

- [65] G. Kartha, J. Bello u. D. Harker, *Nature* 213, 862 (1967).
- [66] H. W. Wyckoff, K. D. Hardman, N. M. Allewell, T. Inagami, L. N. Johnson u. F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* 242, 3984 (1967).
- [67] F. M. Richards, C. R. Trav. Lab. Carlsberg 29, 322, 329 (1955).
- [68] F. M. Richards u. P. J. Viithayathil, *J. Biol. Chem.* 234, 1459 (1959).
- [69] D. M. Brown u. A. R. Todd in E. Chargaff u. J. N. Davidson: *The Nucleic Acids: Chemistry and Biology*. Academic Press, New York 1955, Bd. 1, S. 409.
- [70] F. M. Richards u. H. G. Wyckoff in P. D. Boyer: *The Enzymes*. Academic Press, New York 1971, 3. Aufl., Bd. 4, S. 647ff.
- [71] B. Gutte u. R. B. Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 501 (1969).
- [72] B. Gutte u. R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* 246, 1922 (1971).
- [73] R. Hirschmann, R. F. Nutt, D. F. Veber, R. A. Vitali, S. L. Varga, T. A. Jacob, F. W. Holly u. R. G. Denkwalter, *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 507 (1969).
- [74] F. H. White, *J. Biol. Chem.* 235, 383 (1960).
- [75] R. F. Goldberger, C. J. Epstein u. C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 238, 628 (1963).
- [76] C. B. Anfinsen: *Les Prix Nobel en 1972*. Stockholm 1973; *Angew. Chem.* 85, 1065 (1973).
- [77] C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* 221, 405 (1956).
- [78] M. C. Lin, *J. Biol. Chem.* 245, 6726 (1970).
- [79] M. C. Lin, B. Gutte, S. Moore u. R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* 245, 5169 (1970).
- [80] M. C. Lin, B. Gutte, D. G. Caldi, S. Moore u. R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* 247, 4768 (1972).
- [81] C. B. Anfinsen, S. E. G. Aqvist, J. P. Cooke u. B. Jonsson, *J. Biol. Chem.* 234, 1118 (1959).
- [82] J. J. Beintema u. M. Gruber, *Biochim. Biophys. Acta* 147, 612 (1967).
- [83] R. L. Jackson u. C. H. W. Hirs, *J. Biol. Chem.* 245, 637 (1970).
- [84] J. J. Phelan u. C. H. W. Hirs, *J. Biol. Chem.* 245, 654 (1970).
- [85] M. Laskowski, Sr., in P. D. Boyer: *The Enzymes*. Academic Press, New York 1971, 3. Aufl., Bd. 4, S. 289ff.
- [86] O. T. Avery, C. M. MacLeod u. M. McCarty, *J. Exp. Med.* 79, 137 (1944).
- [87] M. McCarty u. O. T. Avery, *J. Exp. Med.* 83, 89 (1946).
- [88] M. McCarty, *J. Gen. Physiol.* 29, 123 (1946).
- [89] M. Kunitz, *J. Gen. Physiol.* 33, 349 (1950).
- [90] U. Lindberg, *Biochemistry* 6, 335 (1967).
- [91] P. A. Price, T.-Y. Liu, W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 244, 917 (1969).
- [92] J. Salnikow, S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 245, 5685 (1970).
- [93] J. Salnikow, T.-H. Liao, S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 248, 1480 (1973).
- [94] T.-H. Liao, J. Salnikow, S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 248, 1489 (1973).
- [95] E. Gross u. B. Witkop, *J. Biol. Chem.* 237, 1856 (1962).
- [96] B. J. Catley, S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 244, 933 (1969).
- [97] T. E. Hugli u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 246, 7191 (1971).
- [98] J. F. Riordan, M. Sokolowsky u. B. L. Vallee, *J. Amer. Chem. Soc.* 88, 4104 (1966).
- [99] P. A. Price, S. Moore u. W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 244, 924 (1969).
- [100] J. Salnikow u. D. Murphy, *J. Biol. Chem.* 248, 1499 (1973).
- [101] P. A. Price, W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 244, 929 (1969).
- [102] K. Takahashi, W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 242, 4682 (1967).
- [103] T.-Y. Liu, W. H. Stein, S. Moore u. S. D. Elliott, *J. Biol. Chem.* 240, 1143 (1965).
- [104] T.-Y. Liu, *J. Biol. Chem.* 242, 4029 (1967).
- [105] T. G. Rajagopalan, W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 241, 4295 (1966).
- [106] G. R. Stark, W. H. Stein u. S. Moore, *J. Biol. Chem.* 235, 3177 (1960).
- [107] F. Wöhler, *Poggendorfs Ann.* 12, 253 (1828).
- [108] A. Cerami u. J. M. Manning, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 1180 (1971).

## Antikörperstruktur und molekulare Immunologie (Nobel-Vortrag)<sup>[\*\*]</sup>

Von Gerald M. Edelman<sup>[\*]</sup>

Einige Wissenschaften sind wegen ihrer Allgemeingültigkeit interessant, andere wegen ihrer Fähigkeit, Voraussagen zu treffen. Die Immunologie dagegen ist besonders fesselnd, weil sie ungewöhnliche Ideen hervorbringt, von denen einige in anderen Wissensgebieten kaum gefunden worden wären. In der Tat glauben viele Immunologen, daß die Immunologie deswegen auf andere Zweige von Biologie und Medizin einen großen Einfluß haben wird. Bei einer so ehrenvollen Gelegenheit wie dieser fühle ich mich auch dadurch bevorzugt, daß ich über einige grundlegende Ideen der Immunologie und besonders über ihre Beziehung zur Struktur der Antikörper sprechen darf.

Die Arbeit über die Struktur der Antikörper hat die Immunologie in ähnlicher Weise mit der Molekularbiologie verbunden wie die früheren Untersuchungen an Hapten-Antigenen die Immunologie mit der Chemie verknüpften. Diese Strukturuntersuchungen kann man als wesentliches Projekt der molekularen Immunologie ansehen, deren Aufgabe es ist, die Eigenschaften des Immunsystems anhand seiner molekularen Struktur zu erklären. In diesem Vortrag möchte ich einige der Folgerungen aus der Strukturanalyse von Antikörpern diskutieren. Statt das Thema erschöpfend zu behandeln, was schon weitgehend getan worden ist<sup>[1-4]</sup>, werde ich einige Gedanken hervorheben, die sich aus den Ergebnissen der Strukturanalyse entwickelt haben. Im Zusammenhang damit möchte ich dann das verwandte, aber weniger gut erforschte Thema der Oberflächen-Antikörper von Lymphoidzellen erörtern und einige neuere Experimente beschreiben, die meine Kollegen und ich zum Verständnis der molekularen Mechanismen, durch welche die

[\*] Prof. Dr. G. M. Edelman  
The Rockefeller University  
New York, N. Y. 10021 (USA)

[\*\*] Copyright © The Nobel Foundation 1973. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieser Übersetzung.

Bindung von Antigenen die Klon-Proliferation dieser Zellen induziert, entwickelt hatten.

In der Wissenschaft der Immunologie nehmen die Antikörper eine zentrale Stellung ein, und zwar ganz offensichtlich aus folgendem Grund: Sie sind diejenigen Proteinmoleküle, die für das Erkennen fremder Moleküle oder Antigene verantwortlich sind. Es ist daher vielleicht keine sehr tief-schürfende Erkenntnis, wenn man vermutet, daß eine Untersuchung ihrer Struktur für das Verständnis der Immunität von Wert sein würde. Was sich jedoch aus diesen Untersuchungen ergeben hat, waren Überraschungen und Neuformulierungen von Begriffen.

Diese Neuformulierungen boten eine molekulare Grundlage für die Selektionstheorien der Immunität, zuerst von Nils Jerne<sup>[5]</sup> und MacFarlane Burnet<sup>[6]</sup> vorgebracht, und halfen daher mit, einen einschneidenden Umbruch im immunologischen Denken herbeizuführen. Die grundlegende Idee dieser Theorien ist heute das zentrale Dogma der modernen Immunologie: Das Erkennen von Antigenen auf molekularer Ebene findet durch Selektion unter Zellklonen statt, die bereits kompetent sind, die entsprechenden Antikörper – von jeweils verschiedener Spezifität – zu produzieren (Abb. 1).

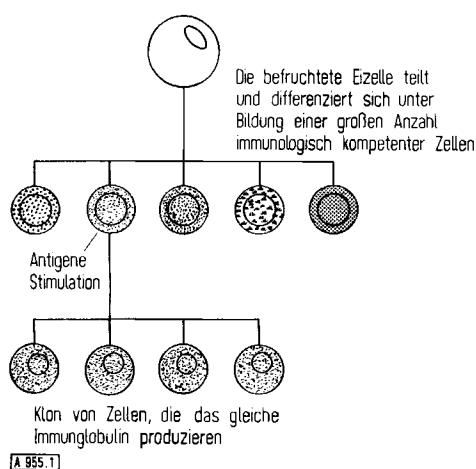


Abb. 1. Die Zeichnung gibt die Grundzüge der Klonselektions-Theorie wieder. Die Schattierungen bedeuten, daß verschiedenartige Zellen Antikörper-Rezeptoren verschiedener Spezifität besitzen, obwohl alle Rezeptoren einer gegebenen Zelle die gleiche Spezifität aufweisen. Die Stimulation durch ein Antigen bewirkt eine Klonexpansion (Reifung, Mitose und Antikörperproduktion) derjenigen Zellen, die dem Antigen komplementäre Rezeptoren haben.

Die Ergebnisse vieler Untersuchungen von Zellimmunologen (s.<sup>[1,2]</sup>) lassen mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß jede Zelle nur Antikörper einer einzigen Art herstellt, daß Zellteilung und Antikörpersynthese durch die Wechselwirkung zwischen Antigen und Rezeptor-Antikörpern der Zelloberfläche stimuliert werden, und daß diese Antikörper dieselbe Spezifität aufweisen wie die von der Tochterzelle produzierten Antikörper. Aus diesen Schlußfolgerungen und aus der Theorie der Klon-Selektion ergeben sich mehrere grundsätzliche Fragen: Wie kann eine hinreichende Mannigfaltigkeit von Antikörpern durch das Lymphoidsystem hervorgebracht werden? Durch welchen Mechanismus wird der Lymphocyt nach der Wechselwirkung mit einem Antigen stimuliert?

Ende der fünfziger Jahre, als man gerade begonnen hatte, die Antikörperstruktur intensiv zu untersuchen, konnten diese Fragen noch nicht so genau gestellt werden. Die klassischen Arbeiten von Landsteiner über Hapten-Antigene<sup>[7]</sup> hatten deutliche Hinweise dafür geliefert, daß die immunologische Spezifität die Folge einer molekularen Komplementarität zwischen den determinanten Gruppen der Antigenmoleküle und des antigen-bindenden Zentrums des Antikörpermoleküls ist. Außerdem gab es sowohl Gründe für die Annahme, daß die meisten Antikörper zweiwertig sind<sup>[8]</sup>, als auch dafür, daß es Antikörper verschiedener Klassen gibt<sup>[9]</sup>. Die physikalisch-chemischen Untersuchungen von Tiselius<sup>[10]</sup> hatten bestätigt, daß Antikörper Proteine mit außerordentlicher Ladungsheterogenität sind. Weiterhin hatte eine Anzahl von Forschern gezeigt, daß die Bindungskonstanten von Antikörpern, die ein einziges Hapten-Antigen binden können, heterogen sind<sup>[11]</sup>. Trotz des Wertes aller dieser Informationen war jedoch nur wenig über die genaue chemische Struktur von Antikörpern oder von dem, was man heute Immunglobuline nennt, bekannt.

