

# Strukturuntersuchungen an Immunglobulinen (Nobel-Vortrag)<sup>[\*\*]</sup>

Von R. R. Porter<sup>[\*]</sup>

Als ich 1946 unter Anleitung von Dr. F. Sanger mit Forschungsarbeiten begann, kam gerade die zweite Auflage von Karl Landsteiners Buch „The Specificity of Serological Reactions“<sup>[1]</sup> nach England. In diesem Werk war das beträchtliche Informationsmaterial über das Gebiet der Antikörperspezifität, soweit man es damals kannte, zusammengefaßt. Vieles davon entstammte Landsteiners eigenen oder den Arbeiten anderer, die seine grundlegende Technik angewendet hatten, um Antikörper gegen Haptene herzustellen und ihre Fähigkeit zu testen, die Präzipitation von Antiseren und konjugierten Proteinen zu inhibieren. In diesem Buch wurden auch die Beobachtungen von Tiselius und Pederson aus Uppsala beschrieben, die in Zusammenarbeit mit Heidelberger und Kabat fanden, daß alle Kaninchen-Antikörper sich in der  $\gamma$ -Globulinfraktion der Serumproteine befinden und ein Molekulargewicht von 150000 haben. Diese Kombination einer offensichtlich unbegrenzten Zahl von antikörper-bindenden Spezifitäten einerseits mit einer anscheinend nahezu homogenen Gruppe von Proteinen andererseits erstaunte mich und tut es sogar heute noch.

## Aktive Bruchstücke von Antikörpern

Die Herstellung von Antikörpern durch Dissoziation von spezifischen Präzipitaten mit starken Salzlösungen oder mit sauren Lösungen war schon beschrieben worden, ebenso die Herstellung von  $\gamma$ -Globulinfraktionen in brauchbaren Ausbeuten aus dem gesamten Serum durch Aussalzen; daher war es möglich, die strukturellen Grundlagen der antikörper-bindenden Spezifität experimentell anzugehen. Ein Anfang war bereits gemacht worden, da man zeigen konnte, daß nicht das gesamte Molekül für die Bindungsspezifität benötigt wird. Parventjev<sup>[2]</sup> hatte die Pepsinbehandlung von Serum als Methode zur Reinigung käuflicher Pferde-Antitoxine eingeführt; Petermann und Papenheimer<sup>[3]</sup> untersuchten diese Reaktion, benutzten aber gereinigtes Pferde-Antidiphtherietoxin statt des gesamten Serums für die peptische Hydrolyse. Sie zeigten, daß sich ein Produkt erhalten ließ, das mit Toxoid ausflocken oder Toxin neutralisieren konnte und ein Molekulargewicht von 113000 besaß, d. h. wesentlich kleiner als das ursprüngliche Molekül war. Petermann<sup>[4]</sup> zeigte später, daß sich menschliches  $\gamma$ -Globulin von Papain aufspalten ließ und ein Produkt ergab, welches sie aufgrund von Ultrazentrifugen-Analysen als Viertelmolekül ansah. Bei diesen Arbeiten wurden allerdings keine Antikörper-Aktivitäten untersucht.

[\*] Prof. Dr. R. R. Porter  
Department of Biochemistry  
University of Oxford  
South Parks Road, Oxford (England)

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

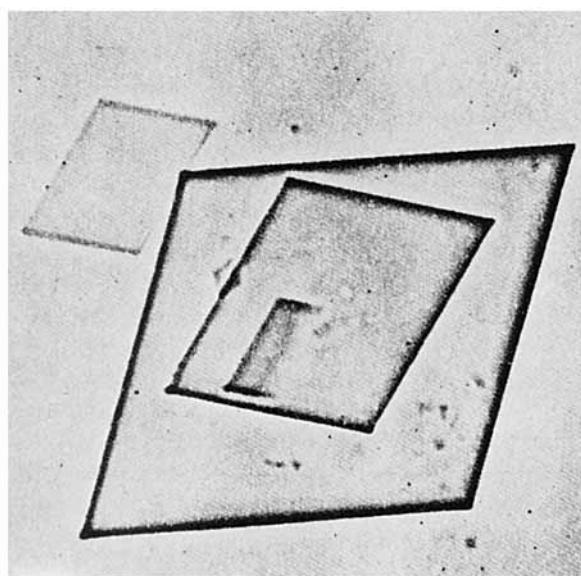
Ungefähr gleichzeitig führte Landsteiner<sup>[5]</sup> weitere Untersuchungen über die Antigenspezifität von Proteinantigenen durch und fand, daß ungereinigte, aber offensichtlich niedermolekulare Peptide eines Säurehydrolysats von Seidenfibroin die Fällung von löslichem Fibroin durch dessen Kaninchen-Antiserum verhindern konnten. Im Zusammenhang mit Studien an Haptenen und anderen Untersuchungen ließ dieser Befund vermuten, daß die antigenen Zentren und vermutlich daher auch die antikörper-bindenden Zentren klein sind, sicherlich sehr viel kleiner als das Antikörpermolekül; es schien sich daher zu lohnen, nach Bruchstücken von Antikörpermolekülen zu suchen, welche die Fähigkeit zur Kombination mit dem Antigen bewahrt hatten.

