (rechts), das einem Fragment embryonalen Hühnergewebes (links) gegenüberliegt, Fibroblasten, aber wenig Nervenfasern. In (b) und (c) liegen die Ganglien (rechts) Fragmenten des Sarkoms 180 (links) gegenüber und weisen den typischen Strahlenkranz-Effekt auf, der durch den Wachstumsfaktor aus dem Sarkom hervorgerufen wird. Man beachte in (c) den ersten Hinweis auf einen neurotropen Effekt des Wachstumsfaktors.

Stanley Cohen, ein junger Biochemiker, der sich unserer Arbeitsgruppe kurz vor meiner Rückkehr aus Rio angeschlossen hatte, isolierte aus den beiden Tumoren eine Fraktion, die Nucleinsäuren und Proteine enthielt und die in vitro eine das Nervenwachstum fördernde Aktivität aufwies^[16]. Zufall, und nicht geplante Forschung, führten jetzt auf äußerst glückliche Weise in eine neue Richtung. Um die Nucleinsäuren aus der aktiven Fraktion zu entfernen, benützte *Stan* Schlangengift, das neben anderen Enzymen auch das Nucleinsäuren abbauende Enzym Phosphodiesterase enthält. Fügte man das Gift in geringen Mengen der Nucleoprotein-Fraktion aus den Tumoren zu, so sollte dies die Bildung des Faserkränzes unterdrücken, falls Nucleinsäuren und nicht Proteine für den nervenwachstumsfördernden Effekt dieser Fraktion verantwortlich waren. Das überraschende Ergebnis war ein noch dichterer Faserkrantz um die Ganglien, die mit der Tumorfraction nach Behandlung mit Schlangengift inkubiert worden waren. Da ein dichter Krantz auch um die Ganglien herum entstand, die mit geringen Mengen an Schlangengift allein kultiviert worden waren, stand fest, daß das Gift selbst eine reichhaltige Quelle für nervenwachstumsfördernde Aktivität war. Durch biochemische Untersuchungen konnte *Cohen* in der Tat zeigen, daß 15 000 µg von Sarkom-180-Homogenat und 6 µg des Gifts der Mokassinschlange gleiche Wachstumsstimulation hervorriefen. Aus dem Schlangengift konnte er nach mehreren Reinigungsstufen eine nicht dialysierbare, hitzelabile Substanz mit nervenwachstumsfördernder Aktivität isolieren, die als ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 20000 Da

identifiziert wurde^[17, 18]. Mikrogramm-Mengen dieser gereinigten Schlangengift-Fraktion wurden täglich in den Dottersack sechs bis acht Tage alter Hühnerembryonen während eines Zeitraums von drei bis fünf Tagen injiziert und führten zum übermäßigen Wachstum sensorischer und sympathischer Ganglien und ihrer Fasern. Sympathische Nervenfaserbündel verzweigten stark in die inneren Organe und drangen in die Hohlräume der Venen vor; bis in jedes Detail waren also die gleichen Effekte wie nach Transplantation der Maussarkome zu sehen^[19].

Waren wir eher zufällig auf zwei reichhaltige Quellen nervenwachstumsfördernder Aktivität in den Maussarkomen und im Schlangengift gestoßen, so war es das Ergebnis geplanter Forschung, als wir herausfanden, daß man einen noch dichter gepackten Faserkranz erhielt, wenn man Extrakte der Unterkieferspeicheldrüse der Maus in winzigen Mengen dem Kulturmedium zufügte. Diese Drüsen sind Homologe der Giftdrüsen der Schlangen, und deshalb war *Stanley Cohen* der Meinung, sie seien von all den getesteten Organen am ehesten in der Lage, Nervenwachstumsfaktor (NGF) zu speichern. Schon bald konnte *Cohen* den Speicheldrüsenfaktor reinigen, als Protein identifizieren und sein Molekulargewicht zu 44000 Da bestimmen^[20]. Er war in größeren Mengen als der Schlangengiftfaktor vorhanden und erwies sich als weniger toxisch, wenn er hochgereinigt injiziert wurde; das ermöglichte die Erforschung seiner biologischen Aktivität in neugeborenen, jungen und erwachsenen Säugetieren^[21]. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bedeuteten den Beginn einer ausführlichen und systematischen in-vivo- und in-vitro-Analyse des NGFs aus der Speicheldrüse, seiner chemischen Struktur, seines Wirkmechanismus und seines Wirkspektrums. Nur die wichtigsten Ergebnisse, die verschiedene Laboratorien in Original- und Übersichtsartikeln veröffentlichten, sollen im folgenden berücksichtigt werden.

5. Die entscheidende Rolle von NGF im Leben seiner Zielzellen

Trotz oder vielleicht sogar wegen seiner höchst ungewöhnlichen und etwas aus dem Rahmen fallenden Auswirkungen auf lebende Organismen und auf in-vitro-Systeme fand der NGF zunächst keine begeisterte Aufnahme bei den Wissenschaftlern. Ein Anzeichen dafür war auch das zögernde Engagement anderer Forscher auf diesem Gebiet. Der Befund, daß ein Protein aus so unterschiedlichen Quellen wie dem Maussarkom, dem Schlangengift und der Speicheldrüse der Maus eine so außerordentlich störende Wirkung auf normale neurogenetische Prozesse ausübte, paßte in keines der bekannten Konzepte und schien auch nicht mit den üblichen Kontrollmechanismen während der Ontogenese in Beziehung zu stehen. In dieser skeptischen Atmosphäre demonstrierte der NGF auf höchst nachdrückliche Weise seine entscheidende Rolle im Leben seiner Zielzellen. Frühere in-vitro-Experimente hatten gezeigt, daß die Inkubation von Schlangengift mit seinem Antiserum das durch Schlangengift-NGF induzierte Faserwachstum inhibierte. In ähnlicher Weise verhinderte ein spezifisches Antiserum gegen Speicheldrüsen-NGF die Bildung des Faserkränzes in der Kulturschale. Aufgrund dieser Ergebnisse überprüften wir den Effekt täglicher In-

jektionen kleiner Mengen dieses Antiserums in neugeborenen Mäusen. Als wir die so behandelten Mäuse nach einem Monat unter dem Stereo- und dem (normalen) optischen Mikroskop untersuchten, fanden wir fast keine sympathischen para- und prävertebralen Grenzstränge mehr^[22-24]. Dieser dramatische Effekt wurde als Immunosympathektomie bekannt^[25,26]. Er beraubt neugeborene Nagetiere und andere Säuretiere nach Injektion von Antiserum gegen den Speicheldrüsen-NGF ihres sympathischen Nervensystems, ohne ihre normale Entwicklung und Lebensfähigkeit zu stören. Die gleiche Behandlung wirkt sich in heranwachsenden und reifen Tieren nicht so schädigend aus.

