

Schon gegen Alzheimer geimpft? – Mechanismen zerebraler Amyloidosen

D.T. Winkler, M. Jucker

Einleitung

Vor rund hundert Jahren beschrieb Alois Alzheimer 1906 seinen berühmten Fall von Auguste D. unter dem Titel «Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozess der Hirnrinde» [1, 2]. Die Ursachen dieser «eigenartigen» Erkrankung und ihre Pathomechanismen bleiben bis heute trotz intensiver Forschung nur bruchstückhaft aufgeklärt. Die Zahl der Alzheimerpatienten, weltweit, wird auf etwa 15 Millionen geschätzt und allein in der Schweiz leben rund 50 000 Alzheimerkranke [3]. Hohes Alter ist der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung der Alzheimer-Demenz (AD). Einer von hundert 65jährigen leidet an der AD, bei den über 85jährigen trifft es bereits jeden fünften [4]. Mit der stetigen Zunahme der Altersbevölkerung wächst auch die Prävalenz dieser Erkrankung, und es ist mit einer Verdoppelung der Patientenzahl bis ins Jahr 2030 zu rechnen. Auch heute noch lässt sich die Krankheit erst *post mortem* anhand einer Hirnautopsie mit Sicherheit diagnostizieren. Die aktuellen Therapien mit Cholinesterase-Hemmern verfolgen keine primär kausalen Therapieansätze sondern bekämpfen Symptome. Immerhin gelingt es damit, den Krankheitsverlauf über einige Monate zu stabilisieren. Aufgrund des dringenden Bedarfes an besseren diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten erstaunt es nicht, dass die AD heute einen Schwerpunkt neurobiologischer Forschung bildet.

Die Alzheimer-Demenz und die Molekularpathologie

Die AD zeigt zwei neuropathologische Hauptbefunde: Extrazelluläre Amyloidablagerungen in Form seniler Plaques und intrazelluläre Neurofibrillenveränderungen, die sogenannten neurofibrillären Tangles, welche aus Tau-Protein bestehen. Im Zentrum der Alzheimerforschung stehen nach wie vor die von Alzheimer beschriebenen «körnigen» Proteinablagerungen. Wie wir heute wissen, bestehen diese Amyloidplaques aus einem 40 bzw. 42 Ami-

nosäuren langen β -Amyloid-Peptid (A β), das proteolytisch aus dem Amyloid-Vorläuferprotein herausgeschnitten wird (Abb. 1). Die für diese proteolytische Spaltung verantwortlichen molekularen Scheren, die α -, β - und γ -Sekretasen, sind seit kurzem weitgehend bekannt [5]. Weit weniger bekannt sind die Mechanismen, welche letztendlich zur Aggregation von A β -Fibrillen im Neuropil und in den Gefässwänden führen. Ebenso ist unklar, welcher Schritt in der Pathogenese der zerebralen Amyloidose für die Neurodegeneration im AD-Gehirn verantwortlich ist. Ist es die intrazelluläre Produktion von A β oder die extrazelluläre Ablagerung des Amyloids?

Die Alzheimer-Demenz und die Gene

Die meisten Fälle von AD sind sporadischer Natur. Wenn auch eine familiäre Häufung in rund einem Viertel der Fälle beobachtet wird, so liegen doch selten dominante Genmutationen der Erkrankung zugrunde. In der Schweiz konnte bis heute noch keine solche dominante Mutation identifiziert werden. Dominante Mutationen im Amyloid-Vorläuferprotein wurden aber z.B. in Familien in England (London), den USA (Florida) sowie in Schweden beschrieben und führen zu einer AD mit Krankheitsbeginn vor dem 60. Altersjahr. Alle diese Mutationen liegen interessanterweise in der Nähe der Schnittstellen der Sekretasen. Weit häufiger sind dominante Mutationen in Presenilin 1 und 2, welche Teil des γ -Sekretase-Komplexes sind. Alle bis heute beschriebenen dominanten Mutationen die zur AD führen, beeinflussen in irgendeiner Form die Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins und somit die Produktion von A β [6].