### Die Vielkettenstruktur der Antikörper: Probleme der Größe und der Heterogenität

So notwendig wie die Strukturanalyse der Antikörper war, so groß waren die experimentellen Schwierigkeiten: Antikörper sind sehr große Proteine (Molekulargewichte 150 000 oder mehr) und außergewöhnlich heterogen. In den Jahren um 1958 wurden zwei Methoden angewendet, um die erste Schwierigkeit zu umgehen. Auf den Arbeiten von Petermann<sup>[12]</sup> und anderen fußend, verwandte Rodney Porter<sup>[13]</sup> proteolytische Enzyme, besonders Papain, um eine begrenzte Spaltung der  $\gamma$ -Globulinfraction des Serums in Fragmente zu erreichen. Er fraktionierte dann mit Erfolg das Hydrolysat und erhielt antigen-bindende (Fab) und kristallisierbare (Fc) Fragmente. Später wurden andere Enzyme wie etwa Pepsin in ähnlicher Weise von Nisonoff und seinen Kollegen<sup>[14]</sup> herangezogen. Ich versuchte, die Moleküle von Immunglobulin G und Immunglobulin M mit einer anderen Methode in Polypeptidketten zu spalten, und zwar durch Reduktion ihrer Disulfidbindungen und durch Einwirkung dissoziierender Lösungsmittel wie z. B. 6M Harnstoff<sup>[15]</sup>. Dieses Verfahren brachte eine bedeutende Verringerung des Molekulargewichts und zeigte, daß das Immunglobulin-G-Molekül eine Vielkettenstruktur besitzt und nicht aus einer Kette besteht, wie man vorher geglaubt hatte. Weiterhin wiesen die Ketten aus beiden Immunglobulinen etwa dieselbe Größe auf. Es ergaben sich zwei Arten von Polypeptidketten<sup>[16]</sup> (jetzt leichte und schwere Ketten genannt); sie entsprachen aber offensichtlich nicht den Fragmenten, die man durch proteolytische Spaltung erhielt, und daher ergänzten sich die Ergebnisse beider Spaltungsverfahren. Ultrazentrifugen-Analysen zeigten, daß eine der Polypeptidketten ein Molekulargewicht in der Gegend von 20 000 besitzt – eine vernünftige Größe für die Bestimmung der Aminosäure-Sequenz mit den Methoden, die Anfang der sechziger Jahre zur Verfügung standen.

Trotzdem war das Haupthindernis für eine direkte Analyse der Antikörperstruktur die chemische Heterogenität der

Antikörper und ihrer antigen-bindenden Fragmente. Diejenigen, die damals die chemische Analyse des Antikörpermoleküls versuchten, sahen sich zwei brennenden Fragen gegenüber. Erstens: Lag die beobachtete Heterogenität der Antikörper nur in der Konformation ihrer Polypeptidketten, wie man weithin annahm, oder gab diese Heterogenität Verschiedenheiten in der Primärstruktur dieser Ketten wieder, wie es implizit von der Klonselektions-Theorie gefordert wurde? Zweitens: Wenn die Heterogenität auf einer großen Population von Molekülen mit verschiedener Primärstruktur beruhte, wie konnte man homogenes Material für eine genaue Strukturanalyse bekommen?

Man versuchte, diese Fragen gleichzeitig zu lösen, indem man sich einen Unfall der Natur zunutze machte, statt einen direkten physikalisch-chemischen Angriff zu beginnen. Es war schon einige Zeit bekannt, daß Tumoren von Lymphoidzellen, die Myelome heißen, homogene Serumproteine produzieren, die den normalen heterogenen Immunglobulinen ähneln. 1961 zeigten *M. D. Poulik* und ich, daß die Homogenität dieser Proteine sich in den Mustern der Stärkegelelektrophorese der dissoziierten Ketten widerspiegelt<sup>[16]</sup>. Einige Patienten mit multiplem Myelom scheiden im Urin Proteine aus, die in ihrer Antigenität mit den Immunglobulinen verwandt sind, deren wirkliche Natur aber seit ihrer ersten Beschreibung durch *Henry Bence Jones* im Jahre 1847 unbekannt geblieben war. Diese Bence-Jones-Proteine waren äußerst interessant, denn sie lassen sich aus dem Urin leicht in großen Mengen gewinnen, sind homogen und besitzen niedrige Molekulargewichte. Es schien naheliegend anzunehmen<sup>[16]</sup>, daß Bence-Jones-Proteine eine der Ketten des Immunglobulins waren, die zwar vom Myelom-Tumor synthetisiert, aber nicht in das homogene Myelomprotein inkorporiert und daher mit dem Urin ausgeschieden werden.

Diese Hypothese wurde an einem aufregenden Nachmittag bekräftigt, als mein Mitarbeiter *Joseph Gally* und ich<sup>[17]</sup> Lösungen von leichten Ketten, die wir aus unseren eigenen Serum-Immunglobulinen isoliert hatten, im klassischen Test für Bence-Jones-Proteinurie erhitzten. Sie verhielten sich wie Bence-Jones-Proteine: Die Lösungen wurden zuerst trüb, klärten sich aber bei weiterem Erhitzen wieder. Ein Vergleich der leichten Ketten der Myelomproteine mit den Bence-Jones-Proteinen durch Stärkegelelektrophorese in Harnstoff<sup>[17]</sup> und durch Peptidkartierung<sup>[18]</sup> bestätigte die Hypothese (Abb. 2). In der Tat fanden *Berggård* und ich später<sup>[19]</sup>, daß es in normalem Urin Gegenstücke zu den Bence-Jones-Proteinen gibt, die dieselben Eigenschaften aufweisen, aber chemisch heterogen sind.

Damals waren keine physikalischen Methoden bekannt, mit denen man Antikörper zu homogenen Proteinen fraktionieren konnte. Es war aber möglich, spezifisch reagierende Antikörper herzustellen, indem man mit Hilfe des Antigens Antigen-Antikörper-Aggregate herstellte und diesen Komplex dann mit dem freien Hapten dissoziierte. Obwohl wir wußten, daß diese spezifisch hergestellten Antikörper in ihrem elektrophoretischen Verhalten immer noch heterogen waren, schien es möglich zu sein, daß Antikörper gegen verschiedene Haptene Unterschiede in ihren Polypeptidketten aufweisen könnten. *Baruj Benacerraf* hatte eine Sammlung dieser Antikörper hergestellt, und zusammen mit unseren Kollegen<sup>[20]</sup> entschieden wir uns, mit

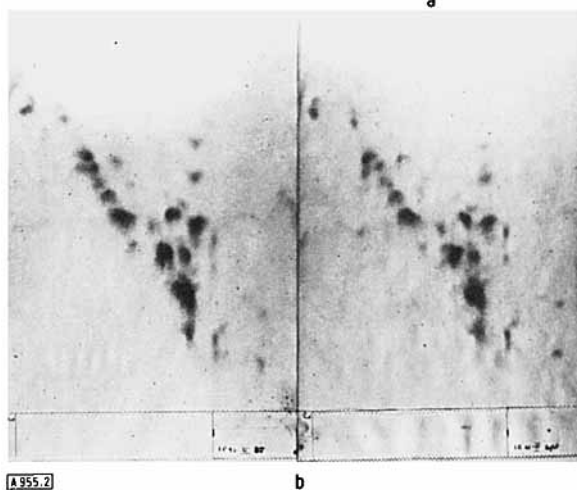
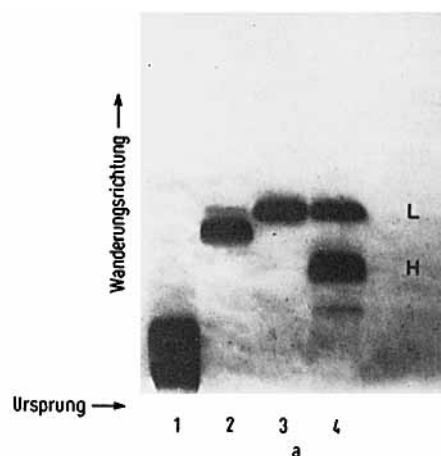


Abb. 2. Vergleich von leichten Ketten, die aus Serum-IgG-Myelomproteinen isoliert wurden, mit den Bence-Jones-Proteinen aus dem Urin desselben Patienten. a) Stärkegelelektrophorese in Harnstoff. 1 Serum-Myelomglobulin, 2 Bence-Jones-Protein aus Urin, 3 reduziertes und alkyliertes Bence-Jones-Protein, 4 reduziertes und alkyliertes Myelomprotein. L=leichte Kette, H=schwere Kette. b) Zweidimensionale Hochspannungselektrophorese von tryptischen Hydrolysaten. Das Muster auf der linken Seite stammt von Bence-Jones-Protein aus Urin, das auf der rechten Seite von der leichten Kette, die aus dem Serum-Myelomprotein desselben Patienten isoliert wurde.

denselben Methoden, die wir für die Bence-Jones-Proteine benutzt hatten, die Ketten dieser Antikörper zu vergleichen. Die Ergebnisse waren eindrucksvoll: Die gereinigten Antikörper zeigten drei bis fünf scharfe Banden im Bereich der Bence-Jones-Proteine oder leichten Ketten; Antikörper verschiedener Spezifität wiesen verschiedene Muster auf. In scharfem Gegensatz dazu zeigten normale Immunglobuline eine diffuse Zone, die sich über den ganzen Bereich dieser Banden erstreckte. Diese Versuche bewiesen nicht nur, daß sich Antikörper verschiedener Spezifität strukturell voneinander unterscheiden, sondern auch, daß ihre Heterogenität begrenzt ist.

Aus diesen Experimenten an Bence-Jones-Proteinen und gereinigten Antikörpern ergeben sich einige wichtige Schlußfolgerungen. Da verschiedene Bence-Jones-Proteine verschiedene Aminosäure-Zusammensetzungen aufwiesen, war es klar, daß Immunglobuline in ihrer Primärstruktur voneinander abweichen mußten. Diese Schlußfolgerung, die später von *Koshland*<sup>[21]</sup> für spezifisch gereinigte Antikörper bestätigt wurde, lieferte eine starke Stütze für die Selektionstheorie der Antikörperbildung. Darüber hinaus eröffnete sie die Möglichkeit einer direkten Analyse der Primärstruktur eines Immunglobulinmoleküls, denn

Bence-Jones-Proteine sind nicht nur aus homogenen leichten Ketten zusammengesetzt, sondern das Molekulargewicht ihrer Untereinheiten beträgt außerdem nur 23000. Der erste Bericht von *Hilsmann* und *Craig*<sup>[22]</sup> über Teilsequenzen einiger Bence-Jones-Proteine deutete darauf hin, daß sich die strukturelle Heterogenität der leichten Ketten auf den aminoterminalen (variablen) Bereich beschränkt, während der carboxyterminale Teil der Kette (die konstante Region) in allen Ketten desselben Typs gleich ist. Dieser Befund wurde bald durch Untersuchungen an anderen Bence-Jones-Proteinen verallgemeinert<sup>[23]</sup>.

Obwohl auch die schweren Ketten der Immunglobuline untersucht worden waren, wußte man doch wesentlich

schiedliche Klassencharakter<sup>[24]</sup> von strukturellen Unterschieden in den schweren Ketten, besonders in ihren konstanten Regionen, herrührt, wie ich weiter unten ausführen werde.

Mit der Aufklärung der Natur der Heterogenität von Immunglobulinketten und -klassen konnte sich die Aufmerksamkeit nun dem Problem zuwenden, Struktur und Evolution der Antikörper innerhalb einer gegebenen Klasse ihren antigen-bindenden Funktionen und Effektorfunktionen zuzuordnen. Wir beschlossen, uns auf das Immunglobulin G, die in Säugetieren vorherrschende Klasse, zu konzentrieren; die Arbeit über die Struktur der Ketten ließ annehmen, daß es hinreichend repräsentativ sein würde.

Tabelle 1. Human-Immunglobulinklassen.

Klasse	physiologische Eigenschaften	schwere Kette [a]	leichte Kette	Molekülformel [b]	Molekulargewicht ( $\times 10^{-3}$ ) und Sedimentationskonstante	Kohlenhydrat-Gehalt
IgG	Komplementfixierung; placentaler Transfer	$\gamma$	$\kappa$ oder $\lambda$	$(\gamma_2\kappa_2)$ oder $(\gamma_2\lambda_2)$	143–149; 6.7S	2.5%
IgA	lokalisierter Schutz in externen Sekreten	$\alpha$	$\kappa$ oder $\lambda$	$(\alpha_2\kappa_2)$ oder $(\alpha_2\lambda_2)$	158–162; 6.8–11.4S	5–10%
IgM	Komplementfixierung; frühe Immunantwort	$\mu$	$\kappa$ oder $\lambda$	$(\mu_2\kappa_2)_5$ oder $(\mu_2\lambda_2)_5$	800–950; 19.0S	5–10%
IgD	unbekannt	$\delta$	$\kappa$ oder $\lambda$	$(\delta_2\kappa_2)$ oder $(\delta_2\lambda_2)$	175–180; 6.6S	10%
IgE	Reaginaktivität; Mastzellenfixierung	$\epsilon$	$\kappa$ oder $\lambda$	$(\epsilon_2\kappa_2)$ oder $(\epsilon_2\lambda_2)$	185–190; 8.0S	12%

[a] Die klassenbestimmenden Unterschiede dieser Ketten befinden sich in den konstanten Regionen.