Zwei Hypothesen wurden herangezogen, um den Mechanismus dieser schädigenden Wirkung des Antiserums zu erklären: 1) Ein cytotoxischer Effekt, der durch das Komplementsystem vermittelt wird, oder 2) Inaktivierung des NGFs oder eines ähnlichen Proteins, das für Differenzierung und Überleben sympathischer Nervenzellen wesentlich ist. Obwohl in den frühen Artikeln der ersten Hypothese der Vorzug gegeben wurde, fand die zweite nach und nach mehr Zustimmung und wird heute allgemein akzeptiert, und zwar aufgrund des eben beschriebenen Versuchs, aber auch aufgrund eines anderen in-vitro-Experiments, das einen weiteren eindeutigen Beweis für die wichtige Rolle von NGF während der frühen Entwicklungsstadien seiner Zielzellen lieferte. Wir trennten die sensorischen und sympathischen Nervenzellen der Ganglien acht bis elf Tage alter Hühnerembryonen und inkubierten sie in einem Minimalmedium. Die Nervenzellen überlebten nur, wenn man dem Kulturmedium täglich Nanogramm-Mengen an NGF zufügte^[27]. Spätere Experimente zeigten, daß die Behandlung von Nagetierfröten mit NGF-Antiserum^[28,29] und die Autoimmunisierung schwangerer Ratten gegen endogenen NGF die normale Entwicklung sensorischer Ganglien verhindert^[30]. Somit war die Rolle des NGFs während der frühen Phasen der Entwicklung sensorischer Nervenzellen nochmals bestätigt worden.

6. NGF als retrograder trophischer Messenger und als neurotroper Faktor

Es war also bewiesen, daß im Blut zirkulierender endogener NGF durch NGF-Antiserum neutralisiert wird^[31] und so zur Immunosympathektomie führt. Daran anschließend konnten die beiden Fragen, wie NGF seine Zielzellen erreicht und wo er synthetisiert wird, durch pharmakologische und chirurgische Experimente befriedigend beantwortet werden; im Hinblick auf das Interesse an diesen Problemen sollen die Methoden und wesentlichen Ergebnisse kurz dargestellt werden.

Verabreicht man neugeborenen Nagetieren Pharmaka, wie z. B. 6-Hydroxydopamin, das adrenerge Nervenenden zerstört^[32], oder Vinblastin, das den axonalen Transport blockiert, so sterben die meisten sympathischen Nervenzellen in ihrer aktivsten Differenzierungs- und Wachstumsphase ab. Die degenerativen Auswirkungen dieser Pharmaka lassen sich quantitativ gut mit denen des NGF-Antisera vergleichen und führen zur Zerstörung sympathischer para- und prävertebraler Ganglien durch einen Prozeß, der als chemische Sympathektomie bekannt wur-

de^[32,33]. Ein drittes Experiment, die chirurgische Durchtrennung postganglionärer Axone des oberen Halsganglions in neugeborenen Nagetieren, führt zum Absterben von etwa 90% unreifer sympathischer Zellen in diesem Ganglion^[34]. Da in all diesen Versuchen der Tod der Nervenzellen durch Zusatz von exogenem NGF verhindert werden kann^[30,35-37], ist die wichtige Rolle dieses Moleküls im Leben und für die Differenzierung dieser Zellen bewiesen. In der Folge konnte gezeigt werden, daß markierter NGF von den Nervenenden sympathischer^[38] und sensorischer Neuronen^[39] aufgenommen und retrograd zum Perikaryon transportiert wird. Dieser Befund untermauerte die Vorstellung von NGF als trophischem Messenger, der durch Nervenfasern von peripheren Zellen zu den innervierenden Neuronen befördert wird. Unterbricht man die Verbindung zwischen den Zellen durch chemische oder chirurgische Axotomie, so führt dies zum Tod differenzierender Neuronen, die jetzt dieses wichtigen Moleküls beraubt sind.

Zur gleichen Zeit, zu der die lebenswichtige Rolle von NGF für sympathische und sensorische Nervenzellen während der Entwicklung und sein retrograder Transport aus peripherem Gewebe bewiesen worden waren, konnte in verschiedenen in-vivo- und in-vitro-Experimenten eine weitere wesentliche Eigenschaft von NGF endgültig bestätigt werden: NGF ist in der Lage, Axone sensorischer und sympathischer Fasern während des Wachstums oder der Regeneration in Richtung seines Konzentrationsgradienten zu leiten (Neurotropismus)^[40-45].

Der erste wichtige Hinweis auf einen neurotropen Effekt von NGF stammte aus Experimenten, in denen täglich NGF in den Boden des vierten Ventrikels injiziert wurde. Nach siebentägiger Behandlung drangen Faserbündel aus sympathischen Ganglien in das Neuralrohr und endeten an der Stelle des experimentell erzeugten NGF-Pools (Abb. 4)^[40,41]. In-vitro-Experimente bewiesen noch schlüs-

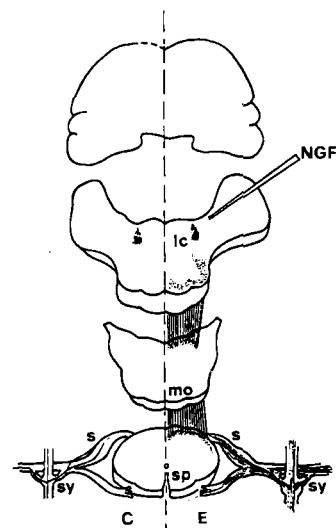


Abb. 4. Schematische Darstellung sympathischer Faserbündel, die in Rückenmark und Medulla oblongata aus benachbarten sympathischen Ganglien eindringen, wenn man neugeborenen Ratten NGF intracerebral injiziert. Linke Hälfte: Kontrolle (C). Rechte Hälfte: Versuchstier (E). NGF: Injektionsstelle von NGF in den Boden des vierten Ventrikels; lc: Locus caeruleus; mo: Medulla oblongata; sp: Rückenmark; s: sensorische Ganglien; sy: sympathische Ganglien. Sympathische Fasern kreuzen das sensorische Ganglion und dringen zusammen mit den hinteren Wurzeln in das Neuralrohr ein (Quelle [40]).

siger, daß Neurite von NGF-Zielzellen an einem NGF-Konzentrationsgradienten entlang wachsen, und daß sie von ihrer ursprünglichen Bahn abweichen, wenn man die Position der Pipette, die NGF freisetzt, ändert^[42]. Während diese Experimente eindeutig zeigten, daß der neurotrope Effekt von NGF unabhängig von seiner neurotrophischen Wirkung ist, beantworteten sie nicht die Frage, ob dieser Effekt von einer lokalen Kontrolle des Wachstumskegels^[43], einer geänderten Adhäsion dieser Organelle am Substrat^[44, 45] oder einem anderen Mechanismus^[46, 47] herführt.

7. Neuronale und nicht-neuronale Zielzellen

Die bis heute gut charakterisierten NGF-Zielzellen können in drei Kategorien eingeteilt werden (Tabelle 1): 1) Abkömmlinge der Neuralwülste; 2) Neuronen des zentralen Nervensystems; 3) Zellen nicht-neuronaler Ursprungs. Bezuglich einer sorgfältigen Analyse der vielen verschiedenen Auswirkungen von NGF auf jede dieser Zellen sei der Leser auf Übersichtsartikel verwiesen^[47-52]. Ich möchte in diesem Zusammenhang nur einige allgemeine Bemerkungen machen.

Tabelle 1. Einteilung der NGF-Zielzellen.