Neben den dominanten Genmutationen gibt es genetisch bedingte Risikofaktoren, die die Wahrscheinlichkeit eine sporadische Form von AD zu entwickeln wesentlich erhöhen. Der einzig gesicherte Risikofaktor ist derzeit das $\epsilon 4$ Allel des Apolipoprotein-E-Gens [7]. Eine Vielzahl anderer genetischer Risikofaktoren wurde beschrieben aber nur wenige konnten in Folgeuntersuchungen bestätigt werden. Neueste Erkenntnisse zeigen, dass auf Chromosom 10 eines oder mehrere noch nicht identifizierte Gene liegen, welche das Auftreten der sporadischen AD zu begünstigen scheinen [8].

Ziel unserer Forschung

In unserer Forschungsgruppe studieren wir grundlegende Mechanismen der A β -Aggregation und deren Auswirkungen auf das umlie-

Korrespondenz:
PD Dr. sc. nat. M. Jucker
Dr. med. D.T. Winkler
Abteilung Neuropathologie
Institut für Pathologie
Universität Basel
CH-4003 Basel

mjucker@uhbs.ch

gende Nervengewebe und auf die Hirngefässe. Basierend auf dieser Grundlagenforschung versuchen wir neue kausale Therapieansätze zu entwickeln und an geeigneten Modellen zu erproben. Wir sehen somit unsere Forschung als Bindeglied zwischen Grundlagenforschung und Klinik.

Das Amyloid und das transgene Mausmodell

Transgene Mausmodelle mit Amyloid-Ablagerungen im Gehirn wurden erstmals vor gut 5 Jahren erfolgreich hergestellt. Ein solches Modell ist die APP23 transgene Maus. Diese wurde von Novartis in Basel entwickelt und

fand mannigfaltige Verwendung in unserer Forschung [9]. Die APP23-Maus überexprimiert das Amyloid-Vorläuferprotein mit der familiären schwedischen Genmutation unter der Kontrolle eines Nervenzell-spezifischen murinen-Thy1-Promoters. Mit zunehmendem Alter der Tiere bilden sich zerebrale Amyloidplaques und eine Amyloidangiopathie. Diese Läsionen sind den Befunden im Gehirn von AD-Patienten sehr ähnlich. Die Amyloidplaques bestehen vorwiegend aus A β 1-40 und sind zu 90% kompakt und kongophil. Erste Amyloidablagerungen finden sich bereits im Alter von 6 Monaten. Mit zwei Jahren zeigen die Mäuse eine Amyloidose, die in ihrem Ausmass vergleichbar ist mit der eines AD-Patienten in stark fortgeschrittenem Stadium (Abb. 2).

Abbildung 1.

Das Amyloid-Vorläuferprotein (APP) wird durch Enzyme (Sekretasen) in verschiedene Fragmente gespalten: Wird APP zuerst durch die α -Sekretase geschnitten, so entsteht das C-terminale Fragment C83, welches dann durch die γ -Sekretase zu P3 abgebaut wird. P3 bildet keine Fibrillen. Wird APP aber zuerst von der β -Sekretase geschnitten, so bildet sich C99, das in der Folge von der γ -Sekretase gespalten wird, wodurch A β entsteht. A β lagert sich in Form von Amyloidfibrillen ab.