[b] IgA kann zusätzliche, nicht verwandte Ketten (SC und J) aufweisen; J-Ketten finden sich auch in IgM.

weniger über deren Struktur. So vermutete man z. B., wußte es aber nicht, daß auch sie variable Regionen besitzen, die denen der leichten Ketten ähneln. Vergleiche zwischen schweren und leichten Ketten stellten aber sogar in diesem frühen Stadium eine weitere Ursache der Antikörper-Heterogenität klar: das Vorkommen von Immunglobulinklassen<sup>[24]</sup>.

Antikörper innerhalb einer bestimmten Klasse besitzen ähnliche Molekulargewichte, einen ähnlichen Kohlenhydrat-Gehalt, eine ähnliche Aminosäure-Zusammensetzung und ähnliche physiologische Funktionen (Tabelle 1), sind aber trotzdem noch heterogen in ihrer Ladung und ihren Antigenbindungsaffinitäten. Untersuchungen der Klassen in verschiedenen Tierspezies wiesen darauf hin, daß sowohl die Mehrkettenstruktur als auch die Heterogenität ubiquitäre Eigenschaften von Immunglobulinen sind. Die Klassen haben sich offensichtlich während der Evolution<sup>[25]</sup> zur Ausführung verschiedener physiologisch wichtiger Funktionen herausgebildet, die man, um sie von den Antigenbindungs- oder -erkennungsfunktionen zu unterscheiden, Effektorfunktionen genannt hat. Die verschiedenen Äußerungen der humoralen Immunantworten sowie ihre prophylaktischen, therapeutischen und pathologischen Konsequenzen können heute allgemein mit den Eigenschaften der jeweils ansprechenden Antikörperklasse erklärt werden. Beim Vergleich der Struktur ihrer Ketten wurde es klar, daß, obwohl Immunglobuline aller Klassen ähnliche Arten von leichten Ketten enthalten (Tabelle 1), der unter-

## Die vollständige kovalente Struktur und die Domänen-Hypothese

Die Kenntnis der Kettenstruktur und ihre Zuordnung zu den proteolytischen Fragmenten<sup>[26, 27]</sup> machten einen Versuch ausführbar, die vollständige Struktur eines Immunglobulin-G-Moleküls zu bestimmen. Meine Kollegen und ich begannen dieses Projekt 1965, und bevor es 1969 abgeschlossen werden konnte<sup>[28]</sup>, hatten sieben von uns einen Großteil ihrer wachen Stunden den technischen Einzelheiten gewidmet. Eins unserer Hauptziele war es, eine vollständige und endgültige Referenzstruktur zu bekommen, mit der wir Teilstrukturen anderer Immunglobuline vergleichen konnten. Im besonderen wollten wir die genaue Struktur einer schweren Kette und einer leichten Kette von demselben Molekül miteinander vergleichen.

Ein weiteres Ziel bestand darin, die regionale Differenzierung der Struktur, die sich zur Ausführung verschiedener physiologischer Funktionen in der Immunantwort entwickelt hatte, im Detail zu prüfen. Die Arbeiten von *Porter*<sup>[13]</sup> hatten gezeigt, daß das sogenannte Fab-Fragment von Immunglobulin G einwertig ist und Antigene bindet, während das Fc-Fragment das nicht tut. Dies gab einen ersten Hinweis darauf, daß Immunglobulinmoleküle in mehrere Regionen eingeteilt sind, von denen jede andere Funktionen erfüllt. In Übereinstimmung mit den Selektionstheorien der Immunität war es folgerichtig anzunehmen, daß V-Regionen von sowohl leichten als auch schweren Ketten

antigen-bindende Funktionen ausüben. Erste Hinweise darauf, daß einige der C-Regionen mit den physiologisch signifikanten Effektorfunktionen zu tun haben, ergaben sich daraus, daß gezeigt wurde, daß Fc-Fragmente Komponenten des Komplementsystems binden können, einer komplexen Gruppe von Proteinen, die für die immunologisch induzierte Zell-Lyse verantwortlich sind<sup>[29]</sup>. Eine genauere Zuordnung von Struktur und Funktion erforderte jedoch die Kenntnis der gesamten Struktur.

Die Aminosäuresequenz-Analyse der Fc-Region von normalen Kaninchen- $\gamma$ -Ketten durch Hill und seine Kollegen<sup>[30]</sup> ergab, daß der carboxyterminale Abschnitt der schweren Ketten homogen ist. Aufgrund interner Homologien in dieser Region schlugen Hill<sup>[30]</sup> sowie Singer und Doolittle<sup>[31]</sup> als Hypothese vor, daß die Gene für die Immunglobulin-Ketten sich durch Verdoppelung eines Gens von einer Größe, die für die Codierung eines Vorläuferproteins von ungefähr 100 Aminosäureresten Länge ausreichte, entwickelt hatten. Obwohl eine direkte Bestätigung dieser Hypothese offensichtlich unmöglich ist, wurde sie durch die Ergebnisse unserer Analyse<sup>[28]</sup> der vollständigen Aminosäure-Sequenz und der Anordnung der Disulfidbrücken eines gesamten IgG-Myelomproteins stark gestützt.

Durch Vergleich der Aminosäure-Sequenzen der schweren Ketten dieses Proteins mit anderen, die in Porters Laboratorium<sup>[32]</sup> und die von Bruce Cunningham und seinen Kollegen in unserem Laboratorium untersucht wurden<sup>[33]</sup>, ergab sich, daß schwere Ketten variable ( $V_H$ ) Regionen aufweisen, d. h. Regionen, die sich voneinander in der Sequenz von 110–120 Resten, gerechnet vom aminoterminalen Ende, unterscheiden (Abb. 3).

Die Prüfung der Aminosäure-Sequenzen (Abb. 4 und 5) gestattete uns, die folgenden zusätzlichen Schlußfolgerungen zu ziehen:

1. Die variablen (V) Regionen der leichten und der schweren Ketten sind einander homolog. Sie sind aber offensichtlich den konstanten Regionen dieser Ketten nicht homolog.

V-Regionen desselben Moleküls scheinen miteinander nicht näher verwandt zu sein als mit V-Regionen anderer Moleküle.

2. Die konstante (C) Region der  $\gamma$ -Ketten besteht aus drei Homologie-Regionen, nämlich  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ , die untereinander und den konstanten Regionen der leichten Ketten eng homolog sind.

3. Jede variable Region und jede konstante Homologie-Region enthält eine Disulfidbrücke; daraus ergibt sich, daß die sich innerhalb einer Kette befindenden Disulfidbrücken linear und periodisch in der Struktur verteilt sind.

4. Die Region, die alle zwischen den Ketten befindlichen Disulfidbrücken enthält, befindet sich im Zentrum der linearen Sequenz der schweren Kette und besitzt kein homologes Gegenstück in anderen Abschnitten der schweren oder leichten Ketten.

Diese Schlußfolgerungen führten uns zur Annahme, daß das Molekül zu einem Haufen kompakter Domänen gefaltet ist<sup>[28, 33]</sup>, von denen jede durch getrennte variable oder konstante Homologie-Regionen (Abb. 6) gebildet wird. Bei einer solchen Anordnung ist jede Domäne durch eine einzige innerhalb der Kette befindliche Disulfidbrücke stabilisiert und an benachbarte Domänen durch weniger dicht gefaltete Abschnitte der Polypeptidkette gebunden. Eine zweizählige Pseudosymmetrieachse verknüpft die  $V_L C_L$ - mit den  $V_H C_H1$ -Domänen, und eine wirklich zweizählige Achse durch die Disulfidbrücken, die die schweren Ketten miteinander verbinden, verknüpft die  $C_H2$ — $C_H3$ -Domänen. Die Tertiärstruktur innerhalb jeder homologen Domäne ist vermutlich sehr ähnlich. Weiterhin steuert jede Domäne wahrscheinlich wenigstens ein aktives Zentrum bei, das eine Funktion des Immunglobulinmoleküls erfüllt.

Diese letztere Annahme läßt sich sehr sauber an der Wechselwirkung von V-Region-Domänen nachweisen. Die Rekonstitution von aktiven Antikörpermolekülen durch Rekombination der vorher isolierten schweren und leichten

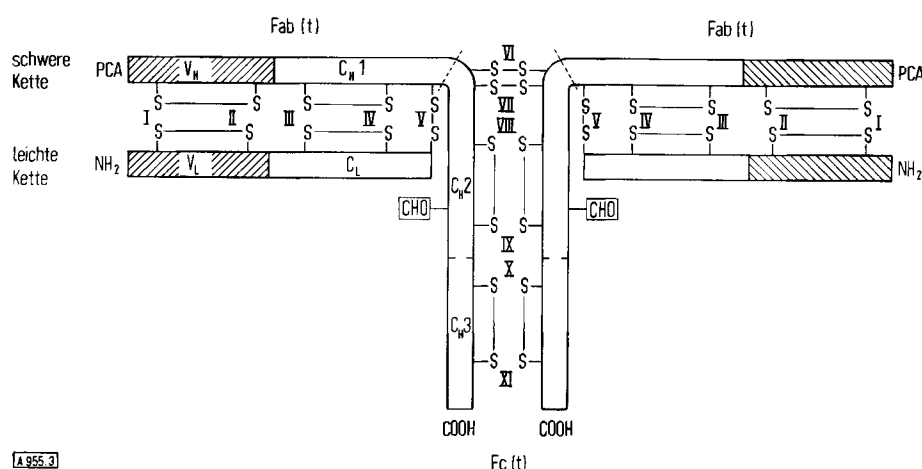


Abb. 3. Gesamtanordnung der Ketten und Disulfidbrücken von menschlichem  $\gamma G_1$ -Immunglobulin Eu. I–XI sind Halbcystinreste, I–V bezeichnen korrespondierende Halbcystinreste in leichten und schweren Ketten. PCA = Oxopyrrolidincarbonyl; CHO = Kohlenhydratrest. Fab(t) und Fc(t) beziehen sich auf Fragmente, die durch Trypsinspaltung entstehen, wobei die schweren Ketten, wie durch gestrichelte Linien angedeutet, oberhalb der Halbcystinreste VI gespalten werden. Die variablen Regionen  $V_H$  und  $V_L$  sind homolog. Die konstante Region der schweren Kette ( $C_H$ ) unterteilt sich in drei Regionen,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ , die einander und der C-Region der leichten Kette homolog sind. Die variablen Regionen erfüllen antigen-bindende Funktionen, die konstanten Regionen die Effektorfunktionen des Moleküls.

# Sequenzhomologien in den variablen Regionen von Eu

Eu	V <sub>L</sub>	(Reste 1–108)	1	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	10	Thr	Leu	Ser	Ala	Ser							
Eu	V <sub>H</sub>	(Reste 1–114)	PCA	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	–	Ala	Glu	Val	Lys	Lys									
Val	Gly	Asp	Arg	Val	20	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	30	Asn	Thr	–	–	Trp	Leu	Ala	Trp	Tyr			
Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Ile	Ile	Trp	Val		
Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	40	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Met	Tyr	50	Lys	Ala	Ser	Ser	–	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro
Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Gly	Ile	Val	Pro	Met	Phe	Gly	Pro	Pro	Asn	Tyr	Ala		
Ser	Arg	Phe	Ile	Gly	60	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	70	Glu	Phe	Thr	–	–	–	–	–	–	–	Leu	Thr	Ile	Ser
Gln	Lys	Phe	Gln	Gly	–	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Asn	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser		
Ser	Leu	Gln	Pro	Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	–	Tyr	Asn	Ser	Asp	Ser	Lys	Met	Phe	Gly		
Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Phe	Tyr	Phe	Cys	Ala	Gly	Gly	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Ser	Pro	Glu	Glu	Tyr		
Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Val	Lys	Gly																	
Asn	Gly	Gly	Leu	Val	Thr																				

A 955.4

Abb. 4. Vergleich der Aminosäure-Sequenzen der V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Regionen des Proteins Eu. Übereinstimmende Reste sind eingerahmt. Die durch Striche angedeuteten Deletionen sind eingefügt, um die Homologie zu verbessern.