Abkömmlinge der Neuralwülste	Sympathoadrenale Zellen	Lange sympathische Neuronen
		Kurze sympathische Neuronen
Neuronen des zentralen Nervensystems	Cholinerge Neuronen	Paraganglien-Zellen (Glomus caroticum und abdominale Paraganglien)
		SIF (small intensely fluorescent)-Zellen
Zellen nicht-neuronaler Ursprungs	Adrenerge, indolaminerge und peptiderge Neuronen	Chromaffine Zellen
		normal neoplastisch (PC12)
Sensorische Neuronen		
Corpus striatum, Vorderhirn, Septum, Brocasches Zentrum	Xenopus-laevis-Kaulquappe	
Mastzellen		

Eine allgemein gültige Regel ist, daß alle Zellen auf NGF am besten sehr früh in ihrer Differenzierung ansprechen; die Reaktion wird bei der reifen Zelle immer schwächer, verschwindet aber niemals vollständig. Lange sympathische und sensorische Neuronen, und besonders die des dorsomedialen Quadranten des Rückenmarks des Hühnerembryos^[12], geben ein sehr gutes System ab, an dem man die drei Haupt-eigenschaften von NGF aufzeigen kann: 1) seine lebenswichtige trophische Rolle während der frühen

Entwicklungsstadien, 2) seine Fähigkeit, differenzierende Prozesse wie das Neuritenwachstum zu fördern, und 3) seine Fähigkeit, Neurite während des Wachstums oder der Regeneration an seinem Konzentrationsgradienten entlang zu leiten^[43, 44].

Diese Zellen waren zugleich ein in-vivo-Modellsystem zur Untersuchung der Enzyminduktion bei der Neurotransmittersynthese^[53], und in ihnen konnten auch zum ersten Mal der retrograde Transport von NGF^[54] und seine Rolle als trophischer Messenger^[55] bewiesen werden. Während sensorische und sympathische Zellen also eine Schlüsselrolle bei der Erforschung der eben genannten Eigenschaften von NGF spielten, wurden chromaffine Zellen und ihr neoplastisches Gegenstück, die klonale Zelllinie PC12, zum Modell der Wahl, um die Fähigkeit von NGF zu untersuchen, Phänotypexpression und deren molekularen Mechanismus zu modulieren^[56]. Die Veränderung im Phänotyp, die NGF in chromaffinen^[57, 58] und PC12-Zellen^[56, 59] hervorruft, ist so bekannt, daß man sie nicht in allen Einzelheiten beschreiben muß. Zusammengefaßt erhält man eine neuronale Differenzierung dieser Zellen, begleitet von einer Vielzahl chemischer, ultrastruktureller und morphologischer Veränderungen, die eher für einen neuronalen als einen glandulären Phänotyp charakteristisch sind^[50]. In diesen Zellen entdeckte man auch die erstaunliche Fähigkeit von NGF, sowohl als mitogene^[60] als auch als antimitotische^[56] Substanz zu wirken, und das sogar innerhalb derselben klonalen Zelllinie PC12 und einer Mutante davon^[61]. Das wiederum war ein Hinweis auf die Vielseitigkeit von NGF-Rezeptoren und ihres Transduktionsapparates, dessen Botschaft offensichtlich je nach Zelltyp und -vorgeschichte verschieden gelesen und interpretiert wird. Das „Priming“-Modell, das auf molekularer Ebene das sehr schnelle bzw. sehr langsame Einsetzen des Neuritenwachstums in sensorischen und sympathischen Zellen auf der einen Seite^[24] und PC12-Zellen auf der anderen Seite^[50] erklären soll, ist ein ausgezeichnetes Beispiel dafür, welchen Beitrag diese letztgenannten Zellen für das Studium der Wirkungsweise von NGF liefern können.

Die weitgefächerten Effekte von NGF werden auch durch andere sympatho-adrenale Zellen demonstriert, z. B. die Paraganglien, die SIF(small intensely fluorescent)-Zellen und die Zellen des Glomus caroticum^[62-64]. Die Fähigkeit von NGF, Phänotypexpression zu modulieren, wird besonders durch die SIF-Zellen verdeutlicht, von denen man annimmt, daß sie unmittelbare Vorläufer von sympathischen und chromaffinen Zellen sind. Werden diese Zellen unter geeigneten Bedingungen kultiviert, können sie in Medien mit NGF oder Dexamethason den einen oder anderen Phänotyp exprimieren^[63, 64]. Dieses Wechselspiel zwischen NGF und Steroidhormonen sogar in voll ausdifferenzierten Zellen wird auch indirekt durch in-vivo-Untersuchungen an kurzen adrenergen Neuronen nahegelegt, die in beiden Geschlechtern das Urogenitalsystem innervieren^[65].

Erst kürzlich kamen zwei neue Populationen als Studienobjekte für NGF-Zielzellen hinzu: Neuronen des zentralen Nervensystems (ZNS) und Zellen aus dem hämatopoietischen System.

Kleine und große neuronale Populationen in verschiedenen Gehirnregionen zeigen alle Eigenschaften und Reaktionen, die für sensorische und sympathische Zellen cha-

rakteristisch sind. Dazu gehören 1) das Vorhandensein spezifischer Rezeptoren^[66], 2) retrograder Transport von NGF^[67], 3) gesteigerte Synthese von Neurotransmittern, besonders von Acetylcholin^[68-70], und 4) die trophische Reaktion, die nach Applikation von exogenem NGF vor dem Zelltod durch spezielle schädigende Substanzen oder chirurgische Eingriffe schützt^[71, 72]. NGF könnte auch eine Rolle in der Entwicklung bislang nicht näher identifizierter Gebiete des Hypothalamus spielen, da man herausfand, daß Injektionen affinitätschromatographisch gereinigter polyklonaler Antikörper gegen NGF in Rattenköten ein schweres, postnatales, neuroendokrines Syndrom zur Folge haben^[29]. Schließlich konnte gezeigt werden, daß andere Nervenzellen, vor allem im Hippocampus und Cortex, große Mengen an NGF-mRNA und NGF-Protein synthetisieren; somit fand man also ein funktionelles Bindeglied zwischen NGF-produzierenden Zellen und solchen, die auf NGF ansprechen, und der Kreis für NGF im Gehirn schloß sich^[73-75]. Obwohl das Wirkspektrum von NGF im ZNS qualitativ mit dem in peripheren Neuronen vergleichbar ist, wird der letzte Abschnitt dieses Beitrags deutlich machen, daß die tatsächliche Rolle von NGF im Gehirn bei weitem nicht abgeschätzt werden kann, da die möglichen Reaktionen von Nervenzellen des ZNS zu weit gefächert sind.

Eine ähnliche allgemeine Betrachtung gilt für die Auswirkungen von NGF auf Mastzellen und möglicherweise andere Zellen des Immunsystems. Da *in vivo* und *in vitro* die Zahl der Mastzellen nach Behandlung mit NGF ansteigt^[76, 77], und da dieser Wachstumsfaktor die Histaminfreisetzung beeinflußt^[78-80], kann man folgern, daß NGF eine physiologische Rolle in diesen Zellen spielt. Dennoch ist noch nicht geklärt, ob ein solcher Effekt durch ein allgemeines Einwirken auf alle Mastzellenvorläufer oder durch eine Art klonalen Selektionsmechanismus zustande kommt. Kürzlich wurde berichtet, daß NGF auch auf andere Milzzellen, z. B. die einkernigen Zellen, einwirkt^[81], und daß auf Thymozyten NGF-Rezeptoren gefunden wurden^[82]; somit scheint NGF auch auf dieses funktionell so bedeutende Netzwerk Einfluß zu nehmen. Da Histamin ein Immunmodulator ist und da Milzzellen an der Immunantwort des Organismus beteiligt sind, eröffnen sich neue Schauplätze, die NGF nicht durch das Hintertürchen, sondern durch das Hauptportal betritt.