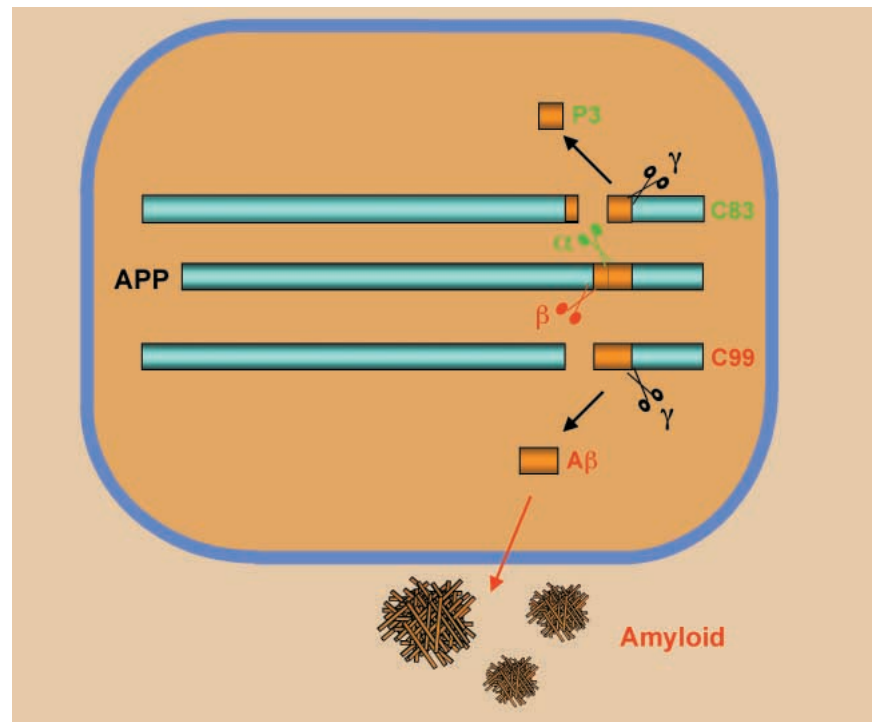
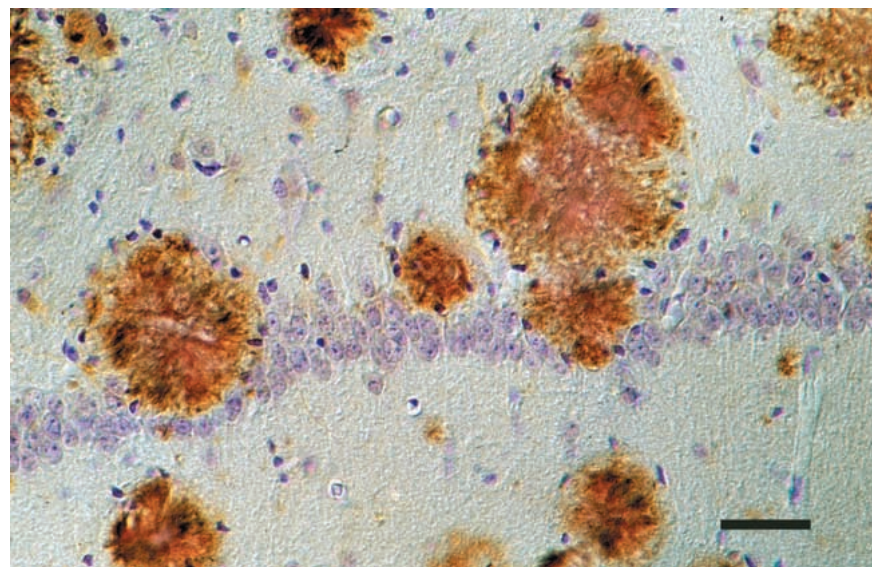


Abbildung 2.

Amyloidplaques im Hippokampus einer 18 Monate alten APP23 transgenen Maus. Immunfärbung mit NT11-Antikörper gegen A β . Massstab = 25 μ m.



Das Amyloid und die Neurodegeneration

A β ist in Zellkultur neurotoxisch, während die Injektion von A β in das Gehirn zweifelhafte Resultate ergab [10]. Eine erste Frage, die wir uns stellten war, ob Amyloidablagerung *in vivo* ebenfalls zu neuronaler Degeneration führt. Mittels immunhistochemischer Methoden und stereologisch-quantitativen Verfahren konnten wir nachweisen, dass alte APP23-Mäuse bis zu 25% der Nervenzellen im Hippokampus verlieren. Dieser Nervenzellverlust korrelierte signifikant mit der Schwere der Amyloidose [11]. Wir konnten somit zeigen, dass die zerebrale Amyloidose auch im Tiermodell zu Nervenzellverlust führt. Der Nervenzellverlust in der Maus erreicht aber nicht das drastische Ausmass, wie man es im Gehirn von AD-Patienten vorfindet.