Der Test auf solche aktiven Fragmente beruhte darauf, daß sie die Kombination zwischen Antigen und gesamtem Antikörper hemmen können. Obwohl jedoch die Hydrolyse durch Säure oder Enzyme unter vielen Bedingungen geprüft wurde<sup>[6]</sup>, ergab nur Papain ein aktives Produkt, und dieses schien laut Bestimmung der N-terminalen Aminosäure das Viertelmolekül zu sein, das Petermann<sup>[4]</sup> vorher beschrieben hatte. Zweifellos befand sich das Bindungszentrum in diesen kleineren Bruchstücken; man hatte also erreicht, daß sich das Strukturproblem beträchtlich verkleinert hatte, aber selbst die Strukturaufklärung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 40000 war noch eine kaum zu bewältigende Aufgabe.

Diese Arbeiten wurden in Sangers Laboratorium in Cambridge ausgeführt, und unter seiner Anleitung wurde versucht, die N-terminale Aminosäure und die terminalen Sequenzen zu bestimmen. Die Arbeiten erwiesen sich jedoch als vergeblich, weil sie annehmen ließen, daß die  $\gamma$ -Globuline und Antikörper von Kaninchen aus einer einzigen, offenen Polypeptidkette bestanden, und daß die biologisch aktiven Viertelmoleküle ebenfalls dieselbe N-terminale Aminosäure, nämlich Alanin, aufwiesen. Die Möglichkeit, daß es blockierte N-terminale Aminosäurereste geben könnte, wurde nicht in Betracht gezogen.

Sieben Jahre später kehrten wir zur Papainhydrolyse von Kaninchen- $\gamma$ -Globulin zurück, aber statt des rohen Enzympräparats, das wir früher benutzt hatten, nahmen wir jetzt ein kristallines Enzym<sup>[7]</sup> in wesentlich kleineren Konzentrationen, d. h. einem Hundertstel des Substratgewichts<sup>[8]</sup>. Unter diesen Bedingungen zeigte sich eine Anzahl vorher übersehener Gesichtspunkte. Erstens ließ sich fast alles Protein nach der Dialyse des Hydrolysats zurückgewinnen; trotz der breiten Spezifität des Enzyms wurde nur sehr wenig an kleinen Peptiden gebildet. Die Produkte, alle von sehr ähnlicher Größe (Sedimentationskonstante 3.5 S), waren eher ein Drittel als ein Viertel so groß wie das Ausgangsmaterial, und zur großen Überraschung kristallisierte eins der Hydrolyseprodukte sehr leicht in rhombischen Plättchen während der Dialyse der neutralen Lösung im Kälterraum (Abb. 1). Die letztere Beobachtung, die den Schluß nahelegte, daß ein selbst niemals kristallisi-

rendes Protein ein offenbar homogeneres und daher kristallisierendes Bruchstück liefert, war völlig unerwartet und wirklich nicht zu akzeptieren. Wir nahmen an, daß die Kristalle aus den weniger löslichen Aminosäuren bestanden, beachteten sie nicht weiter und verwarfene sie einige Monate lang.



A966.1

Abb. 1. Kristalle aus einem Papain-Hydrolysat von Kaninchen-IgG (Fc-Fragment).