8. Die Kennkarte von NGF

Die Sequenzierung von NGF aus der Speicheldrüse der Maus im Jahre 1971^[83] lieferte nicht nur wertvolle Information über seine Primärstruktur, sondern ermöglichte auch die Synthese von Oligonucleotiden, mit denen schließlich NGF-cDNA identifiziert werden konnte^[84]. In schneller Folge wurden die Gene aus der Maus^[84], dem Menschen^[85], dem Rind^[86] und dem Huhn^[87] kloniert, und ein hoher Grad an Homologie dieser Gene konnte nachgewiesen werden. Das NGF-Gen, das sich beim Menschen auf dem kurzen Arm nahe am Zentrum von Chromosom 1 befindet^[88], codiert für ein großes Polypeptid mit 307 Aminosäureresten, das nach Spaltung(en) eine reife NGF-Untereinheit mit 118 Aminosäuren und vielleicht andere Peptide unbekannter Funktion und ohne Sequenzhomologien

mit bisher beschriebenen Proteinen ergibt^[84]. NGF ist ein Dimer aus zwei gleichen Untereinheiten, die durch nicht-kovalente Bindungen zusammengehalten werden. Das Dimer kann als solches isoliert werden^[89], oder als ein Komplex, der noch zwei andere Proteine enthält, eines mit einer Esterpeptidase-Aktivität, die vielleicht an der Prozessierung des NGF-Vorläufers beteiligt ist, und eines mit einer noch nicht bekannten Funktion^[90-92]. Es muß noch gezeigt werden, ob jede NGF-Untereinheit biologisch aktiv ist; ein kovalent quervernetztes Dimer behält seine volle Aktivität^[91, 92]. Zwischen den beiden gut beschriebenen molekularen Einheiten, nämlich NGF und seinem Gen, die man sich als Spitze und Basis eines Eisbergs vorstellen kann, gibt es mehrere mögliche Intermediate unbekannter Natur und mit unbekannten biologischen Eigenschaften. Deren Identifizierung würde wichtige Fragen beantworten, wie z. B.: Codiert das NGF-Gen andere biologisch aktive Peptide? Welche Bedeutung hat verschiedenes Splicing der NGF-mRNA in verschiedenen Zellen^[93]? Wird Präpro-NGF in allen neuronalen und nicht-neuronalen Zellen auf gleiche Art und Weise prozessiert, oder ergeben wie bei anderen Peptiden^[94] verschiedene Prozessierungswege Produkte mit verschiedenen biologischen Funktionen? Da die gleichen Peptide posttranskriptionell und posttranskriptionell modifiziert werden können, scheinen die Teile des NGF-Eisbergs, die unter der Wasseroberfläche liegen, sehr groß zu sein.

Untersuchungen zum immunologischen und biologischen Verwandtschaftsgrad von NGFs aus verschiedenen Spezies stützen die Hypothese, daß die Bindungsstelle(n) zu den jeweiligen Rezeptoren strukturell mehr konserviert ist (sind) als andere Epitope, die wahrscheinlich biologisch weniger wichtig sind und deshalb mutieren können^[95].

9. NGF, Wachstumsfaktoren und Oncogene

Die Entdeckung von NGF und bald darauf die des epidermalen Wachstumsfaktors (epidermal growth factor, EGF) führten zur biologischen Identifizierung einer immer noch steigenden Zahl von Polypeptidwachstumsfaktoren^[48]. In den siebziger Jahren rückte ein scheinbar nicht verwandtes Gebiet der Biologie in den Vordergrund der Forschungsinteressen, als man entdeckte, daß einzelne Gene (Oncogene) Zellen transformieren können. Forschung an Polypeptidwachstumsfaktoren und an Oncogenen wurde zunächst unabhängig voneinander betrieben; die beiden Gebiete verschmolzen aber, als durch Sequenzanalyse die Homologie von einigen Oncogenen und Genen von Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren nachgewiesen werden konnte. Es gibt immer mehr Hinweise darauf, daß übermäßige Synthese oder eine Abart der Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren für die Transformation der entsprechenden Zellen verantwortlich ist^[95-98]. Als kürzlich gezeigt wurde, daß auch das Gegen teil wahr ist, nämlich daß manche Oncogenprodukte Zellen zur Differenzierung veranlassen können, lenkte dies die Aufmerksamkeit auf einen anderen Aspekt des ausgeklügelten Wechselspiels zwischen differenzierenden und transformierenden Prozessen. Beispiele dafür sind *H-ras* und *V-src*, deren Expression in PC12-Zellen zu mitotischem Stillstand und neuronaler Differenzierung ähnlich

wie bei NGF führt; weitere Beispiele werden sicher folgen^[99, 100]. Man kann offensichtlich die Schlußfolgerung ziehen, daß ein bestimmter Polypeptidwachstumsfaktor oder intrazelluläre Proteine, die eine wesentliche Rolle im Zellzyklus oder bei der Differenzierung einiger Zellen spielen, in unterschiedlichen Zelltypen ganz verschiedene Wirkungen entfalten. Im Fall von NGF fragt man sich, ob und wie dieses vielseitige Molekül für andere Effekte verantwortlich ist. Ist z. B. eine Abart von NGF oder seiner Rezeptoren in der Lage, bestimmte Zellen zu transformieren, so wie es für andere Wachstumsfaktoren gezeigt werden konnte? Falls ja, könnten dann dieser modifizierte NGF oder seine Rezeptoren für Neoplasien im zentralen und peripheren Nervensystem verantwortlich sein?