Das Nervensystem reagiert auf den Verlust von Nervenzellen mit Umbauprozessen, insbesondere dem Auswachsen (Sprossung) neuer Nervenzellfortsätze überlebender gleichartiger Neurone und der Bildung von neuen synaptischen Kontakten. Solche Sprossungsvorgänge können den Nervenzellverlust zu einem gewissen Grad funktionell kompensieren und die Krankheitssymptome verzögern. In der APP23-Maus konnten wir kürzlich zeigen, dass es um Amyloidablagerungen auch zu einer solchen Sprossung kommt, dass aber diese Sprossung in der APP23-Maus aberrant und ektopisch ist, d.h., dass die sprossenden Fasern in «falsche Regionen» des Zentralnervensystems einwachsen und um die Amyloidablagerungen dystrophe Synapsen bilden. Somit ist die Sprossung nicht als kompensatorisch sondern als pathologisch anzusehen [12]. Das Amyloid führt also nicht nur zum Absterben der umliegenden Nervenzellen (Neurodegeneration), sondern es führt durch induzierte Wachstumsprozesse zu einer weitergehenden Störung der neuronalen Vernetzung im Gehirn. Sprossungsvorgänge wurden auch im AD-Gehirn beschrieben [13]; ob sie aber auch von aberranter und ektopischer Natur sind, konnte bisher nicht gezeigt werden, weil postmortales Gewebe für solche Untersuchungen nur eingeschränkt verwendbar ist. Das Ausmass dieser plastischen Veränderungen könnte für das klinische Bild von wesentlicherer Bedeutung sein als die reine Amyloidmasse, die oft schlecht mit dem Ausmass der Demenz korreliert.

Ein Charakteristikum der AD ist die schwere Beeinträchtigung des cholinergen Systems. Ob diese eine direkte Konsequenz der Amyloidablagerungen ist, ob sie durch die intrazellulären neurofibrillären Veränderungen hervorgerufen wird oder ob ihr ein dritter Mechanismus zugrunde liegt, ist bis heute unklar. Wir haben daher das cholinerge System der APP23-Maus

detailliert untersucht um abzuklären, ob sich die humantypischen Befunde von hippocampalem und kortikalem cholinergem Faserverlust sowie die Degeneration von cholinergen Nervenzellen im basalen Vorderhirn auch im Mausmodell reproduzieren lassen. Unsere Resultate zeigen, dass sich auch in der APP23-Maus ein signifikanter cholinergischer Nervenfaserverlust im Kortex findet. Dieser scheint in erster Linie auf die direkte und lokale Wirkung der kortikalen Plaques zu beruhen, da in unserem Mausmodell die Anzahl cholinergischer Neurone im basalen Vorderhirn nur unwesentlich reduziert ist.

Das Amyloid und der Schlaganfall

Bei rund 90% der AD-Patienten finden sich nebst parenchymalen auch zerebrovaskuläre Amyloidablagerungen. Die zerebrale Amyloidangiopathie existiert aber auch als eigenständige Erkrankung mit sporadischem Auftreten und ist für 10% aller nicht-traumatischen Hirnblutungen verantwortlich. Die Pathogenese dieser fatalen Gefässamyloidose konnte mangels geeigneter Tiermodelle bis heute nur unbefriedigend untersucht werden. Die APP23-Maus zeigt eine mit dem Alter zunehmend ausgeprägte Amyloidangiopathie [14]. Interessanterweise konnten wir zeigen, dass das Amyloid, das sich in der Gefässwand abgelagert nicht aus dem Blut oder der Gefässwand stammt, sondern dass das Amyloid in den Nervenzellen produziert wird und durch Transport- und Diffusionsvorgänge in die Gefässwand gelangt [14, 15]. Jüngste Untersuchungen haben weiter gezeigt, dass in APP23-Mäusen mit zunehmender zerebraler Gefässamyloidose Mikroblutungen auftreten, welche in Zahl und Intensität mit dem Gefässamyloid korrelieren. Die Amyloidablagerungen führen zum Verlust von Gefässwandmuskelzellen, zur Dilatation von Gefässen und, in sehr alten Mäusen, zu spontanen Hirnblutungen [16].