Glücklicherweise war mein Nachbar im angrenzenden Laboratorium am National Institute of Medical Research in London die Röntgen-Kristallographin Dr. Olga Kennard, und als ich sie schließlich einmal nach ihrer Ansicht fragte, meinte sie sogleich, daß es sich um Proteinkristalle handeln könnte. Diese Kristalle entsprachen, wie sich herausstellte, dem dritten Maximum, das bei der Fraktionierung des Hydrolyseprodukts auf Carboxymethylcellulose erhalten wurde (Abb. 2). Sie wurden Fraktion III genannt und sind jetzt unter dem Namen Fc-Fragment bekannt. Die Fraktionen I und II waren diejenigen hydrolytisch gewonnenen Komponenten, die die Bindungsspezifität des ursprünglichen Antikörpers enthielten. Fraktion III besaß

keine solche Aktivität, trug aber bei Tests mit Antiseren von Ziegen, Ratten und Meerschweinchen den Großteil der antigenen Spezifität der Kaninchen- $\gamma$ -Globuline. Genaue Untersuchungen<sup>[9]</sup> zeigten, daß sich die Fraktionen I und II sowohl chemisch als auch antigen sehr ähnlich waren; später zeigten Nisonoff et al.<sup>[10]</sup>, daß kein echter Unterschied zwischen diesen beiden Fraktionen besteht. Wenn eine basische Fraktion von  $\gamma$ -Globulinen mit Papain behandelt wurde, bekam man zwei Moleküle II und ein Molekül III; eine saure Fraktion von  $\gamma$ -Globulinen ergab zwei Moleküle I und ein Molekül III. Die geringen Ladungsunterschiede zwischen den Fraktionen I und II gaben die Heterogenität der Ladung im Ausgangsmaterial wieder. Nisonoff et al.<sup>[11]</sup> waren ebenfalls zur peptischen Hydrolyse von  $\gamma$ -Globulinen zurückgekehrt, benutzten aber Kaninchenprotein statt Pferde-Antitoxin; sic zeigten, daß das Produkt vom Molekulargewicht 100000, das dem früher untersuchten vergleichbar war, bei Reduktion Halbmoleküle ergibt, die den Fraktionen I und II sehr ähnlich sind. Die letzteren heißen jetzt Fab, das Produkt aus dem peptischen Hydrolysat wird (Fab)<sub>2</sub> genannt.

Die Untersuchung der Produkte der Papainhydrolyse zeigte, daß  $\gamma$ -Globulin, heute Immunglobulin Gamma oder IgG genannt, aus drei globulären Abschnitten besteht, die wahrscheinlich sehr dicht gefaltet sind, da sie gegenüber weiterem Abbau durch Papain außergewöhnlich widerstandsfähig sind. Das Fc-Fragment ist offenbar allen Molekülen gemeinsam, während die beiden gleichen Fab-Fragmente jeweils eine Bindungsstelle tragen und zugleich die Variabilität, die dem gesamten Antikörper eigen ist. Es wurde versucht<sup>[9]</sup>, diese dreiteilige Struktur mit der vorgeschlagenen Struktur einer einzelnen, offenen Polypeptidkette, wie sie aus der Endgruppenanalyse von Kaninchen-IgG abgeleitet worden war, in Beziehung zu setzen. Natürlich ergab das keinen Sinn, und der weitere Fortschritt beruhte darauf, daß Edelman<sup>[12]</sup> zeigen konnte, daß in Wirklichkeit menschliches IgG und daher vermutlich auch IgG aller Spezies vielkettige Proteine sind. Es folgte daraus, daß es N-terminale, blockierte Aminosäuren geben müsse, und daß die Bestimmung der freien N-terminalen Aminosäuren von nur begrenzter Bedeutung ist.

### Die Vierpeptidketten-Struktur

Die Aufklärung der groben Struktur der Immunglobuline hing davon ab, ob ein Zusammenhang zwischen den von Edelman identifizierten Peptidketten und den Produkten der Papainhydrolyse erkannt werden konnte. Dieses gelang gut, nachdem die Reinigungsbedingungen für die Ketten verändert worden waren; es wurde nun in Abwesenheit denaturierender Agentien reduziert – Bedingungen, unter denen vor allem die Disulfidbrücken zwischen den Proteinketten aufgebrochen werden. Eine derartige Reduktion war nicht von einer Verringerung des Molekulargewichtes begleitet, die Ketten wurden jedoch dissoziiert und konnten bei der Chromatographie auf Sephadex-Säulen mit Essigsäure oder Propionsäure in schwere und leichte Ketten mit dem ungefähren Molekulargewicht 50000 bzw. 20000 getrennt werden. Diese Ketten blieben nun beim Neutralpunkt löslich und behielten ihre antigenen Spezifitäten. Aus einem Doppeldiffusionsversuch unter Verwendung