10. NGF in exokrinen Drüsen: Nur zufällig vorhanden oder von biologischer Bedeutung?

Wir hatten schon früh entdeckt, daß die Unterkieferspeicheldrüsen der Maus große Mengen NGF synthetisieren und in den Speichel abgeben, daß die Synthese dieses Proteins durch Testosteron und Thyroxin reguliert wird^[101, 102], und daß der Gehalt an NGF in der männlichen Maus ungefähr zehnmal größer ist als in der weiblichen. Drei Jahrzehnte lang blieben diese Befunde rätselhaft und ohne Erklärung. Wir versuchten, NGF im Blut nachzuweisen^[49, 51] und kamen zu widersprüchlichen, insgesamt aber doch negativen Ergebnissen. Außerdem hatte die Entfernung der Speicheldrüsen, die diese Nagetiere einer so reichhaltigen Quelle für NGF beraubte, keinen nachteiligen Einfluß auf sympathische und sensorische Zellen. All dies sprach gegen die Hypothese, NGF aus der Speicheldrüse könnte bis zu den entsprechenden Zielzellen gelangen. Eine andere biologische Funktion für NGF aus der Speicheldrüse wurde zuerst von uns postuliert^[103] und kürzlich von uns^[104] und einem anderen Wissenschaftler^[105] bewiesen. Provoziert man männliche Mäuse experimentell zu intraspezifischem Kampfverhalten, indem man sie sechs bis acht Wochen sozial isoliert, so wird NGF in großen Mengen in den Blutstrom ausgeschüttet. Dies kann durch vorausgehende Sialoadenektomie verhindert werden. Da Injektionen von NGF Gewichts- und Größenzunahme der Nebennieren hervorrufen^[105] und die Synthese des Schlüsselenzyms der Catecholaminbiosynthese, Tyrosin-Hydroxylase, stimulieren^[106], schlügen wir vor, daß diese gewaltige Ausschüttung von endogenem NGF aus der Speicheldrüse ins Blut eine ganz wesentliche Bedeutung für die Abwehr- und/oder Angriffsmechanismen der männlichen Maus hat, die Kämpfe mit Tieren des gleichen Geschlechts ausführt. Für diese Hypothese spricht, daß aggressives Verhalten die Abgabe von Renin, einem weiteren biologisch aktiven Protein, in den Blutstrom induziert; dieses Renin wird in denselben tubulären Bereichen der Speicheldrüsen synthetisiert^[107]. Wir kennen allerdings noch nicht den Mechanismus, der zur Ausschüttung von NGF führt, und wissen auch nicht, ob noch andere Stationen aktiviert werden und in diesem spezifischen Stresssyndrom eine Rolle spielen.

Das Vorkommen großer Mengen NGF im Schlangengift^[108] und in den männlichen Geschlechtsorganen^[108, 109] mag als Beispiel einer launenhaften Genexpression wäh-

rend der Evolution aufgefaßt werden. NGF kann aber in diesen Fällen auch weitere Funktionen erfüllen, die irgendwie mit der toxischen Wirkung des Schlangengifts oder der Fortpflanzungsaktivität des Geschlechtsapparates zusammenhängen. Beim Schlangengift kann man sich vorstellen, daß ein so spezifisch neurotropes Molekül wie NGF von den Reptilien als Transportmolekül für andere Neurotoxine benutzt wird, für die keine spezifischen Rezeptoren im zentralen und peripheren Nervensystem existieren. Zum Beispiel könnten Enzyme wie Phospholipasen, Phosphodiesterasen und Proteasen verschiedener Spezifität, die vielleicht selbst keine Erkennungsstellen auf Zielzellen haben, NGF als Träger benutzen, um in Zellen zu gelangen, die NGF-Rezeptoren aufweisen. Da diese Rezeptoren auch auf einigen nicht-neuronalen Zellen weit verbreitet sind, könnten mit ihrer Hilfe einige Toxine oder Enzyme einen leichteren Weg in die Zielorgane finden.

In den Fortpflanzungsorganen könnte NGF an Befruchtungsmechanismen beteiligt sein, indem er über das Cytoskelett die Bewegung der Spermatozoen ähnlich wie beim Neuritenwachstum aktiviert, oder indem er das Einnisten eines Eies begünstigt, da er die Abstoßung durch das Immunsystem verhindern kann. Letztgenannte Hypothese wird gegenwärtig von *Geraci*, *Cocchiara* und *Calissano* überprüft, die den Effekt von NGF auf Mastzellen des Uterus untersuchen; von diesen nimmt man an, daß sie durch Histaminausschüttung die lokale Immunantwort unterdrücken^[110].

11. Absehbare Experimente und Vorhersagen des Unvorhersagbaren

Am ehesten kann man vorhersehen, daß nach anderen NGF-Zielzellen gesucht wird. Dabei dürfen die immer weiter verbesserten in-vivo- und in-vitro-Techniken angewendet werden, die während der letzten Jahrzehnte von der molekularen bis zur superzellulären Ebene verfügbar wurden. Erst dieser vielseitige experimentelle Ansatz führte zur Entdeckung von NGF-Zielzellen im zentralen Nervensystem niederer und höherer Vertebraten und in Zelllinien des Immunsystems. Diese Liste wird wahrscheinlich noch länger werden, wenn die Suche auf weitere neuronale und nicht-neuronale Zellpopulationen ausgedehnt wird. Außerdem sollte man berücksichtigen, daß einige dieser Populationen hauptsächlich während der pränatalen Entwicklungsstufen auf NGF ansprechen. Das konnte schon in sensorischen Zellen von Vögeln und Säugetieren gezeigt werden^[49, 51, 52], ebenso in Zellen, die den dritten Ventrikel von Kaulquappen^[111] und von pränatalen und neugeborenen Nagetieren (*L. Aloe* und *R. Levi-Montalcini*, unveröffentlichte Ergebnisse) auskleiden. In ähnlicher Weise könnte die systematische Untersuchung neuroendokriner und hämatopoietischer Zelllinien in in-vitro- und in-vivo-Systemen bis jetzt noch unbekannte Funktionen dieses Wachstumsfaktors aufdecken.

Ein weiterer Ansatz, der jetzt in vielen Laboratorien verfolgt wird, ist die Suche nach und die Charakterisierung von NGF-ähnlichen Faktoren, die auf andere neuronale Populationen einwirken. Diese Faktoren können in zwei Klassen eingeteilt werden: 1) diejenigen, die vom NGF-Gen selbst codiert werden, aber auf verschiedene Art und

Weise posttranskriptionell oder posttranslationell modifiziert werden, so daß Polypeptidwachstumsfaktoren mit geänderter Struktur und Funktion entstehen; 2) weitere Proteine oder Peptide mit der trophischen, chemotaktischen und/oder differenzierenden Aktivität von NGF, die von anderen Genen codiert werden.

Man wird Techniken aus der Molekularbiologie und Immunologie heranziehen, um Faktoren aus der erstgenannten Gruppe aufzuspüren und zu identifizieren. Diese Methoden sollten wertvolle Informationen über einige noch unerforschte und sozusagen noch unter der Wasseroberfläche liegende Teile des NGF-Eisbergs liefern, nämlich die Gentranskription und -translation von NGF. Besonders wichtig wäre die Identifizierung derjenigen NGF-Sequenz, die für die Bindung an die Rezeptoren verantwortlich ist und so wahrscheinlich die zelluläre Reaktion auslöst. Wie schon früher vermutet wurde^[95], ist dieser Abschnitt möglicherweise besser konserviert als andere Teile des Moleküls. Ist er erst einmal identifiziert, kann man in seinem synthetischen Analogon Aminosäuren austauschen und/oder chemische Modifikationen einführen und so die biologische Aktivität der maßgeschneiderten neuen Peptide untersuchen. Dies sollte nicht nur wertvolle Informationen über Struktur und Eigenschaften des aktiven Zentrums von NGF liefern, sondern hoffentlich auch zur Synthese von Peptiden führen, die noch aktiver sind als NGF. Dieses Ziel ist ja auf dem Gebiet anderer biologisch aktiver Peptide schon auf brillante Art und Weise erreicht worden^[112, 113].