Das Amyloid und die Impfung

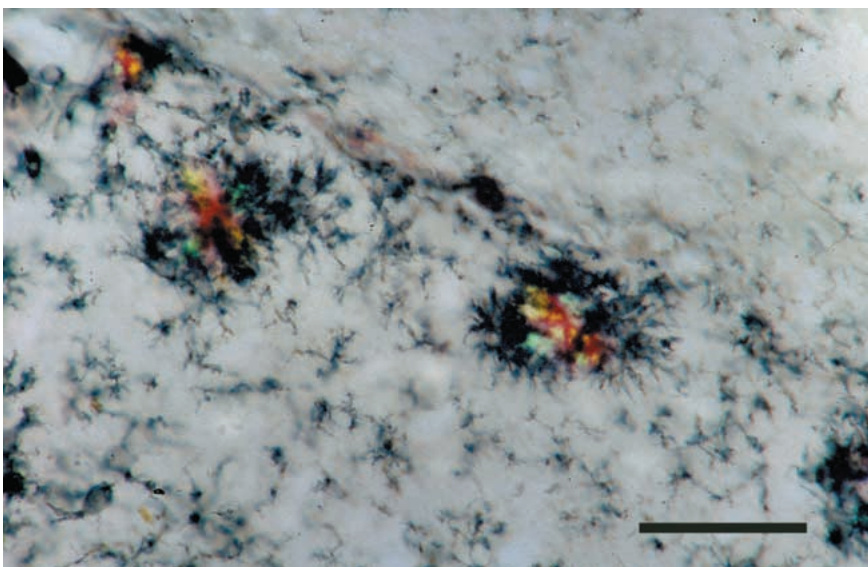
Aufgrund der oben dargelegten Pathomechanismen lässt sich vermuten, dass eine Reduktion der Amyloid-Akkumulation im Hirngewebe den Krankheitsprozess verlangsamen und den Abfall der kognitiven Leistungen vermindern könnte. Die Arzneimittelforschung verfolgt daher in letzter Zeit drei Strategien: Eine erste zielt darauf ab, die Aktivität der Sekretasen, welche für die Abspaltung von A β aus dem Amyloid-Vorläuferprotein verantwortlich sind, zu hemmen und dadurch die Bildung von Amyloid im Gehirn zu unterbinden. Eine zweite

Strategie geht dahin, mit sogenannten Fibrillenblockern den Fibrillisationsprozess von A β zu verzögern, dies in der Hoffnung, dadurch die parenchymale Amyloidablagerung zu verhindern. Eine dritte relativ neue Strategie setzt sich zum Ziel, den natürlichen Abbau von A β zu beschleunigen. Auf diesem Gebiet kam es vor zwei Jahren zu einer wohl bahnbrechenden neuen Erkenntnis: es wurde nämlich gezeigt, dass die Immunisierung mit A β die Entstehung von Amyloidplaques in transgenen Mausmodellen verhindern kann [17]. Wurden die Mäuse immunisiert bevor erste Amyloidablagerungen auftraten, konnte die Bildung einer Amyloidose fast vollständig verhindert werden. Bereits gebildete Ablagerungen konnten bei späterer Immunisierung drastisch vermindert oder gar aufgelöst werden. Tatsächlich ist es auch gelungen zu zeigen, dass eine solche Reduktion des Amyloids im Gehirn mit einer verbesserten kognitiven Leistungsfähigkeit im Vergleich zu nicht immunisierten Kontrolltieren einhergeht [18, 19].

Über die Mechanismen, die diesen Befunden zugrunde liegen, kann bis heute nur spekuliert werden. Wir konnten zeigen, dass in der APP23-Maus Amyloidablagerungen von hypertrophen und aktivierten Mikrogliazellen umgeben werden (Abb. 3), es aber unter Normalbedingungen nicht zu einer Phagozytose des Amyloides kommt [20, 21]. Es wird nun spekuliert, dass in immunisierten Mäusen die Mikroglia via Fc-Rezeptor vermittelter Phagozytose das Amyloid abbauen kann [22]. Um diese Hypothese zu prüfen, planen wir Fc-Rezeptor-defiziente Mäuse mit APP23-Mäusen zu verpaaren. Falls die Hy-

Abbildung 3.