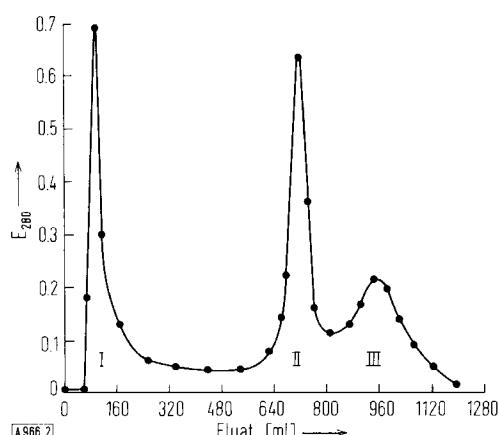
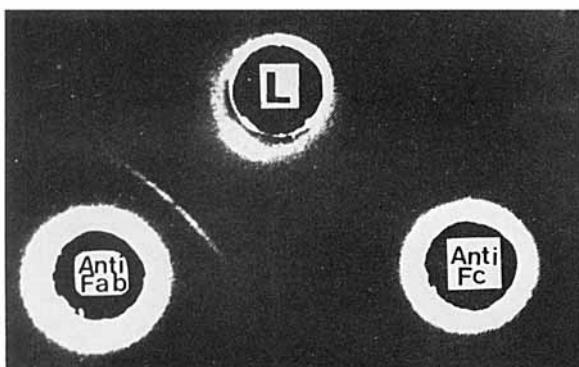
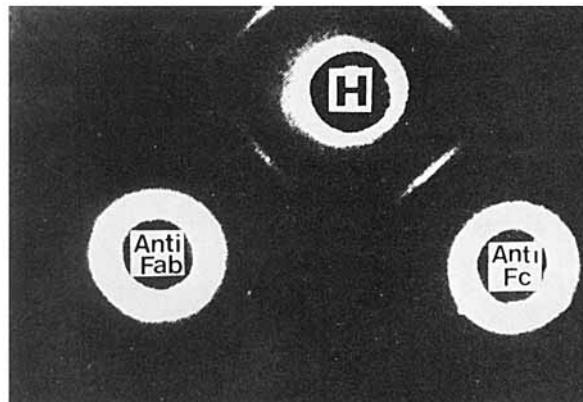


Abb. 2. Fraktionierung eines Papain-Hydrolysats von Kaninchen-IgG auf Carboxymethylcellulose in Natriumacetatpuffer ( $\text{pH} = 5.5$ ) mit einem Gradienten von 0.01 bis 0.9 mol/l. Die Fraktionen I und II (Fab) tragen die antikörper-bindenden Stellen, Fraktion III (Fc) kristallisiert im allgemeinen leicht.

von Antiseren, die spezifisch gegen Fab oder Fc waren, ging hervor, daß Fab antigen Zentren enthält, die sowohl schweren als auch leichten Ketten gemeinsam sind, daß aber Fc nur diejenigen enthält, die den schweren Ketten gemeinsam sind (Abb. 3). Dies führte dazu, eine Vierkettenstruktur zu postulieren<sup>[13]</sup> (Abb. 4). Genaue Untersuchungen bestätigten diese Struktur<sup>[14-16]</sup> und stellten sicher, daß die Papain-Hydrolyse ungefähr in der Mitte der schweren Kette stattfindet.

Es dauerte noch einige Jahre, ehe die ziemlich komplexe Anordnung der Disulfidbindungen der schweren Ketten



A 966.3

Abb. 3. Doppeldiffusion der schweren und leichten Ketten von Kaninchen-IgG gegen Ziegen-Anti-Kaninchen-Fab und Ziegen-Anti-Kaninchen-Fc. Man beachte, daß die leichte Kette nur mit Anti-Fab reagiert, während die schwere Kette sowohl mit Anti-Fab als auch mit Anti-Fc reagiert, d.h. Fab enthält Teile der schweren und der leichten Kette, während Fc nur Teile der schweren Kette enthält.