Im Rahmen dieser Art von Untersuchungen an NGF und seinem Gen kann man eine Strategie entwickeln, die darauf abzielt, die Synthese und Ausschüttung von NGF durch nicht-neuronale Zellen in peripheren Geweben und durch Neuronen und Satelliten im zentralen Nervensystem auszunützen, und die deshalb auf Pharmaka zurückgreift, die die Expression oder das Prozessieren von NGF modifizieren. Der experimentell gesicherte Befund, daß die NGF-Synthese durch Hormoneinwirkung^[101, 102] oder Durchtrennung der Nervenfasern zwischen NGF-Rezeptorzellen und den Zielzellen dieser Nerven^[114] gesteigert wird, ist ein weiterer Hinweis auf die bemerkenswerte Vielfalt der Mechanismen, die die NGF-Genexpression kontrollieren. Diese Eigenschaft könnte man durch Pharmaka modulieren, die auch auf die Regulation der Synthese und Ausschüttung von NGF einwirken.

Die Suche nach neurotropen Faktoren, die nicht vom NGF-Gen codiert werden, könnte im wesentlichen den klassischen Ansatz benutzen, der so erfolgreich zur Isolierung und Identifizierung von NGF angewendet wurde. Es mag hauptsächlich zwei Gründe dafür geben, warum trotz großer Anstrengungen auf diesem Gebiet noch keine weiteren Polypeptidwachstumsfaktoren, die andere neuronale Zellen aktivieren, eindeutig identifiziert werden konnten: 1) Es gibt keine schnellen und zuverlässigen biologischen Tests wie beim NGF, und 2) es konnten keine ergiebigen Quellen für diese Faktoren gefunden werden, die mit jenen vergleichbar wären, die man glücklicherweise schon früh für NGF entdeckt hatte. Man kann aber jetzt schnelle und zuverlässige Testsysteme einführen, indem man auf chemisch ganz genau definierte Medien zurückgreift, die nur bestimmte Zelltypen überleben und differenzieren lassen, wenn man ihnen die vermeintlichen Wachstumsfaktoren

zusetzt, die man aus verschiedenen Quellen isoliert und mit dem in-vitro-Test auf ihre möglicherweise spezifische wachstumsfördernde Aktivität untersucht hat. Das Problem, für NGF-ähnliche Peptide so ergiebige Quellen finden zu müssen wie die, die bei der Entdeckung von NGF eine Schlüsselrolle spielten, ist durch Methoden der Proteinchemie und der Gentechnologie heute leichter zu lösen. Nur wenige Mikrogramm gereinigten Proteins genügen heute, um dessen Sequenzierung, die Synthese der entsprechenden cDNA, die Identifizierung des Gens für den betreffenden Wachstumsfaktor und dessen Expression in Bakterien zu ermöglichen. So kann eine Suche, die einst auf glückliche Umstände vertrauen mußte, durch eine rationelle und systematische Strategie ersetzt werden.

Kann man versuchen, etwas vorherzusagen, was im Grunde nicht vorhersagbar ist? Gerade dazu werden wir durch die NGF-Entdeckungsgeschichte ermutigt, denn mit jedem nicht vorhergesehenen Ereignis nahm der bis dahin noch nicht beschriebene Weg des NGFs eine neue Richtung, und es eröffneten sich neue Ausblicke auf ein stets wechselndes Panorama. Diese Entwicklung, die von Anfang an offensichtlich war und mich tatsächlich erst auf die Existenz des NGFs aufmerksam machte, ist vielleicht der Aspekt, der am attraktivsten, aber auch am schwierigsten zu fassen ist. Im Augenblick kann man nur vorhersagen, wo Entwicklungen am wahrscheinlichsten sind. Nicht so sehr NGF selbst, sondern die Komplexität der neuen Umgebungen, in denen sich NGF bewegt – das zentrale Nervensystem und das Immunsystem – macht eine genaue Vorhersage von Ergebnissen unmöglich. Man weiß seit kurzem, daß diese beiden Netzwerke eng miteinander verflochten sind und sich gegenseitig durch Signale beeinflussen^[115, 116]. Ihr ungeheuer komplizierter Aufbau eröffnet unendlich viele Möglichkeiten für die Aktivierung bestimmter Zellpopulationen des einen oder anderen Systems durch NGF.

Wie viele Sekundäreffekte mag der direkte Einfluß von NGF auf cholinerge, adrenerge und peptiderge Neuronen haben, die durch Nervenfasern, humorale Kanäle oder Diffusion über kurze Entfernung miteinander verknüpft sind? Oder welche Folgen könnte die Histaminausschüttung aus NGF-aktivierten Mastzellen haben, wenn man bedenkt, welche Rolle dieses Amin als Immunmodulator oder als Immunsuppressor spielt? Ähnliche Überlegungen gelten für einen möglichen Einsatz von NGF bei Krankheiten des Gehirns oder des Immunsystems. So kann z.B. Applikation von außen oder endogene Stimulation der Synthese durch Pharmaka immer dann ein vielversprechender Ansatz bei gegenwärtig noch unheilbaren Krankheiten sein, wenn der Zelltod spezifischer neuronaler Populationen auf einen lokalen Mangel an neurotrophen Faktoren, etwa NGF, zurückzuführen ist.

Ich will diesen Bericht, der die Entdeckungsgeschichte des Nervenwachstumsfaktors zum Inhalt hat, mit einer Bemerkung beenden, die *Viktor Hamburger* vor über einem Jahrzehnt gemacht hat: „...the fact that this discovery, which grew out of a seemingly peripheral problem (peripheral in every sense of the word), has blazed so many new trails is its greatest contribution to neuroembryology.“^[117] Die Forschung während dieses letzten Jahrzehnts bewies nicht nur von neuem, daß NGF ganz wesentlich zum Fortschritt auf dem Gebiet der Neuroembryologie beitrug, son-

dern rückte auch seine allgemeine Bedeutung für die Neurawissenschaften in den Vordergrund und deutete auf seine Rolle im Immunsystem hin.

Ich widme diesen Artikel Viktor Hamburger, der diese Forschung förderte und an ihr teilnahm und dem ich für immer Dank für seine wertvollen Vorschläge und seine Großzügigkeit schulde. Ohne ihn wären wir nie auf den Nervenwachstumsfaktor aufmerksam geworden.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei meinen lieben Freunden Pietro Calissano und Luigi Aloe für ihre grundlegenden Beiträge bedanken. Während dieser 35 Jahre dauernden Forschung nahm eine große Zahl von Kollegen, technischen Assistenten und Doktoranden an diesem Abenteuer der Wissenschaft teil. Mit ganz besonderem Dank möchte ich die wichtige Arbeit von zwei Kollegen, Dr. Piero Angeletti und Dr. Vincenzo Bocchini, anerkennen. Ebenso möchte ich mich herzlich bei Professor Carlos Chagas für seine großzügige Gastfreundschaft am biophysikalischen Institut der Universität von Brasilien und bei Dr. Hertha Meyer bedanken, die mir half, einen Gewebekulturtest für NGF auszuarbeiten.