Eu	C <sub>L</sub>	(Reste 109–214)	110	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	–
Eu	C <sub>H1</sub>	(Reste 119–220)	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	–	
Eu	C <sub>H2</sub>	(Reste 234–341)	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
Eu	C <sub>H3</sub>	(Reste 342–446)	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	–	

–	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	–
–	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	–
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Gln	Val	Lys
–	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	–

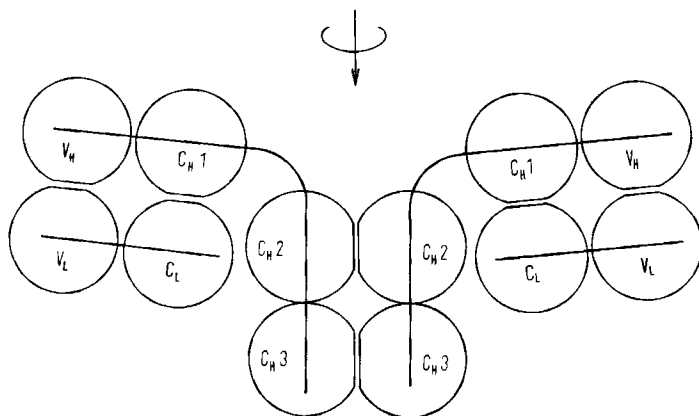
–	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys
–	Ser	Trp	Asn	Ser	–	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	–	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	–
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	–	Val	Gln	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Gln	Gln	Tyr	–
–	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Asp	–	Gly	Glu	Pro	Glu	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	–

170	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala
	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	–	Thr	Tyr	Ile
	Asp	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asn	Trp	Leu	Asp	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser

	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	–	Lys	Ser	Phe	–	–	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys
	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	–	Asp	Lys	Arg	Val	–	–	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	–	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly		
	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		

A 955.5

Abb. 5. Vergleich der Aminosäure-Sequenzen der C<sub>L</sub>-, C<sub>H1</sub>-, C<sub>H2</sub>- und C<sub>H3</sub>-Regionen des Proteins Eu. Die Deletionen, durch Striche angedeutet, sind zur Verbesserung der Homologie eingefügt worden. Übereinstimmende Reste sind eingerahmt; sowohl eingerahmte als auch schattierte Felder sollen paarweise übereinstimmende Reste kennzeichnen.



A 955 5

Abb. 6. Die Domänen-Hypothese. Schematische Anordnung der Domänen im freien Immunglobulin-G-Molekül. Der Pfeil deutet die zweizählige Symmetrieachse an. Die Homologie-Regionen (s. Abb. 3, 4 und 5), aus denen jede Domäne besteht, sind folgendermaßen bezeichnet:  $V_L$ ,  $V_H$  = Domänen, die aus variablen Homologie-Regionen gebildet werden;  $C_L$ ,  $C_H1$ ,  $C_H2$ ,  $C_H3$  = Domänen, die aus konstanten Homologie-Regionen gebildet werden. Man nimmt an, daß innerhalb jeder dieser Gruppen die Domänen eine ähnliche dreidimensionale Struktur aufweisen, und daß jede sich an einem aktiven Zentrum beteiligt. Die Zentren aus V-Domänen tragen zur Antigen-Erkennungsfunktion bei, die Zentren aus C-Domänen zu den Effektorfunktionen.

Ketten<sup>[34-36]</sup> wie auch Affinitätsmarkierungs-Experimente<sup>[31]</sup> bestätigten unsere früher geäußerte Hypothese, daß die V-Regionen von sowohl schweren als auch leichten Ketten zu den antigen-bindenden Zentren beitragen. Weiterhin ergaben die Versuche von Haber<sup>[37]</sup> den ersten Hinweis darauf, daß Fab-Fragmente von spezifischen Antikörpern nach Reduktion ihrer Disulfidbrücken aufgefoldet und wieder zurückgefaltet werden können, wenn das Antigen abwesend ist, und dabei den größten Teil ihrer antigen-bindenden Aktivität wiedererlangen. Dies zeigte deutlich, daß die Information für die Bindungsstelle vollständig in der Aminosäure-Sequenz der Ketten enthalten ist. Daß sich die gesamte Information in den variablen Regionen befindet, wird eindeutig durch die kürzlich geglückte Isolierung von antigen-bindenden Fragmenten, die nur aus  $V_L$  und  $V_H$  bestehen, bewiesen<sup>[38]</sup>. Die Experimente zur Ketten-Rekombination legten eine Hypothese nahe, die einen Teil der Antikörper-Mannigfaltigkeit erklärt. Die zahlreichen Kombinationen unterschiedlicher schwerer und leichter Ketten, die in der Verschiedenheit der Lymphocyten zum Ausdruck kommen, erlauben die Bildung sehr vieler verschiedenartiger antigen-bindender Zentren aus relativ wenigen V-Regionen.

Eine der noch verbleibenden Aufgaben der molekularen Immunologie ist es, ein direktes Bild der antigen-bindenden Zentren durch Röntgen-Strukturanalyse der V-Domänen bei atomarer Auflösung zu bekommen. Obwohl man Kristalle eines geeigneten Moleküls oder Fragments, das Diffraktionsmuster mit einer höheren Auflösung als 3 Å ergibt, noch nicht erhalten hat, ist es wahrscheinlich, daß fortgesetzte Bemühungen sie schließlich erbringen werden. Die Details einer speziellen Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, die eine derartige Untersuchung aufdecken sollte, werden ein enormes Interesse finden. So sind z.B. gewisse Sequenzstellen der V-Regionen hypervariabel<sup>[39]</sup> und sehr gute Anwärter für eine direkte Beteiligung an der Bindungsstelle. Es wird auch besonders wichtig sein zu verstehen,

wie die grundlegende dreidimensionale Struktur mit so vielen Aminosäure-Substitutionen in Einklang zu bringen ist. Röntgen-kristallographische Untersuchungen könnten auch im Detail zeigen, wie die Disulfidbrücken in jeder der V-Domänen für die notwendige Stabilität der Bindungszentren sorgen<sup>[28, 33, 40]</sup>.

Die vorgeschlagenen Ähnlichkeiten in der Tertiärstruktur der C-Domänen sind nicht sichergestellt, ebensowenig sind die Funktionen der C-Domänen völlig bestimmt worden. Man vermutet, daß  $C_H2$  eine Rolle bei der Komplementbindung spielen könnte<sup>[41]</sup>. Ein guter Kandidat für die Bindungsstelle der Lymphocyten-Zellmembran ist  $C_H3$ , dessen Funktion mit dem Mechanismus der Lymphocytenauslösung, die sich an die Bindung des Antigens durch V-Domänen anschließt, zusammenhängen mag. Man hat schon gezeigt, daß sich die  $C_H3$ -Domäne an Makrophagen-Membranen bindet<sup>[42]</sup>, und es gibt jetzt auch schon Hinweise, daß Lymphocyten isolierte Domänen, die den  $C_H3$ -Domänen ähneln, als einzelne Moleküle synthetisieren können<sup>[43-45]</sup>.

Zwar sind noch viele Einzelheiten offen, doch wird die ungefähre Struktur, wie sie die Domänen-Hypothese vorschlägt, durch röntgen-kristallographische Untersuchungen von Fab-Fragmenten<sup>[46]</sup> und vollständigen Molekülen<sup>[47]</sup>, bei denen sich getrennte Domänen klar unterscheiden lassen, direkt gestützt. Eine indirekte Bestätigung der Hypothese bietet der experimentelle Befund<sup>[38, 48]</sup>, daß die Regionen zwischen den Domänen proteolytisch gespalten werden.

Es ist nicht völlig klar, warum die Domänenstruktur während der Evolution so genau bewahrt worden ist. Eine vernünftige Hypothese ist folgende: Obgleich es von der Funktion her notwendig ist, daß V- und C-Domänen im selben Molekül sich assoziieren, ist es aber auch unumgänglich, allosterische Wechselwirkungen zwischen den Domänen zu verhindern. Was auch immer die Vorteile dieser Anordnung bei der Selektion gewesen sein mögen, so ist es doch klar, daß die Evolution der Immunglobuline durch Genverdopplung die Möglichkeit eröffnete, die immunologische Funktion durch Addition oder Deletion von Domänen zu modulieren.

### Translocone: Vorschlag einer Einheit der Evolution und der genetischen Funktion

Die Evolution von Domänenstrukturen und Immunglobulinklassen durch Genverdopplung läßt mehrere Fragen über Zahl und Anordnung der Strukturgene, die für Immunglobuline codieren, aufkommen. Obwohl die Zeit mir nicht erlaubt, dieses komplizierte Thema in allen Einzelheiten zu erörtern, möchte ich doch darlegen, wie Arbeiten über die Struktur diese Fragen präzisiert haben.

Nach der Theorie der Klonselektion ist es erforderlich, daß in jedem Individuum eine große Zahl verschiedenartiger Antikörper mit der Fähigkeit, verschiedenartige Antigene zu binden, bereits von vornherein existieren. Eine der am meisten befriedigenden Schlußfolgerungen aus den Strukturanalysen ist die, daß die Verschiedenheit der V-Regionen der Antikörperketten ausreicht, um diesem Bedürf-

nis Rechnung zu tragen. Die Verschiedenheit entsteht auf drei Niveaus der strukturellen oder der genetischen Organisation, von denen man zwei einigermaßen versteht:

1. V-Regionen schwerer und leichter Ketten beteiligen sich an der antigen-bindenden Stelle; daher kann die Zahl der möglichen Antikörper so groß sein wie das Produkt aus der Anzahl verschiedenartiger  $V_L$ - und  $V_H$ -Regionen.

2. Die Aminosäuresequenz-Analysen der V-Regionen von leichten Ketten durch Hood<sup>[49]</sup> und Milstein<sup>[50]</sup> und später die von schweren Ketten aus Myelomproteinen<sup>[32, 33]</sup> zeigten, daß sich die V-Regionen in Untergruppen von Sequenzen einteilen lassen, für die von unterschiedlichen Genen oder Gengruppen codiert werden muß. Innerhalb einer Untergruppe werden die Aminosäuren einer bestimmten Position nach konservativem Typ substituiert, der sich mit dem Austausch einzelner Basen in den Codons der Strukturgene in Einklang bringen läßt. Variable Regionen von verschiedenen Untergruppen unterscheiden sich sehr viel mehr voneinander als variable Regionen innerhalb der gleichen Untergruppe.

Obwohl unterschiedliche V-Region-Untergruppen durch eine Anzahl nicht-alleler Gene spezifiziert werden<sup>[50]</sup>, läßt die Analyse der genetischen oder allotypen Marken vermuten, daß C-Regionen einer gegebenen Immunglobulinklasse von nicht mehr als einem oder zwei Genen spezifiziert werden. Diese allotypen Marken, die zuerst Grubb<sup>[51]</sup> sowie Oudin<sup>[52]</sup> beschrieben, geben zusätzlich zur Sequenzanalyse ein Mittel an die Hand, um die genetische Basis der Immunglobulinsynthese zu verstehen<sup>[4]</sup>. V-Regionen, die durch eine Anzahl verschiedener Gene bestimmt werden, können in Ketten vorkommen, die alle dieselbe C-Region besitzen können, die durch ein einzelnes Gen spezifiziert wird. Offensichtlich wird also jede Immunglobulinkette durch zwei Gene, ein V- und ein C-Gen, spezifiziert<sup>[4, 49, 50]</sup>.