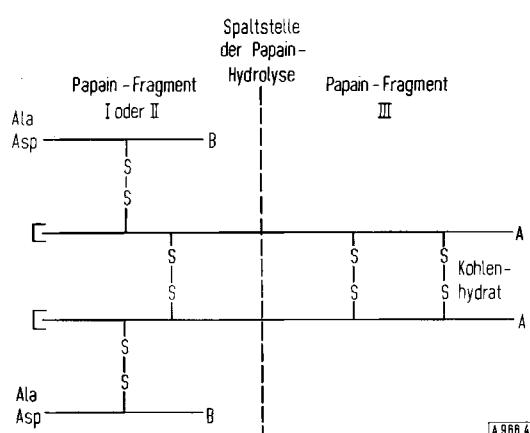


Abb. 4. Vierketten-Struktur von Kaninchen-IgG, wie sie aufgrund des Doppeldiffusions-Experiments von Abb. 3 und weiterer chemischer Hinweise postuliert wurde.

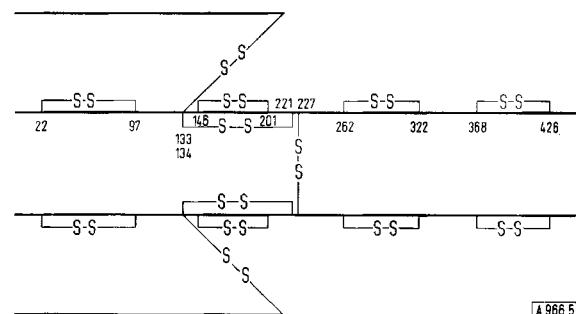


Abb. 5. Struktur von Kaninchen-IgG, die die ziemlich komplizierte Anordnung der Disulfidbrücken in der schweren Kette zeigt.

von Kaninchenserum aufgeklärt wurde<sup>[17]</sup> (Abb. 5). Die Disulfidbrücken können innerhalb einer Peptidkette liegen oder zwei Ketten verbinden. Die Blockierung der  $\alpha$ -Aminogruppe der N-terminalen Aminosäuren ließ sich auch schwieriger aufklären als erwartet, denn es wurde gefunden, daß es sich bei diesem Rest um die ringförmige Oxopyrrolidincarbonsäure (PCA) handelt<sup>[18, 19]</sup>, die man als Artefakt aus N-terminalen Glutaminresten gut kannte. Alle Versuche, N-terminales Glutamin in IgG zu finden, waren erfolglos, selbst wenn die Reinigung unter Bedingungen stattfand, die eine Umwandlung in PCA während der Aufarbeitung auszuschließen schienen. Inzwischen gibt es Hinweise darauf, daß Glutamin der Rest ist, der in die Peptidkette während der Synthese eingebaut wird<sup>[20]</sup>, daß aber PCA der N-terminalen Rest ist, der in Immunglobulinen im Blut vorliegt; es ist vermutet worden, daß intrazellulär eine enzymatisch katalysierte Cyclisierung abläuft. Man hat angenommen, daß PCA die einzige blockierte N-terminalen Aminosäure in Immunglobulinen aller Spezies ist, aber es scheint erst wenige sorgfältige Untersuchungen darüber zu geben.

### Antikörper-bindende Zentren

Während das Vierpeptidketten-Modell viele Aspekte der Antikörperstruktur erklärte, half es nicht zu verstehen, welche Eigenschaften es ermöglichen, daß Antikörper von unzähligen unterschiedlichen Spezifitäten gebildet werden. Damals schienen sich die Schwierigkeiten zu vergrößern, als sich die Zahl der Variationsmöglichkeiten verringerte. Ich versuchte mehrere Male, Hydrolyseprodukte von Fab zu bekommen, die immer noch das Antigen banden, hatte aber keinen Erfolg<sup>[21]</sup>. Ein Fortschritt ist jedoch gerade jetzt mit der Isolierung eines peptischen Hydrolysats aus einem Mäusemyelom-Protein MOPC 315 erzielt worden. Dieses Fv genannte Fragment scheint aus dem N-terminalen Teil des Fab-Moleküls gebildet zu werden, d.h. aus den leichten und den Fd-Ketten; es bewahrt seine volle Affinität für ein Dinitrophenyl-Hapten<sup>[22]</sup>.