Eingegangen am 5. März 1987 [A 631]
Übersetzt von Dr. Heinrich Wiesinger, Tübingen

- [1] P. B. Medawar: *The Art of the Soluble*, Methuen, New York 1967, S. 106–107.
- [2] R. G. Harrison, *Proc. R. Soc. London Ser. B* 118 (1935) 155–196.
- [3] V. Hamburger, *J. Exp. Zool.* 1934, 449–494.
- [4] J. F. Tello, *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid* 21 (1922) 1–93.
- [5] R. Levi-Montalcini, *Prog. Brain Res.* 4 (1964) 1–29.
- [6] R. Levi-Montalcini, G. Levi, *Arch. Biol. Liège* 34 (1943) 183–206.
- [7] V. Hamburger, R. Levi-Montalcini, *J. Exp. Zool.* 111 (1949) 457–502.
- [8] R. Levi-Montalcini, *J. Comp. Neurol.* 91 (1949) 209–242.
- [9] R. Levi-Montalcini, *J. Morphol.* 86 (1950) 256–283.
- [10] E. D. Bueker, *Anat. Rec.* 102 (1948) 369–390.
- [11] R. Levi-Montalcini, V. Hamburger, *J. Exp. Zool.* 116 (1951) 321–362.
- [12] R. Levi-Montalcini, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 55 (1952) 330–343.
- [13] R. Levi-Montalcini, V. Hamburger, *J. Exp. Zool.* 123 (1953) 233–288.
- [14] R. Levi-Montalcini in F. G. Worden, J. P. Swayze, G. Adelman (Hrsg.): *The Neurosciences: Paths of Discovery*, MIT Press, Cambridge, MA, USA 1975, S. 245–265.
- [15] R. Levi-Montalcini, H. Meyer, V. Hamburger, *Cancer Res.* 14 (1954) 49–57.
- [16] S. Cohen, R. Levi-Montalcini, V. Hamburger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 40 (1954) 1014–1018.
- [17] S. Cohen, R. Levi-Montalcini, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 42 (1956) 571–574.
- [18] S. Cohen, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 1129–1137.
- [19] R. Levi-Montalcini, S. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 42 (1956) 695–699.
- [20] S. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46 (1960) 302–311.
- [21] R. Levi-Montalcini, B. Booker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46 (1960) 373–384.
- [22] R. Levi-Montalcini, B. Booker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46 (1960) 384–391.
- [23] R. Levi-Montalcini, *Science* 143 (1964) 105–110.
- [24] R. Levi-Montalcini, *Harvey Lect.* 60 (1966) 217–219.
- [25] R. Levi-Montalcini, P. U. Angeletti, *Pharmacol. Rev.* 18 (1966) 819–828.
- [26] G. Steiner, E. Schönbaum, *Immunosympathectomy*, Elsevier, Amsterdam 1972.
- [27] R. Levi-Montalcini, P. U. Angeletti, *Dev. Biol.* 7 (1963) 653–659.
- [28] R. Levi-Montalcini, L. Aloe, P. Calissano, C. Cozzari, *Abstr. 1st Meet. Int. Soc. Dev. Neurosci.*, Vol. 1, S. 5, Strasbourg 1980.
- [29] L. Aloe, C. Cozzari, P. Calissano, R. Levi-Montalcini, *Nature London* 291 (1981) 413–415.
- [30] E. M. Johnson, P. D. Gorin, L. D. Brandeis, J. Pearson, *Science* 210 (1980) 916–918.
- [31] M. Goedert, U. Otten, T. Schaefer, M. Schwab, H. Thoenen, *Brain Res.* 201 (1980) 399–409.
- [32] P. U. Angeletti, R. Levi-Montalcini, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 65 (1970) 114–121.
- [33] P. Calissano, G. Monaco, Menesini-Chen, J. S. Chen, R. Levi-Montalcini in S. W. Perry, A. Margret, R. S. Adelstein (Hrsg.): *Contractile Systems in Non-Muscle Tissue*, Elsevier, Amsterdam 1976, S. 201–211.
- [34] I. A. Hendry, *Brain Res.* 90 (1975) 235–244.
- [35] R. Levi-Montalcini, L. Aloe, E. Mugnaini, F. Oesch, H. Thoenen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 595–599.
- [36] I. A. Hendry, *Brain Res.* 94 (1975) 87–97.
- [37] L. Aloe, E. Mugnaini, R. Levi-Montalcini, *Arch. Ital. Biol.* 113 (1975) 326–353.
- [38] K. Stöckel, U. Paravicini, H. Thoenen, *Brain Res.* 76 (1974) 413–421.
- [39] V. Hamburger, V. J. K. Brunso-Bechtold, J. W. Yip, *J. Neurosci.* 1 (1981) 60–71.
- [40] R. Levi-Montalcini, *Prog. Brain Res.* 45 (1976) 235–258.
- [41] Menesini-Chen, J. S. Chen, R. Levi-Montalcini, *Arch. Ital. Biol.* 116 (1978) 53–84.
- [42] R. W. Gundersen, J. N. Barrett, *Science* 206 (1979) 1079–1080.
- [43] R. W. Gundersen, J. N. Barrett, *J. Cell Biol.* 87 (1980) 546–554.
- [44] R. B. Camponot, *Dev. Biol.* 93 (1982) 1–12.
- [45] R. B. Camponot, *Dev. Biol.* 93 (1982) 13–41.
- [46] K. H. Pfenniger, M. P. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 7797–7800.
- [47] P. Calissano, A. Cattaneo, L. Aloe, R. Levi-Montalcini in C. H. Li (Hrsg.): *Hormonal Proteins and Peptides*, Vol. XII, Academic Press, New York 1984, S. 1–56.
- [48] R. A. Bradshaw, *Annu. Rev. Biochem.* 47 (1978) 191–216.
- [49] H. Thoenen, Y. A. Barde, *Physiol. Rev.* 60 (1980) 1284–1335.
- [50] L. A. Greene, E. M. Shooter, *Annu. Rev. Neurosci.* 3 (1980) 353–402.
- [51] P. Calissano, A. Cattaneo, S. Biocca, L. Aloe, D. Mercanti, R. Levi-Montalcini, *Exp. Cell Res.* 154 (1984) 1–9.
- [52] R. Levi-Montalcini, P. Calissano, *Trends NeuroSci. Pers. Ed.* 9 (1986) 473–476.
- [53] H. Thoenen, P. U. Angeletti, R. Levi-Montalcini, R. Kettler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (1971) 1598–1602.
- [54] U. Paravicini, K. Stöckel, H. Thoenen, *Brain Res.* 84 (1975) 279–291.
- [55] E. M. Johnson, H. K. Yip, *Nature* 314 (1985) 751–753.
- [56] L. A. Greene, A. S. Tischler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 2424–2428.
- [57] K. Unsicker, B. Krisch, U. Otten, H. Thoenen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 3498–3502.
- [58] L. Aloe, R. Levi-Montalcini, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 1246–1250.
- [59] L. A. Greene, R. K. H. Liem, M. L. Shelanski, *J. Cell Biol.* 96 (1983) 76–83.
- [60] L. E. Lillien, P. Claude, *Nature London* 317 (1985) 632–634.
- [61] D. E. Burnstein, L. A. Greene, *Dev. Biol.* 94 (1982) 477–482.
- [62] R. Levi-Montalcini, L. Aloe, *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 25 (1980) 3–16.
- [63] A. J. Doupe, P. H. Patterson, S. C. Landis, *J. Neurosci.* 5 (1985) 2143–2160.
- [64] A. J. Doupe, S. C. Landis, P. H. Patterson, *J. Neurosci.* 5 (1985) 2119–2142.
- [65] C. Owman, N. O. Sjoberg in V. H. T. James (Hrsg.): *Proc. 5th Int. Congr. Endocrinol.*, Vol. I, Excerpta Medica, Amsterdam 1977, S. 205–209.
- [66] A. Szutowicz, W. A. Frazier, R. A. Bradshaw, *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 1516–1523.
- [67] M. Seiler, M. Schwab, *Brain Res.* 30 (1984) 33–39.
- [68] H. Gnahn, F. Hefti, R. Heumann, M. E. Schwab, H. Thoenen, *Dev. Brain Res.* 9 (1983) 45–52.
- [69] F. Hefti, A. David, J. Hartikka, *Brain Res.* 293 (1984) 305–311.
- [70] W. C. Mobley, J. L. Rutkowski, G. I. Tennekoon, K. Buchanan, M. V. Johnston, *Science* 229 (1985) 284–287.
- [71] L. R. Williams, S. Varon, G. M. Peterson, K. Wictorin, W. Fischer, A. Bjorklund, F. H. Gage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 9231–9235.
- [72] L. F. Kromer, *Science* 235 (1987) 214–216.
- [73] S. Korsching, G. Auburger, R. Heumann, J. Scott, H. Thoenen, *EMBO J.* 4 (1985) 1389–1393.
- [74] D. L. Shelton, L. F. Reichardt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 2714–2718.
- [75] S. R. Whittemore, T. Ebendal, L. Lärkfors, L. Olson, A. Seiger, I. Strömberg, H. Persson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 817–821.
- [76] L. Aloe, R. Levi-Montalcini, *Brain Res.* 133 (1977) 358–366.
- [77] A. Böhm, L. Aloe, *Accad. Naz. Lincei* 80 (1986) 1–6.
- [78] A. Bruni, E. Bigoni, E. Boarato, A. Leon, G. Toffano, *FEBS Lett.* 138 (1982) 190–192.
- [79] K. Sugiyama, Y. Suzuki, H. Furata, *Arch. Oral Biol.* 30 (1985) 93–95.
- [80] N. Mazurek, G. Weskamp, P. Erne, U. Otten, *FEBS Lett.* 198 (1986) 315–320.
- [81] L. W. Thorpe, K. Werrbach-Perez, J. R. Perez-Polo, *Abstr. 2nd Workshop Neuroimmunomodul.*, Dubrovnik 1986, S. 151.
- [82] A. Cattaneo, D. S. Secher, *Exp. Cell Res.*, im Druck.