Die Arbeiten in einer Reihe von Laboratorien (zusammengefaßt in<sup>[4]</sup>) haben gezeigt, daß die genetischen Marken auf den beiden Typen von leichten Ketten weder mit denen auf den schweren Ketten verbunden sind noch miteinander. Diese Befunde und die Schlußfolgerung, daß es getrennte V- und C-Gene gibt, führten Gally und mich zu der Vermutung<sup>[4]</sup>, daß Immunglobuline durch drei unverbundene Gencluster spezifiziert werden (Abb. 7). Diese Cluster haben wir Translocone genannt<sup>[4]</sup>, um die Tatsache zu betonen, daß irgendein Mechanismus vorgesehen sein muß, der die genetische Information von den V-Region-Loci mit der von den C-Region-Loci kombiniert, um vollständige V—C-Strukturgene zu bilden. Nach dieser Hypothese ist das Translocon die grundlegende Einheit der Immunglobulin-Evolution; die unterschiedlichen Gruppen von Immunglobulinketten haben sich durch Verdopplung und chromosomale Umlagerungen eines Vorläufer-Genclusters entwickelt. Wahrscheinlich haben Genverdopplungen während der Evolution auch zum Auftreten von V-Region-Untergruppen innerhalb jedes Translocons geführt.

Das Schlüsselproblem bei der Entstehung der Mannigfaltigkeit von Immunglobulinen hat sich durch die Arbeiten über Ketten und Untergruppen zum Problem des Ursprungs der Sequenzvariation innerhalb jeder V-Region-Untergruppe gewandelt. Es ist immer noch unbekannt, ob es ein Keimbahn-Gen für jede V-Region innerhalb

einer Untergruppe gibt, oder ob jede Untergruppe nur einige Gene (s. Abb. 7) enthält und die Variation innerhalb der Untergruppe durch somatische genetische Umlagerungen von Transloconen innerhalb der Vorläufer der antikörper-bildenden Zelle erfolgt. Gegenwärtig können wir daher nur schließen, daß lediglich die Basis, aber nicht der Ursprung der Mannigfaltigkeit durch die Arbeit über

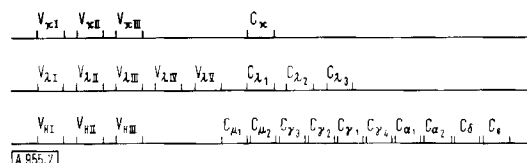


Abb. 7. Schematische Darstellung der vorgeschlagenen Anordnung von Antikörpergenen in Säugetier-Keimzellen in drei unverbundenen Clustern, genannt Translocone. Die  $\kappa$ - und  $\lambda$ -Ketten werden jeweils durch verschiedene Translocone spezifiziert, die schweren Ketten durch ein drittes Translocon. Die genaue Zahl und Anordnung der V- und C-Gene innerhalb eines Translocons ist unbekannt. Jede Untergruppe einer variablen Region (bezeichnet mit einer tiefgestellten Zahl, die der Gruppe und Untergruppe der Kette entspricht) muß von wenigstens einem getrennten Keimbahn-V-Gen codiert werden. Die Zahl der V-Gene innerhalb jeder Untergruppe ist jedoch unbekannt, ebenso wie der Ursprung der Mannigfaltigkeit der V-Regionen innerhalb der Untergruppe. Man benötigt einen besonderen Vorgang, um die Information von einem bestimmten V-Gen mit der von einem gegebenen C-Gen zu verbinden. Die Eigenschaften der Klassen und Unterklassen (s. Tabelle 1) werden auf die konstanten Regionen durch C-Gene übertragen.

die Struktur hinreichend erklärt wird. Obwohl Strukturanalysen von verschiedenen Immunglobulinklassen weiterhin wichtig sein werden, ist es doch unwahrscheinlich, daß sich aus solchen Befunden der Ursprung der Antikörper-Mannigfaltigkeit erklären läßt. Was man wahrscheinlich brauchen wird, sind phantasievolle Versuche über DNA, RNA und die damit assoziierten Enzyme, die man aus Lymphoidzellen im geeigneten Entwicklungsstand gewinnen muß.

In diesem kurzen und notwendigerweise unvollständigen Bericht habe ich zu zeigen versucht, wie Arbeiten über die Struktur von Immunglobulinen eine molekulare Basis für eine Reihe von zentralen Gesichtspunkten für die Theorie der Klonselektion ergeben haben. Die Arbeiten über humorale Antikörper sind jedoch nur ein Anfang, denn zwei wichtige Probleme der molekularen und der Zellimmunologie müssen noch geklärt werden. Das erste Problem, der Ursprung der Mannigfaltigkeit innerhalb der Untergruppen, wird unzweifelhaft in den nächsten Jahren große Aufmerksamkeit auf sich ziehen. Das zweite Problem betrifft die Auslösung der Klonexpansion von Lymphocyten nach der Kombination ihrer Rezeptor-Antikörper mit Antigenen und die quantitative Beschreibung der Populationsdynamik der darauf ansprechenden Zellen. Eine befriedigende Lösung dieses Problems muß auch das Phänomen der spezifischen Immuntoleranz erklären, wie es in der richtungsweisenden Arbeit von Medawar und seinen Kollegen<sup>[53]</sup> beschrieben ist.

Für den Rest dieses Vortrags möchte ich mich auf einige neuere Versuche konzentrieren, die meine Kollegen und ich ausgeführt haben, um zu sehen, ob diese Probleme mit molekularen Verfahren erfolgreich untersucht werden können.



## Lymphocytenstimulation durch Lektine

Die Mechanismen der zellulären Vorgänge, die der Immunantwort und der Immuntoleranz zugrundeliegen, bleiben weiterhin ein bedeutender Anreiz für die theoretische und die praktische Immunologie<sup>[53, 60]</sup>. Wie induziert ein gegebenes Antigen die Proliferation der Klone oder die Immuntoleranz in gewissen Unterpopulationen von Zellen?

Zellen, die gegen ein gegebenes Antigen reaktiv sind, machen nur einen sehr kleinen Bruchteil der Lymphocytenpopulation aus und sind daher nicht leicht direkt zu untersuchen. Zur Umgehung dieser Schwierigkeit hat man zwei Methoden benutzt: die Anwendung von Molekülen, die, unabhängig von ihrer antigen-bindenden Spezifität, Lymphocyten stimulieren können, und die Fraktionierung von spezifische Antigene bindenden Lymphocyten zur Untersuchung der Stimulation durch Antigene bekannter Struktur. Obwohl das Problem der Lymphocytenstimulation noch weit von seiner Lösung entfernt ist, sind diese beiden Methoden wertvoll, besonders, wenn man sie kombiniert.

Antigene sind nicht die einzigen Mittel, mit denen sich Lymphocyten stimulieren lassen. Man hat gefunden, daß gewisse Pflanzenproteine, die man Lektine nennt, sich an Glykoprotein-Rezeptoren auf der Lymphocytenoberfläche binden können und Blastentransformation, Mitose und Immunglobulinproduktion induzieren können (Zusammenfassung in<sup>[54]</sup>). Die Lektine haben unterschiedliche Spezifitäten für Zelloberflächen-Glykoproteine und unterschiedliche Molekülstrukturen, obwohl ihre mitogenen Eigenschaften recht ähnlich sein können. Außerdem üben sie eine Vielzahl von Wirkungen auf Zellstoffwechsel und Transport aus. Diese Effekte sind von der antigen-bindenden Spezifität der Zelle unabhängig und können daher vor einer spezifischen Zellfraktionierung untersucht werden.

Die Tatsache, daß Antigene und Lektine von verschiedener Spezifität und Struktur Lymphocyten stimulieren können, läßt vermuten, daß die Induktion der Mitose eine Eigenschaft von membranassoziierten Strukturen ist, die auf eine Vielzahl von Rezeptoren ansprechen können. Die

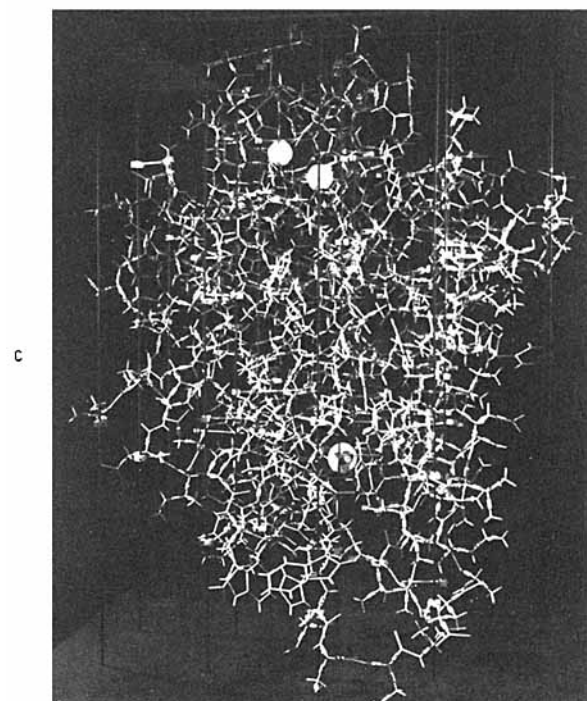
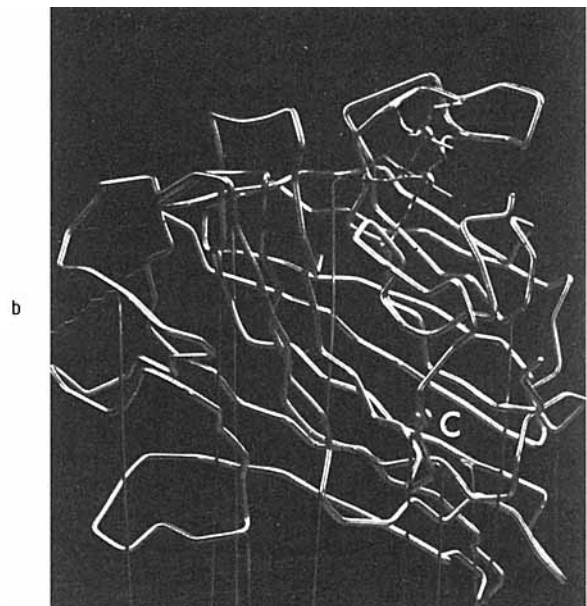
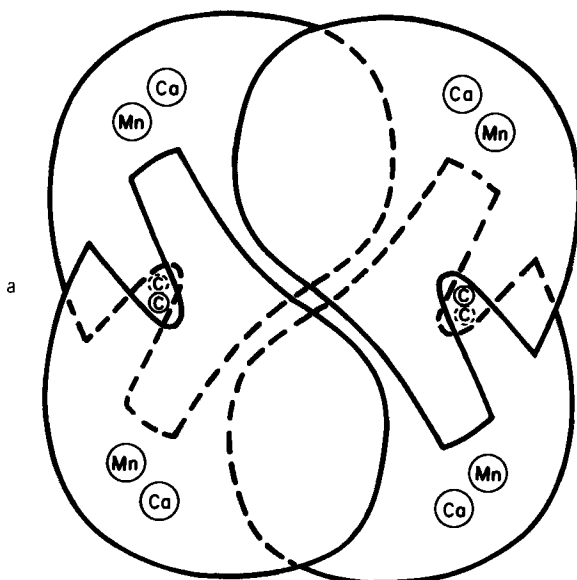


Abb. 8. Dreidimensionale Struktur von Concanavalin A (Con A), einem Lektin, das für Lymphocyten mitogen ist. a) Schematische Darstellung der tetrameren Struktur von Con A, entlang der z-Achse gesehen. Die vorgeschlagenen Bindungsstellen für Übergangsmetalle, Ca<sup>2+</sup> und Saccharide sind mit Mn, Ca bzw. C bezeichnet. Die oben befindlichen Monomeren (durchgezogene Linien) stehen miteinander durch eine zweizählige Symmetrieachse in Relation, ebenso die unteren. Die beiden Dimeren sind durch eine D<sub>2</sub>-Symmetrieachse miteinander gepaart und bilden so das Tetramer. b) Drahtmodell des Polypeptidgerüsts des Con-A-Monomeren. Das Modell ist ungefähr so orientiert, daß es dem Monomeren oben rechts in a) entspricht. Die beiden Kugeln im oberen Teil geben die Ca- und Mn-Ionen wieder, die Kugel im Zentrum die Position eines Jodatoms im Zucker-Derivat  $\beta$ -Jodphenylglucosid, das an das aktive Zentrum gebunden ist. Vier solcher Monomeren sind miteinander zum Tetramer verbunden, das in a) gezeigt wird. c) Kendrew-Modell des Con-A-Monomeren, so gedreht, daß man die tiefe Tasche, die von der Kohlenhydrat-Bindungsstelle gebildet wird, sieht. Die weiße Kugel im unteren Teil des Bildes gibt die Stellung des Jodatoms von  $\beta$ -Jodphenylglucosid wieder. Die beiden weißen Kugeln im oberen Teil stellen die Metall-Ionen dar.