Aktiviert hypertrophe Mikroglia (dunkelblau) umgibt kongophile Amyloidablagerungen (grün-rot) im Neokortex einer alten APP23-Maus. Die Mikroglia wurde mit einem Antikörper gegen CD11b gefärbt. Das Amyloid ist mit Kongorot angefärbt und zeigt unter polarisiertem Licht den Effekt der Doppelbrechung. Masstab = 50 μ m.



pothese richtig ist, sollte die Immunisierung in solchen Mäusen keinen Effekt mehr haben.

Zerebrale Amyloidosen: ein Ausblick

Die fatalen Auswirkungen von Amyloidplaques im Mausmodell haben gezeigt, dass den Amyloidablagerungen eine zentrale Rolle bei der Neurodegeneration zukommt und dass Amyloidablagerungen in der Gefässwand *per se* zu spontanen zerebralen Blutungen führen können. Neueste Spekulationen schlagen vor, dass Amyloid eine inhärente Erscheinungsform von verschiedensten Proteinen ist, wobei der Organismus zeitlebens aktiv dieser Amyloidbildung entgegenzuwirken hat. Mit zunehmendem Alter, so die Hypothese, könnten dann aufgrund einer verminderten Inhibition dieser Amyloidbildung zerebrale Amyloidablagerungen entstehen [23]. Neben der AD existieren weitere Krankheiten, die mit einer zerebralen Amyloidose einhergehen. Patienten mit der sogenannten «Britischen Demenz» und Patienten mit der «Dänischen Demenz» entwickeln parenchymale Amyloidplaques und Gefässamyloid in vergleichbarer Weise wie bei der AD. Das Amyloid ist aber nicht vom A β -Typ sondern besteht aus einem 34 Aminosäure langen Peptid ABri im Falle der «Britischen Demenz» und aus einem ebenso langen Peptid ADan in der «Dänischen Demenz». ABri und ADan werden ganz ähnlich wie A β wiederum proteolytisch von einem Vorläuferprotein abgespalten [24, 25]. Bei einer isländischen Form von zerebraler Amyloidose findet sich eine Punktmutation im Cystatin-C-Gen. Diese führt zur Bildung von ACys-Amyloid, welches ausschliesslich in der Gefässwand abgelagert wird. Patienten mit einer solchen Cystatin-C-Mutation sterben meist in jungen Jahren an Hirnblutungen [26].

So verschieden nuanciert die neuropathologischen und klinischen Symptome all dieser letztendlich auf Amyloidablagerungen beruhenden Erkrankungen auch sind, glauben wir doch, dass den zerebralen Amyloidosen weitgehend gemeinsame Pathomechanismen bezüglich Neurodegeneration und Hämorrhagien zugrunde liegen. Um diese Gemeinsamkeiten näher zu charakterisieren, werden wir in unsere zukünftige Forschung vermehrt nicht-A β -Amyloidosen miteinbeziehen und entsprechende Modelle generieren. Therapieansätze, die grundsätzlich für alle zerebralen Amyloidosen Wirkung zeigen sollten, sind denkbar und lukrativ. Die mit Enthusiasmus verfolgte Immunisierungs-Methode, die Entwicklung einer «Alzheimer-Impfung» also, erscheint dabei neben Fibrillenblockern und Sekretasenhemmern heute die vielversprechendste Therapiestrategie.

Danksagung

Wir möchten allen Mitgliedern unseres Labors danken, insbesondere Dr. M. Calhoun, Dr. A. Phinney, Dr. M. Stalder, S. Boncristiano, L. Bondolfi, M. Herzig, M. Meyer-Lühmann und M. Pfeifer, die bedeutend zu den obig zusammengefassten Studien beigetragen haben. Ebenso möchten wir die langjährige Zusammenarbeit mit Dr. M. Staufenbiel (Novartis), Prof. A. Probst und PD Dr. M. Tolnay (Institut für Pathologie,

Basel) erwähnen. Prof. M. Mihatsch möchten wir für die grosszügige Unterstützung unserer Forschungsprojekte an seinem Institut danken und Dr. A. Monsch für seine kritische Durchsicht dieses Manuskriptes. Unsere Studien sind unterstützt vom Schweizerischen Nationalfonds, der Thyssen Stiftung, der «American Health Assistance Foundation», der Stiftung für Verhalten und Umwelt, der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften, der Horten Stiftung und der Roche Stiftung.