- [83] R. Hogue-Angeletti, R. A. Bradshaw, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68** (1971) 2417–2420.
- [84] J. Scott, M. Selby, M. Urdea, M. Quiroga, G. Bell, W. J. Rutter, *Nature London* **302** (1983) 538–540.
- [85] A. Ullrich, A. Gray, C. Berman, T. J. Dull, *Nature London* **303** (1983) 821–823.
- [86] R. Meier, M. Becker-Andre, R. Gotz, R. Heumann, A. Shaw, H. Thoenen, *EMBO J.* **5** (1986) 1489–1493.
- [87] T. Ebendal, D. Larhammar, H. Persson, *EMBO J.* **5** (1986) 1483–1487.
- [88] V. Francke, B. De Martinville, L. Coussens, A. Ullrich, *Science* **222** (1983) 1248–1250.
- [89] V. Bocchini, P. U. Angeletti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **64** (1969) 787–792.
- [90] S. Varon, J. Nomura, E. M. Shooter, *Biochemistry* **6** (1967) 2202–2210.
- [91] S. Varon, J. Nomura, E. M. Shooter, *Biochemistry* **7** (1968) 1296–1303.
- [92] R. W. Stach, E. M. Shooter, *J. Biol. Chem.* **249** (1974) 6668–6674.
- [93] R. H. Edwards, M. J. Selby, W. J. Rutter, *Nature London* **319** (1986) 784–787.
- [94] B. A. Eipper, R. E. Mains, E. Herbert, *Trends Neurosci.* **100** (1986) 463–467.
- [95] R. Doolittle, M. W. Hunkapiller, L. E. Hood, S. G. DeVare, K. L. Robbins, S. A. Aaronson, H. N. Antoniades, *Science* **221** (1983) 275–276.
- [96] J. Downward, Y. Yraden, E. Mayes, G. Scrace, N. Totty, P. Stockwell, A. Ullrich, J. Schlessinger, M. D. Waterfield, *Nature* **307** (1984) 521–527.
- [97] C. J. Sherr, C. W. Rettenmier, R. Saccà, M. F. Roussel, T. A. Look, E. R. Stanley, *Cell* **41** (1985) 665–676.
- [98] C. Weinberger, S. M. Hollenberg, M. G. Rosenfeld, R. M. Evans, *Nature London* **318** (1985) 670–673.
- [99] D. Bar-Sagi, J. R. Feramisco, *Cell* **42** (1985) 841–848.
- [100] S. Alemà, P. Casalbore, E. Agostini, F. Tatò, *Nature London* **316** (1985) 557–559.
- [101] R. Levi-Montalcini, P. U. Angeletti in L. M. Sreebny, J. Meyer (Hrsg.): *Salivary Glands and their Secretions*, Pergamon, Oxford 1964, S. 129–141.
- [102] L. Aloe, R. Levi-Montalcini, *Exp. Cell Res.* **125** (1980) 15–22.
- [103] L. Aloe, C. Cozzari, R. Levi-Montalcini, *Brain Res.* **332** (1985) 259–265.
- [104] L. Aloe, E. Alleva, A. Böhm, R. Levi-Montalcini, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (1986) 6184–6187.
- [105] J. Lakshmanan, *Am. J. Physiol.* **250** (1986) E386–391.
- [106] U. Otten, M. Schwab, C. Gagnon, H. Thoenen, *Brain Res.* **133** (1977) 291–303.
- [107] J. Bing, K. Poulsen, E. Hackenthal, E. Rix, R. Taugner, *J. Histochem. Cytochem.* **28** (1980) 874–880.
- [108] G. P. Harper, Y. A. Barde, G. Burnstock, J. R. Carstairs, M. E. Dennison, K. Suda, C. A. Vernon, *Nature London* **279** (1979) 160–162.
- [109] G. P. Harper, H. Thoenen, *J. Neurochem.* **34** (1980) 893–903.
- [110] D. J. Beer, S. M. Matloff, R. E. Rocklin, *Adv. Immunol.* **35** (1984) 209–215.
- [111] R. Levi-Montalcini, L. Aloe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** (1985) 7111–7115.
- [112] E. T. Kaiser, D. S. Lawrence, *Science* **226** (1984) 505–511.
- [113] B. Rajashekhar, E. T. Kaiser, *J. Biol. Chem.* **261** (1986) 13617–13623.
- [114] T. Ebendal, L. Olson, A. Seiger, K. O. Hedlund, *Nature London* **286** (1980) 25–28.
- [115] T. L. Roszman, J. C. Jackson, R. J. Cross, M. J. Titus, W. R. Markesberry, W. H. Brooks, *J. Immunol.* **135** (1985) 769–772.
- [116] N. R. Hall, J. P. McGillis, B. L. Spangelo, A. L. Goldstein, *J. Immunol.* **135** (1985) 806–811.
- [117] V. Hamburger, *Perspect. Biol. Med.* **18** (1975) 162–178.