Auslösung scheint von der Spezifität dieser Rezeptoren für ihre verschiedenartigen Liganden unabhängig zu sein. Um die Mitogenese zu verstehen, müssen daher zwei Probleme gelöst werden. Das erste ist, in molekularem Detail zu bestimmen, wie das Lektin sich an die Zelloberfläche bindet, und diese Bindung dann mit der des Antigens zu vergleichen. Das zweite ist zu bestimmen, wie die Bindung die Stoffwechseländerungen induziert, die für die Initiation der Zellteilung nötig sind. Wahrscheinlich befindet sich unter diesen Änderungen als übereinstimmender letzter Schritt bei der Stimulation der Zelle durch ein spezielles Lektin oder Antigen die Produktion oder die Freisetzung einer Botensubstanz (messenger).

Ein wichtiges Erfordernis zur Lösung dieser Probleme ist es, die vollständige Struktur einiger mitogener Lektine zu kennen. Diese Kenntnis der Struktur ist besonders nützlich, wenn man zu verstehen versucht, wie die molekulare Transformation auf der Lymphocytenoberfläche, die für die Stimulation benötigt wird, vor sich geht. Bei Kenntnis der dreidimensionalen Struktur eines Lektins könnte man Aminosäure-Seitenketten an der Oberfläche des Moleküls durch Gruppenreagentien modifizieren, die man auch verwenden könnte, um die Wertigkeit des Moleküls zu verändern. Die Aktivität dieser modifizierten Lektin-Derivate ließe sich dann durch Bestimmung ihrer Wirkung auf Zelloberfläche und Zellfunktion beobachten.

Meine Kollegen und ich<sup>[55]</sup> haben kürzlich sowohl Aminosäure-Sequenz als auch dreidimensionale Struktur eines Lektins, nämlich des Concanavalins A (Con A) bestimmt (Abb. 8). Dieses Lektin weist eine Spezifität für Glucopyranoside, Mannopyranoside und Fructofuranoside auf und bindet sich an Glykoproteine und vielleicht auch an Glykolipide an einer Vielzahl von Zelloberflächen. Der Zweck unserer Untersuchungen war es, die exakte Größe und Gestalt des Moleküls, seine Wertigkeit und die Struktur und Verteilung seiner Bindungsstellen kennenzulernen.

Mit Hilfe dieser Kenntnis haben wir versucht, die Struktur zu modifizieren und die Wirkung dieser Modifikationen auf mehrere biologische Aktivitäten des Lymphocyten zu bestimmen. Bis jetzt gibt es einige Befunde, die annehmen lassen, daß solche Strukturänderungen ganz bestimmte Wirkungen nach sich ziehen. Con A in freier Lösung stimuliert aus Thymuszellen stammende Lymphocyten (T-Zellen), aber keine aus dem Knochenmark stammenden Lymphocyten (B-Zellen) und führt zu einer erhöhten Aufnahme von Thymidin und zur Blastentransformation. Der Verlauf der Stimulation von T-Zellen durch natives Con A zeigt einen ansteigenden Ast, der der Stimulation entspricht, und einen fallenden Ast, der wahrscheinlich auf das Absterben der Zellen zurückgeht (Abb. 9). Die Tatsache, daß der mitogene Effekt und der Tötungseffekt dosisabhängig sind, läßt an eine Analogie zur Stimulation und zur Toleranzinduktion durch Antigene denken. Wenn Con A succinyliert wird, dissoziiert es von der tetrameren in eine dimeren Form, ohne seine kohlenhydrat-bindende Spezifität zu verändern. Obwohl succinyliertes Con A genauso mitogen wie natives ist, erhält man den abfallenden Ast der Kurve erst bei sehr viel höheren Dosen.

Die Succinylierung von Con A verändert auch eine andere Eigenschaft des Lektins. Es ist gezeigt worden, daß bei gewissen Konzentrationen die Bindung von Con A an

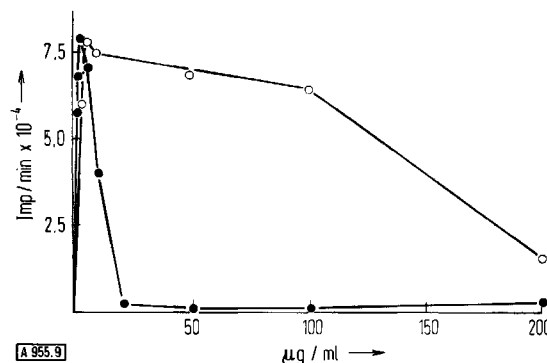


Abb. 9. Stimulation der Aufnahme von radioaktivem Thymidin durch Mäusemilz-Zellen nach Zugabe von Con A (—●—) und succinyliertem Con A (---○---) in steigenden Dosen [µg/ml]. Imp/min = Impulse pro Minute.

die Zelloberfläche die Bewegung der Immunglobulin-Rezeptoren einschränkt<sup>[56, 57]</sup>. Dies läßt annehmen, daß das Lektin auf irgendeine Weise die Fluidität der Zellmembran verändert, wodurch die relative Beweglichkeit dieser Rezeptoren herabgesetzt wird. Im Gegensatz dazu hat succinyliertes Con A keine solche Wirkung, obwohl es sich im selben Ausmaß wie das native Molekül an Lymphocyten bindet. Sowohl die Aufhebung des Tötungseffekts bei der Bestimmung der Mitogenität als auch das Ausbleiben einer Beweglichkeitsänderung der Immunglobulinrezeptoren in B-Zellen nach Succinylierung von Con A kann auf einer Änderung der Wertigkeit oder der Oberflächenladung des Moleküls beruhen. Die Prüfung anderer Derivate und die Lokalisation der substituierten Seitenketten in der dreidimensionalen Struktur werden entscheiden helfen, welcher der wichtigere Faktor ist. Neuere Versuche lassen annehmen, daß es wahrscheinlich die Wertigkeit ist, denn die Zugabe von zweiwertigen Antikörpern gegen Con A zu Zellen, die succinyliertes Con A gebunden hatten, setzte wiederum die Beweglichkeit der Immunglobulin-Rezeptoren herab.

Man kann Con A auch durch Quervernetzung mehrerer Moleküle modifizieren. Ein sehr deutlicher Effekt läßt sich erkennen, wenn die Oberflächendichte der Con-A-Moleküle, die dem Lymphocyten dargeboten werden, durch Quervernetzung an festen Oberflächen erhöht worden ist<sup>[58]</sup>. Con A in freier Lösung stimuliert Mäuse-T-Zellen zu gesteigerter Inkorporation von radioaktivem Thymidin, hat aber keine Wirkung auf B-Zellen. Wenn es dagegen an einer festen Oberfläche quervernetzt worden ist, stimuliert es vor allem Mäuse-B-Zellen, obwohl T- und B-Zellen ungefähr gleich viele Con-A-Rezeptoren aufweisen<sup>[58]</sup>. Ähnliche Ergebnisse hat man mit anderen Lektinen erhalten<sup>[59]</sup>. Eine vernünftige Erklärung dieser Phänomene (obwohl nicht die einzige) ist die, daß das Lektin eher an der Zelloberfläche als innerhalb der Zelle wirkt, daß die Oberflächendichte des Mitogens eine wichtige Variable für das Überschreiten der Schwelle der Lymphocytenstimulation ist, und daß die Schwelle in beiden Arten von Lymphocyten voneinander abweicht.

Die Änderung von Struktur und Funktion verschiedener Lektine scheint ein vielversprechendes Mittel zu sein, um den Mechanismus der Lymphocytenstimulation zu analysieren. Gut durchdacht ist die Hypothese, daß die Quervernetzung der richtigen Untereinheiten der Glykoprotein-Re-

zeptoren durch Lektine eine äquivalente Induktion der Zelltransformation bewirkt wie die Quervernetzung der Immunglobulin-Rezeptoren in der Lymphocytenmembran durch mehrwertige Antigene. Es könnte sich herausstellen, daß die zentrale Effektorfunktion der Rezeptor-Antikörper, die die Klonproliferation auslösen, mit der Art der Verankerung der Antikörpermoleküle in der Zellmembran spezifisch zusammenhängt. Die Art der Anheftung von Antikörper- und Lektin-Rezeptoren an die membranassoziierten Strukturen und ihre Störung durch Quervernetzung an der Zelloberfläche könnte ähnliche Wirkungen hervorrufen, obwohl ihre Spezifitäten und ihre Molekülstrukturen voneinander abweichen.

## Antikörper auf der Oberfläche von antigen-bindenden Zellen

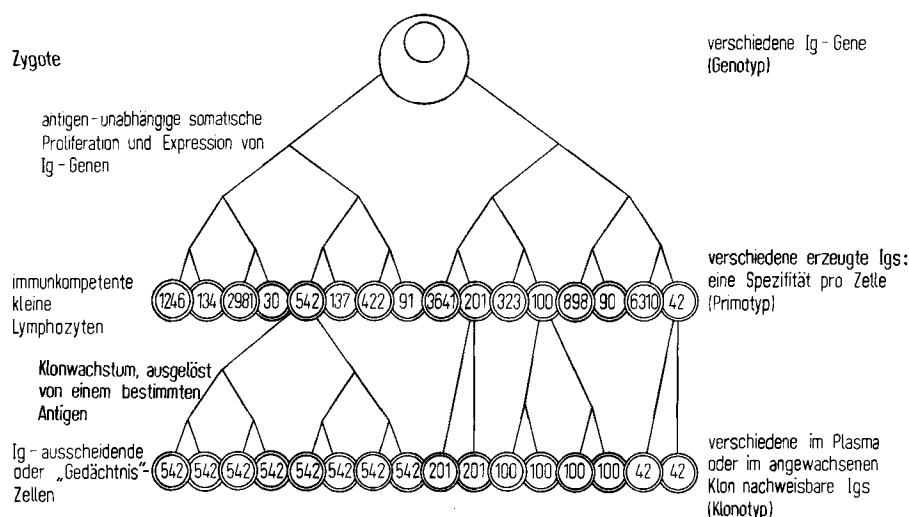
Der direkteste Angriff auf das Problem der Lymphocytenstimulation ist der, die Wirkungen von Antigen mit bekannter Geometrie auf spezifisch gereinigte Populationen von Lymphocyten zu erforschen. Daher und auch aus anderen Gründen ist es nötig, Methoden zur spezifischen Fraktionierung von antigen-bindenden Zellen zu entwickeln.

Wenn man diese Aufgabe ausführen will, ist es wichtig – sowohl theoretisch als auch vom Experimentellen her – zwischen antigen-bindenden und antigen-reaktiven Zellen zu unterscheiden. Bei der Klonselektion wird der phänotypische Ausdruck der Immunglobulin-Gene im Tier durch somatische Teilung von Zellen, die von vornherein immunkompetent sind, vermittelt (Abb. 10). Die bahnbre-

auf eine enorme Zahl von Antigenen anzusprechen, denen es normalerweise niemals ausgesetzt wird; es muß demnach die genetische Information zur Synthese einer viel größeren Zahl von verschiedenen Immunglobulinmolekülen auf Zellen enthalten, als wirklich in nachweisbaren Mengen im Blutkreislauf auftreten. Mit anderen Worten, die Immunglobulinmoleküle, deren Eigenschaften wir prüfen können, dürften nur einen geringen Bruchteil derjenigen ausmachen, für die genetische Information vorliegt.