Das Verständnis für den Ursprung der vielfältigen Bindungszentren kam natürlich mit der Entdeckung des Phänomens der variablen und der konstanten Teile in den Bence-Jones-Proteinen<sup>[23, 24]</sup>. Es war früher gezeigt worden, daß die im Urin auftretenden Bence-Jones-Proteine den leichten Ketten der Myelomproteine im Blut derselben Patienten entsprechen<sup>[25]</sup>. Die Beobachtung, daß die Ami-

nosäure-Sequenz in den 107 N-terminalen Resten des menschlichen Kappa-Bence-Jones-Proteins variiert, während das übrige Molekül konstant bleibt, machte es unmittelbar möglich zu verstehen, wie Millionen von unterschiedlichen Bindungsstellen innerhalb desselben strukturellen Rahmens gebildet werden können. Es wurde gezeigt, daß das Phänomen auch für die ungefähr 110 N-terminalen Reste der schweren Ketten zutrifft<sup>[26, 27]</sup>, und es war klar, daß die Bindungsstelle wohl aus den variablen Abschnitten beider dieser Ketten gebildet wird.

Viele Hinweise haben dazu beigetragen, in chemischem Sinne genau festzulegen, welche Reste der variablen Region in den schweren und leichten Ketten vermutlich direkt an der Determination der Spezifität des Bindungszentrums beteiligt sind. Diese Punkte sind kürzlich zusammenfassend dargestellt worden<sup>[28]</sup>, daher genügt es vielleicht, hier kurz die wesentlichen Schlußfolgerungen anzuführen.

1. Das antigene Zentrum scheint von der Größe eines Hexapeptids oder eines Hexasaccharids zu sein.
2. Dies ist der Größe des Substrats eines hydrolytischen Enzyms wie etwa Lysozym vergleichbar. In diesem Enzym hat man 15–20 Aminosäurereste als wahrscheinliche „Kontaktaminosäuren“ identifiziert, d. h. als Reste, die mit dem Substrat eine Bindung eingehen. Daher scheint dies die wahrscheinlichste Anzahl von Resten zu sein, von denen man erwarten kann, daß sie die Bindungsstellen des Antikörpers einhüllen und eine direkte Rolle bei der Determination der Spezifität spielen. Wenn jeder Rest jede dieser 15–20 Positionen einnehmen könnte, wäre die mögliche Zahl von Varianten tatsächlich sehr hoch.
3. Es gibt mindestens drei hypervariable Abschnitte in jeder der variablen Regionen der schweren und leichten Ketten. Sie wurden durch die Diagramme von Kabat<sup>[29, 30]</sup> über die Häufigkeit des Auftretens verschiedener Reste in den ungefähr 110 Positionen der variablen Regionen von Myelomproteinen recht deutlich gezeigt. Diese Hypervariabilität geht auch aus Sequenzuntersuchungen der schweren Ketten von Kaninchen-IgG hervor, und beide Untersuchungen stimmen in der Annahme überein, daß sich die Hypervariabilität in den meisten Fällen auf eine bis zwei Positionen beschränkt, daß aber in der Region 96–110 der schweren Ketten vier oder fünf Positionen besonders variabel sein können. In der  $\gamma$ -Kette von Kaninchen gibt es in dieser Position einen Abschnitt, von dem man keine zufriedenstellende Sequenz ermitteln konnte, vermutlich wegen der Komplexität der Sequenzen<sup>[31]</sup>.
4. Mehrere Hinweise lassen vermuten, daß diese sechs hypervariablen Abschnitte in den beiden variablen Regionen im intakten Molekül zusammengebracht werden können, um zur Struktur der bindenden Zentren beizutragen. Der deutlichste Hinweis stammt aus Affinitätsmarkierungs-Versuchen, bei denen man an einen Antikörper ein Hapten bindet, das eine reaktive Gruppe trägt. Es erfolgen dann kovalente Reaktionen, und nach anschließender Hydrolyse können die markierten Peptide identifiziert und durch Vergleich in die bekannte Aminosäure-Sequenz eingepaßt werden. Es ist eine Vielzahl von Techniken für die Affinitätsmarkierung eingeführt und sowohl bei natürlichen Antikörpern als auch bei einem Mäusemyelom-Protein, das eine hohe Affinität für die Dinitrophenylgruppe aufweist, angewendet worden. Obwohl die Arbeiten in

manchen Fällen unvollständig sind, stimmen sie alle darin überein, daß man die markierten Reagenzien an Resten innerhalb oder in der Nähe des einen oder anderen der sechs hypervariablen Abschnitte findet.