Literatur

- Alzheimer A. Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozess der Hirnrinde. *Neurologisches Centralblatt* 1906;25:1134.
- Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiat Psych-Gerichtl Med* 1907;64:146-8.
- Volz A, Monsch AU, Zahno A, Wettstein A, Stähelin HB, Grünig R. Was kostet die Schweiz die Alzheimer-Krankheit 1998? Eine präliminäre Analyse. *Praxis Schweizer Rundschau für Medizin* 2000;89:803-11.
- Hy LX, Keller DM. Prevalence of AD among whites: a summary by levels of severity. *Neurology* 2000;55:198-204.
- Sisodia SS. An accomplice for gamma-secretase brought into focus. *Science* 2000;289:2296-7.
- Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 1999;399:A23-31.
- Mayeux R, Saunders AM, Shea S, Mirra S, Evans D, Roses AD, et al. Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Disease Centers Consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease. N Engl J Med* 1998;338:506-11.
- Bertram L, Blacker D, Mullin K, Keeney D, Jones J, Basu S, et al. Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science* 2000;290:2302-3.
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:13287-92.
- Yankner BA. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* 1996;16:921-32.
- Calhoun ME, Wiederhold KH, Abramowski D, Phinney AL, Probst A, Sturchler-Pierrat C, et al. Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature* 1998;395:755-6.
- Phinney AL, Deller T, Stalder M, Calhoun ME, Frotscher M, Sommer B, et al. Cerebral amyloid induces aberrant axonal sprouting and ectopic terminal formation in amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 1999;19:8552-9.
- Geddes JW, Monaghan DT, Cotman CW, Lott IT, Kim RC, Chui HC. Plasticity of hippocampal circuitry in Alzheimer's disease. *Science* 1985;230:1179-81.
- Calhoun ME, Burgermeister P, Phinney AL, Stalder M, Tolnay M, Wiederhold KH, et al. Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:14088-93.
- Burgermeister P, Calhoun ME, Winkler DT, Jucker M. Mechanisms of cerebrovascular amyloid deposition. Lessons from mouse models. *Ann N Y Acad Sci* 2000;903:307-16.
- Winkler DT, Bondolfi L, Herzig MC, Jann L, Calhoun ME, Wiederhold KH, et al. Spontaneous hemorrhagic stroke in a mouse model of cerebral amyloid angiopathy. *J Neurosci* 2001;21:1619-27.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999;400:173-7.
- Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, et al. A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 2000;408:979-82.
- Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, et al. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 2000;408:982-5.
- Stalder M, Phinney A, Probst A, Sommer B, Staufenbiel M, Jucker M. Association of microglia with amyloid plaques in brains of APP23 transgenic mice. *Am J Pathol* 1999;154:1673-84.
- Bornemann KD, Wiederhold KH, Pauli C, Ermini F, Stalder M, Schnell L, et al. Abeta-induced inflammatory processes in microglia cells of APP23 transgenic mice. *Am J Pathol* 2001;158:63-73.
- Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, et al. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 2000;6:916-9.
- Fandrich M, Fletcher MA, Dobson CM. Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature* 2001;410:165-6.
- Vidal R, Frangione B, Rostagno A, Mead S, Revesz T, Plant G, et al. A stop-codon mutation in the BRI gene associated with familial British dementia. *Nature* 1999;399:776-81.
- Vidal R, Revesz T, Rostagno A, Kim E, Holton JL, Bek T, et al. A decamer duplication in the 3' region of the BRI gene originates an amyloid peptide that is associated with dementia in a Danish kindred. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:4920-5.
- Levy E, Lopez-Otin C, Ghiso J, Gelner D, Frangione B. Stroke in Icelandic patients with hereditary amyloid angiopathy is related to a mutation in the cystatin C gene, an inhibitor of cysteine proteases. *J Exp Med* 1989;169:1771-8.