Man kann zwei Ausdrucks-niveaus bei der Synthese der Immunglobuline unterscheiden, die ich der Einfachheit halber den *Primotyp* und den *Klonotyp* genannt habe<sup>[4]</sup>. Der Primotyp besteht aus der Summe der strukturell verschiedenen Immunglobulinmoleküle oder Rezeptor-Antikörper, die ein Organismus während seiner Lebensdauer herstellt. Die Zahl von verschiedenartigen Molekülen im Primotyp ist wahrscheinlich um Größenordnungen größer als die Zahl der verschiedenartigen wirksamen Antigen-determinanten, denen das Tier jemals ausgesetzt wird (Abb. 10). Der Klonotyp besteht aus jenen Immunglobulinmolekülen, die als Ergebnis der antigenen Stimulation und der Klonexpansion synthetisiert werden. Diese Moleküle können aufgrund ihrer antigen-bindenden Spezifität, ihrer Klasse, ihrer antigenen Determinanten, ihrer Primärstruktur, ihres Allotyps oder einer Vielzahl von anderen experimentell erfaßbaren molekularen Eigenschaften nachgewiesen und klassifiziert werden. Als Klasse ist der Klonotyp kleiner als der Primotyp und völlig in ihm enthalten (Abb. 10).

Während das Konzept von der Existenz des Klonotyps aus der Analyse der humoralen Antikörper stammt, wissen wir sehr wenig über den Primotyp. Es ist daher wichtig,



[A 955.10]

Abb. 10. Modell der somatischen Differenzierung der antikörper-produzierenden Zellen entsprechend der Klonselektions-Theorie. Die Zahl der Immunglobulin-Gene kann während des somatischen Wachstums zunehmen, so daß im immunologisch reifen Tier verschiedenartige Lymphoidzellen gebildet werden, von denen jede für die Synthese eines strukturell anderen Rezeptor-Antikörpers kompetent ist (durch die Zahlen wiedergegeben). Ein kleiner Bruchteil dieser Zellen proliferiert bei antigenen Stimulation und bildet verschiedene Zellklone, wobei jeder Klon einen anderen Antikörper produziert. Das abgebildete Modell gibt aus Knochenmark stammende Zellen (B-Zellen) wieder, gilt aber mit geringen Modifikationen auch für Thymuszellen (T-Zellen).

chenden Arbeiten von Nossal und Mäkelä und später von Ada und Nossal (s.<sup>[60]</sup>) zeigten klar, daß jede Zelle Antikörper von einer einzigen Spezifität produziert, und daß es verschiedene Populationen von spezifischen antigen-bindenden Zellen gibt. Ein Tier ist in der Lage, spezifisch

den Versuch zu unternehmen, die Zellen des Immunsystems entsprechend der Spezifität ihrer antigen-bindenden Rezeptoren zu fraktionieren<sup>[61]</sup>. Wir haben versucht, dieses Problem der spezifischen Fraktionierung von Lymphocyten anzugehen, indem wir Nylonfasern benutzten, an die Anti-

gene kovalent gekoppelt waren<sup>[62, 63]</sup>. Die derivatisierten Fasern werden in einem Gewebekulturgefäß straff gespannt, so daß die in Suspension befindlichen Zellen so geschüttelt werden können, daß sie mit den Fasern kollidieren. Einige der Zellen, die mit den Fasern kollidieren, werden mit Hilfe ihrer Oberflächenrezeptoren spezifisch an die kovalent gekoppelten Antigene gebunden. Gebundene Zellen können in situ mikroskopisch gezählt werden, indem man auf die Kante der Faser fokussiert (Abb 11). Nach dem Wegwaschen von ungebundenen Zellen können die spezifisch gebundenen Zellen entfernt werden, indem man die Fasern abnimmt und die Zellen quantitativ von ihren Bindungsstellen abstreift. Die so entfernten Zellen behalten ihre Lebensfähigkeit, vorausgesetzt, daß das Gewebekulturbedium Serum enthält.

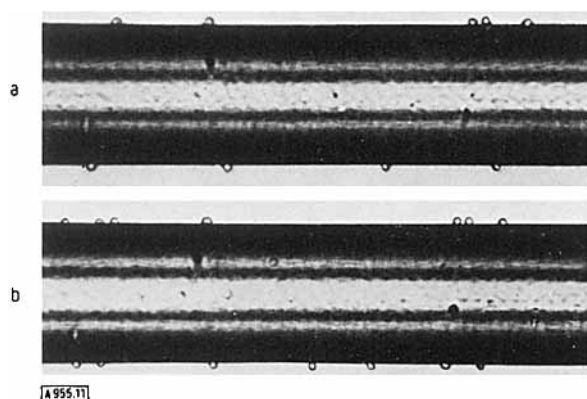


Abb. 11. Lymphoidzellen aus Mäusemilz, die durch ihre antigen-spezifischen Rezeptoren an eine Nylonfaser gebunden sind, an die Dinitrophenyl-(DNP)-Rinderserumalbumin gekoppelt worden war. Die Behandlung der gebundenen Zellen (a) mit Antiserum gegen das T-Zellen-Oberflächenantigen  $\Theta$  und mit Serumkomplement zerstört die T-Zellen und hinterläßt (b) B-Zellen, die immer noch lebensfähig sind und angeheftet bleiben (s. Tabelle 2).

Tabelle 2. Charakterisierung von Mäuse-Lymphoidzellen, die entsprechend ihrer antigen-bindenden Spezifitäten fraktioniert worden sind. Nylonfasern wurden mit Konjugaten aus Haptenen und Rinderserumalbumin derivatisiert, Mäuse wurden mit jedem dieser vorgesehenen Haptene, die vorher an Hämocyanin gekuppelt waren, immunisiert. Die Inhibition der Bindung wurde durch Zugabe von Hapten-Protein-Konjugaten (250  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Kaninchen-Antimäuse-Immunglobulin (anti-Ig) (250  $\mu\text{g/ml}$ ) zur Zellsuspension erreicht. Als Zellen mit hoher Bindungsavidität werden diejenigen bezeichnet, die durch DNP-Rinderserumalbumin-Konzentrationen von weniger als 4  $\mu\text{g/ml}$  in den Zellsuspensionen vor der Bindung bewahrt bleiben. Die Zellen, die sich erst bei höheren Konzentrationen inhibieren lassen, werden als Zellen niedriger Avidität bezeichnet. Praktisch vollständige Inhibition erfolgt bei Konzentrationen homologer Haptene von mehr als 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Antigen auf der Faser	DNP	DNP	Tosyl	Tosyl
Immunisierung	keine	DNP	keine	Tosyl
Zahl der an die Faser gebundenen Zellen (pro cm)	1200	4000	800	2000
% Inhibition der Bindung durch				
DNP	90	95	5	10
Tosyl	1	2	75	87
Anti-Ig	85	93	73	90
Zellen hoher Avidität (pro cm)	< 100	2800	—	—
Zellen niedriger Avidität (pro cm)	1200	1200	—	—
% T-Zellen	41	39	43	—
% B-Zellen	59	56	54	—

Derivatisierte Nylonfasern haben die Fähigkeit, sowohl vom Thymus stammende Lymphocyten (T-Zellen) als auch aus Knochenmark stammende Zellen (B-Zellen)<sup>[64]</sup> entsprechend der Spezifität ihrer Rezeptoren für ein gegebenes Antigen zu binden<sup>[65]</sup> (Abb. 11, Tabelle 2). Nach ihrer spezifischen Isolierung sind ungefähr 60% der Milz-Zellen B-

Zellen, der Rest T-Zellen. Durch Verwendung der entsprechenden Antiseren gegen die Zelloberflächenrezeptoren (Tabelle 2) können die Zellen jedes Typs auf der Faser gezählt werden; die meisten Zellen vom einen oder anderen Typ können durch anschließende Zugabe von Serum-Komplement zerstört werden. Auf diese Weise kann man Populationen entweder von T- oder B-Zellen erhalten, die in ihrer Kapazität, ein gegebenes Antigen zu binden, hoch angereichert sind (Abb. 11).

Zellen von jeder der beiden Arten können entsprechend der relativen Affinität ihrer Rezeptoren weiter fraktioniert werden. Man kann dies durch vorherige Zugabe einer vorgewählten Konzentration des freien Antigens erreichen, die dazu dient, die spezifische Anheftung von Unterpopulationen von Zellen an die antigen-derivatisierten Fasern zu verhindern, indem sie sich an ihre Rezeptoren binden. Wie sich aus dieser Technik ergibt, machen Zellen, die sich spezifisch an ein besonderes Antigen binden können, bis zu 1% einer Mäusemilz-Zellpopulation aus. Jedoch nur sehr wenige von diesen ursprünglich antigen-bindenden Zellen scheinen nach der Immunisierung zahlenmäßig zuzunehmen; die Zellen, die ansprechen, sind diejenigen, die Rezeptoren von höheren relativen Affinitäten besitzen<sup>[62]</sup>.

Ob diese Populationen dem Primotyp oder dem Klonotyp entsprechen, bleibt noch zu bestimmen. Es ist jedoch signifikant, daß plaque-bildende Zellen<sup>[66]</sup> sich nicht an die Fasern binden, und es ist daher möglich, antigen-bindende Zellen von Zellen, die schon aktiv Antikörper ausscheiden, zu trennen. Neuere Versuche zeigen, daß die antigen-bindenden Zellen, die nach dieser Methode isoliert worden sind, auf bestrahlte Tiere übertragen werden können und ein Ansprechen auf das Antigen, mit dessen Hilfe sie isoliert worden waren, wiederherstellen. Dies läßt vermuten, daß die antigen-spezifischen Populationen von Zellen, die man

von den Fasern entfernt hat, Vorläufer der plaque-bildenden Zellen enthalten.

Wir sind durch diese Befunde recht ermutigt worden, denn die Methoden zur Zellfraktionierung scheinen nicht nur bei der Bestimmung der Spezifität und des Bereichs der B- und T-Zell-Rezeptoren für Antigene, sondern auch bei

der Analyse der Populationsdynamik von T- und B-Zellen sowohl in erwachsenen als auch in sich entwickelnden Tieren vielversprechend zu sein. Da nunmehr fraktionierte Populationen von Lymphocyten, die spezifisch für ein bestimmtes Antigen sind, zur Verfügung stehen, sollte es möglich sein, den Zusammenhang zwischen lektin-induzierten und antigen-induzierten Änderungen durch Vergleich der Antworten derselben Zelle auf beide Agentien zu bestimmen.

Obwohl noch viele Experimente auf diesem Gebiet der molekularen Immunologie der Zelloberfläche auszuführen bleiben, sollten sich die Probleme der Immuninduktion und der Immuntoleranz zweifellos durch weitere Analyse des mitogenen Mechanismus aufklären lassen. Die Ergebnisse, die man unter Verwendung von Lymphocyten erhält, könnten jedoch auch allgemeinere Bedeutung haben und von Wichtigkeit für die Natur der Zellteilung in normalen und in Tumorzellen sowie für die Wachstumskontrolle und die Zell-Zell-Wechselwirkungen in der Entwicklungsbiologie sein. Man darf erwarten daß die Immunologie eine doppelte Rolle in diesen Untersuchungsgebieten spielen wird, denn sie wird sowohl Methoden als auch Modellsysteme von zentraler Bedeutung bereitstellen.

## Schluß

Die Immunologie war und ist eine merkwürdig reflexive Wissenschaft, die ihre eigenen Methoden zum Verständnis schafft, wie Antikörper zu Antikörpermolekülen selbst. Obwohl sich dieses Gedankengebäude als sehr tragfähig erwiesen hat, wird für ein fundamentales Verständnis der immunologischen Probleme die chemische Analyse benötigt. Die Bestimmung der Molekülstruktur von Antikörpern ist ein überzeugendes Beispiel, und ihr so gut wie vollzogener Abschluß hat die Immunologie in einer sehr befriedigenden Weise mit der Molekularbiologie verbunden:

1. Die Heterogenität von Antikörpern und die Komplexität der Immunglobulinklassen wurde in Übereinstimmung mit der Selektionstheorie der Immunität erklärt.
2. Die strukturelle Basis für die Differenzierung der biologischen Aktivität der Antikörper in antigen-bindende Funktion und Effektorfunktion wurde klargestellt.
3. Die genaue Analyse der Primärstruktur von Antikörpern hat eine Grundlage für das Studium der molekularen Genetik der Immunantwort, besonders des Ursprungs der Mannigfaltigkeit und des Kompetentwerdens jeder Zelle zur Synthese von einer Art von Antikörpern geschaffen.
4. Es wurde ein allgemeiner Rahmen für das Studium von Antikörpern der Zelloberfläche geliefert, der mehrere molekulare Angriffspunkte für die Analyse der Stimulation und der Auslösung von Zellen ermöglichte.
5. Schließlich ist es vielleicht nicht zu weit hergeholt zu vermuten, daß die Übertragung von Ideen und Methoden der molekularen Immunologie auf Gebiete wie Entwicklungsbiologie erleichtert worden ist. In diesem Sinne bietet die Immunologie wesentliche Methoden und Modelle mit besonderen Vorteilen: dissoziierbare Zellen mit einzigartigen Genprodukten von bekannter Struktur; die Kapazität, spezifische Klon-Zelllinien für in-vitro-Analysen zu induzie-

ren; die Methoden, Zellen entsprechend ihrer Differenzierung und Bindungsspezifität zu fraktionieren, wobei quantitative Untersuchungen ihrer Selektion, ihrer Wechselwirkung und ihrer Populationsdynamik möglich werden.

Unabhängig davon, ob sich die Immunantwort als einzigartig nützlich Modell erweist, können wir erwarten, daß die Fortsetzung der Arbeit durch Molekular- und Zellimmunologen die Hauptprobleme des Ursprungs der Mannigfaltigkeit und der Induktion von Antikörpersynthese und -toleranz lösen wird. Im Hinblick auf die enge Verflechtung dieser Probleme mit denen der Genexpression und der Zellregulation sollte ihre Lösung wertvolle Einsichten in andere Gebiete der Eukaryonten-Biologie geben und wiederum die Immunologie sowohl als Disziplin als auch als immer wichtiger werdenden Zweig der Medizin umgestalten.

## Dank

Die Wissenschaft ist von ihrem Wesen her ein Gemeinschaftsunternehmen. Ich bin mir zutiefst der wichtigen Beiträge zu dieser Arbeit bewußt, die von vielen meiner Kollegen und Freunde während der letzten fünfzehn Jahre geleistet worden sind. Diese Gelegenheit ruft das tägliche Leben, das wir mit Wärme und Herzlichkeit geteilt haben, in die Erinnerung zurück, ebenso den persönlichen Dank, den ich ihnen schulde. Ich bin mir gleichermaßen der Tatsache bewußt, daß die Kenntnis der Antikörperstruktur in vielen Laboratorien und von vielen Forschern in der ganzen Welt entwickelt worden ist. Nicht alle diese Arbeiten wurden angeführt, denn die Erwähnung einzelner an dieser Stelle birgt das Risiko, andere unbeabsichtigt wegzulassen; ich möchte auf die Zusammenfassungen, die in der Bibliographie zitiert werden, hinweisen.

Außer durch die finanzielle Grundlage seitens der Rockefeller University wurde meiner Kollegen und meine Arbeit durch Stipendien der National Institutes of Health und der National Science Foundation unterstützt.

Eingegangen am 16. Februar 1973  
Übersetzt von Dr. Harold Rüdiger, Köln [A 955]

- [1] Antibodies. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32 (1967).
- [2] J. Killander: Nobel Symposium, 3, Gamma Globulins, Structure and Control of Biosynthesis. Almqvist & Wiksell, Stockholm 1967.
- [3] G. M. Edelman u. W. E. Gall, Annu. Rev. Biochem. 38, 415 (1969).
- [4] J. A. Gally u. G. M. Edelman, Annu. Rev. Genet. 6, 1 (1972).
- [5] N. K. Jerne, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 41, 849 (1955).
- [6] F. M. Burnet: The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity. Vanderbilt University Press, Nashville, Tenn. 1959.
- [7] K. Landsteiner: The Specificity of Serological Reactions. Harvard University Press, Cambridge, Mass. 1945, 2. Aufl.
- [8] J. R. Marrack: The Chemistry of Antigens and Antibodies. Medical Research Council Special Report Series, Nr. 230. His Majesty's Stationery Office, London 1938, 2. Aufl.
- [9] K. O. Pedersen: Ultracentrifugal Studies on Serum and Serum Fractions. Almqvist & Wiksell, Stockholm 1945.
- [10] A. Tiselius, Biochem. J. 31, 313, 1464 (1937).
- [11] F. Karush, Advan. Immunol. 2, 1 (1962).
- [12] M. L. Petermann, J. Biol. Chem. 144, 607 (1942).
- [13] R. R. Porter, Biochem. J. 73, 119 (1959).
- [14] A. Nisonoff, F. C. Wissler, L. N. Lipman u. D. L. Woernley, Arch. Biochem. Biophys. 89, 230 (1960).

- [15] G. M. Edelman, *J. Amer. Chem. Soc.* **81**, 3155 (1959).
- [16] G. M. Edelman u. M. D. Poulik, *J. Exp. Med.* **113**, 861 (1961).
- [17] G. M. Edelman u. J. A. Gally, *J. Exp. Med.* **116**, 207 (1962).
- [18] J. Schwartz u. G. M. Edelman, *J. Exp. Med.* **118**, 41 (1963).
- [19] I. Berggård u. G. M. Edelman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **49**, 330 (1963).
- [20] G. M. Edelman, B. Benacerraf, Z. Ovary u. M. D. Poulik, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **47**, 1751 (1961).
- [21] M. E. Koshland u. F. M. Engelberger, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **50**, 61 (1963).
- [22] N. Hilschmann u. L. C. Craig, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **53**, 1403 (1965).
- [23] K. Titani, E. Whitley, Jr., L. Avogadro u. F. W. Putnam, *Science* **149**, 1090 (1965).
- [24] *Bull. WHO* **30**, 447 (1964).
- [25] J. Marchalonis u. G. M. Edelman, *J. Exp. Med.* **122**, 601 (1965); **124**, 901 (1966).
- [26] J. B. Fleishman, R. H. Pain u. R. R. Porter, *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.* **1**, 174 (1962); J. B. Fleishman, R. R. Porter u. E. M. Press, *Biochem. J.* **88**, 220 (1963).
- [27] M. Fougereau u. G. M. Edelman, *J. Exp. Med.* **121**, 373 (1965).
- [28] G. M. Edelman, W. E. Gall, M. J. Waxdal u. W. H. Konigsberg, *Biochemistry* **7**, 1950 (1968); M. J. Waxdal, W. H. Konigsberg, W. L. Henley u. G. M. Edelman, *ibid.* **7**, 1959 (1968); W. E. Gall, B. A. Cunningham, M. J. Waxdal, W. H. Konigsberg u. G. M. Edelman, *ibid.* **7**, 1973 (1968); B. A. Cunningham, P. D. Gottlieb, W. H. Konigsberg u. G. M. Edelman, *ibid.* **7**, 1983 (1968); G. M. Edelman, B. A. Cunningham, W. E. Gall, P. D. Gottlieb, U. Rutishauser u. M. J. Waxdal, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **63**, 78 (1969); P. D. Gottlieb, B. A. Cunningham, U. Rutishauser u. G. M. Edelman, *Biochemistry* **9**, 3155 (1970); B. A. Cunningham, U. Rutishauser, W. E. Gall, P. D. Gottlieb, M. J. Waxdal u. G. M. Edelman, *ibid.* **9**, 3161 (1970); U. Rutishauser, B. A. Cunningham, C. Bennett, W. H. Konigsberg u. G. M. Edelman, *ibid.* **9**, 3171 (1970); C. Bennett, W. H. Konigsberg u. G. M. Edelman, *ibid.* **9**, 3181 (1970); W. E. Gall u. G. M. Edelman, *ibid.* **9**, 3188 (1970); G. M. Edelman, *ibid.* **9**, 3197 (1970).
- [29] K. Amiraian u. E. J. Leikhim, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **108**, 454 (1961); A. Taranta u. E. C. Franklin, *Science* **134**, 1981 (1961).
- [30] R. L. Hill, R. Delaney, R. R. Fellows, Jr. u. H. E. Lebovitz, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **56**, 1762 (1966).
- [31] S. J. Singer u. R. E. Doolittle, *Science* **153**, 13 (1966).
- [32] E. M. Press u. N. M. Hogg, *Nature* **223**, 807 (1969).
- [33] B. A. Cunningham, P. D. Gottlieb, M. N. Pflumm u. G. M. Edelman in B. Amos: *Progress in Immunology*. Academic Press, New York 1971, S. 3ff; B. A. Cunningham, M. N. Pflumm, U. Rutishauser u. G. M. Edelman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **64**, 997 (1969).
- [34] F. Franěk u. R. S. Nezhlin, *Biokhimiya* **28**, 193 (1963).
- [35] G. M. Edelman, D. E. Olins, J. A. Gally u. N. D. Zinder, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **50**, 753 (1963).
- [36] D. E. Olins u. G. M. Edelman, *J. Exp. Med.* **119**, 789 (1964).
- [37] E. Haber, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **52**, 1099 (1964).
- [38] D. Inbar, J. Hachman u. D. Givol, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 2659 (1972).
- [39] T. T. Wu u. E. A. Kabat, *J. Exp. Med.* **132**, 211 (1970).
- [40] G. M. Edelman, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **190**, 5 (1971).
- [41] J. M. Kehoe u. M. Fougereau, *Nature* **224**, 1212 (1970).
- [42] D. Yasmeen, J. R. Ellerson, K. J. Dorrington u. R. H. Painter, *J. Immunol.*, im Druck.
- [43] I. Berggård u. A. G. Bearn, *J. Biol. Chem.* **243**, 4095 (1968).
- [44] O. Smithies u. M. D. Poulik, *Science* **175**, 187 (1972).
- [45] P. A. Peterson, B. A. Cunningham, I. Berggård u. G. M. Edelman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 1967 (1972).
- [46] R. J. Poljak, L. M. Amzel, H. P. Avey, L. N. Becka u. A. Nisonoff, *Nature New Biol.* **235**, 137 (1972).
- [47] D. R. Davies, V. R. Sarma, L. W. Labaw, E. W. Silberton u. W. D. Terry in B. Amos: *Progress in Immunology*. Academic Press, New York 1971, S. 25 ff.
- [48] W. E. Gall u. P. G. D'Eustachio, *Biochemistry* **11**, 4621 (1972).
- [49] L. Hood, W. R. Gray, B. G. Sanders u. W. J. Dreyer, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **32**, 133 (1967).
- [50] C. Milstein, *Nature* **216**, 330 (1967).
- [51] R. Grubb: *The Genetic Markers of Human Immunglobulins*. Springer, Berlin 1970; *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **39**, 195 (1956).
- [52] J. Oudin, *C. R. Acad. Sci.* **242**, 2489, 2606 (1956); *J. Exp. Med.* **112**, 125 (1960).
- [53] P. B. Medawar in: *Les Prix Nobel en 1960*. Imprimerie Royal, P. A. Norstedt & Söner, Stockholm, S. 125 ff.
- [54] N. Sharon u. H. Lis, *Science* **177**, 949 (1972).
- [55] G. M. Edelman, B. A. Cunningham, G. N. Reeke, Jr., J. W. Becker, M. J. Waxdal u. J. L. Wang, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 2580 (1972).
- [56] I. Yahara u. G. M. Edelman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 608 (1972).
- [57] R. B. Taylor, P. H. Duffus, M. C. Raff u. S. DePetris, *Nature New Biol.* **233**, 225 (1971); R. Loor, L. Forni u. B. Pernis, *Eur. J. Immunol.* **2**, 203 (1972).
- [58] J. Andersson, G. M. Edelman, G. Möller u. O. Sjöberg, *Eur. J. Immunol.* **2**, 233 (1972).
- [59] M. F. Greaves u. S. Bauminger, *Nature New Biol.* **235**, 67 (1972).
- [60] G. J. V. Nossal u. G. L. Ada: *Antigens, Lymphoid Cells and the Immune Response*. Academic Press, New York 1971.
- [61] H. Wigzell u. B. Andersson, *J. Exp. Med.* **129**, 23 (1969).
- [62] G. M. Edelman, U. Rutishauser u. C. F. Millette, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68**, 2153 (1971).
- [63] U. Rutishauser, C. F. Millette u. G. M. Edelman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 1596 (1972).
- [64] J. L. Gowans, J. H. Humphrey u. N. A. Mitchison, *Proc. Roy. Soc. (London) B* **176**, 369 (1971).
- [65] U. Rutishauser u. G. M. Edelman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 3774 (1972).
- [66] N. K. Jerne, A. A. Nordin u. C. Henry in B. Amos u. H. Koprowski: *Cell Bound Antibodies*. Wistar Institute Press, Philadelphia 1963, S. 109 ff.