5. Es ist wahrscheinlich, daß es im Anschluß an die Bindungsstelle eine hydrophobe Region gibt, die zwar nicht zur Spezifität, wohl aber zur Steigerung der Bindungsaffinität an ein geeignetes antigenes Zentrum beitragen könnte. Die genaueren Einzelheiten des Bindungszentrums können erst erwartet werden, wenn die kristallographischen Untersuchungen an Immunglobulinen und ihren Fragmenten, wie sie jetzt in mehreren Laboratorien unternommen werden, abgeschlossen sind. Es wird sehr interessant sein zu sehen, inwieweit die dargelegten Voraussagen aus chemischen Untersuchungen sich als richtig erweisen, wenn die gesamten Strukturen vorliegen.

## Der genetische Ursprung der multiplen Formen von Antikörpern

Während die Entdeckung der variablen Regionen und besonders der hypervariablen Abschnitte darin die grundlegende Frage nach dem strukturellen Ursprung der vielfältigen Bindungsspezifitäten zu beantworten schien, warf sie ganz offensichtlich neue, sehr schwierige Probleme auf, die den genetischen Ursprung dieser vielen verschiedenenartigen Aminosäure-Sequenzen betreffen. Dieses Thema hat die Grundlage vieler Diskussionen und Zusammenfassungen abgegeben; entscheidende Beweise für irgendeine der vielen Theorien fehlen noch. Ich möchte hier nur kurz die Arbeit über die Sequenz der variablen Abschnitte der schweren Ketten von Kaninchen-IgG erwähnen, die sich als Teil der anderen, oben diskutierten Strukturuntersuchungen entwickelten.

Es gibt vielleicht zwei Hauptfragen, die zur Zeit diskutiert werden. Erstens: sind sowohl schwere als auch leichte Ketten das Produkt von jeweils zwei Genen, von denen eins für die variable, das andere für die konstante Region codiert? Zweitens: sind die multiplen Gene, die für die variablen Abschnitte codieren, Keimbahn-Gene, oder sind sie das Produkt somatischer Mutationen einer viel kleineren Anzahl von Keimbahn-Genen?

In jedem Fall wäre es offensichtlich von Wert, wenn allele Varianten, die als genetische Marken dienen könnten, sowohl in den variablen als auch in den konstanten Regionen nachgewiesen werden könnten. Marken in konstanten Regionen sind tatsächlich in vielen Klassen und Unterklassen von Immunglobulinen verschiedenartiger Spezies gefunden worden. Die sich daraus ergebende phänotypische Eigenschaft ist die antigene Spezifität des Immunglobulins. Diese Spezifität wurde mit Aminosäure-Änderungen korreliert, doch hat sich keine direkte Identifizierung der Spezifität und der Sequenzänderung durch den Nachweis etwa einer Inhibitionswirkung durch ein kleines Peptid als möglich erwiesen. Wahrscheinlich ist ein weit größerer Abschnitt des Moleküls für die Integrität des antigenen Zentrums notwendig. In vielen Fällen jedoch sind die genetischen Marken der konstanten Region ohne Zweifel gefun-

den worden, da man zeigen kann, daß sie sich im Fc-Fragment befinden. Die Zuordnung von genetischen Marken zur variablen Region ist weniger klar, obwohl es wahrscheinlich ist, daß die „a“-Locus-Allotypen von Kaninchen daher stammen.

1963 machte *Todd*<sup>[32]</sup> die überraschende Beobachtung, daß die allelen „a“-Locus-Spezifitäten von Kaninchen-Immunglobulinen sowohl IgM als auch IgG gemeinsam sind. In dem Maße, in dem die Strukturuntersuchungen fortgeschritten, wurde es klar, daß diese antigenen Spezifitäten auf den  $\mu$ - bzw.  $\gamma$ -Ketten lokalisiert sind, obwohl diese Ketten offensichtlich in ihrer chemischen Struktur und infolgedessen auch in ihren Strukturgenen voneinander abweichen. Es erschien dann möglich, daß die „a“-Locus-Spezifitäten von den variablen Regionen determiniert werden konnten, die beide Ketten gemeinsam besitzen. Diese Beobachtung von *Todd* war die erste, die die Möglichkeit aufbrachte, daß zwei Gene für die Struktur der schweren Ketten verantwortlich sein könnten; inzwischen sind unter ungefähr 400 Nachkommen zwei Beispiele von Überkreuzungen (crossovers) zwischen allelen Spezifitäten bekannt geworden, die zweifelsfrei durch die Struktur der konstanten Teile der  $\gamma$ -Ketten und die „a“-Locus-Spezifitäten determiniert werden. Wenn diese Untersuchungen fortgesetzt werden, sollten sie die Hinweise stützen, daß zwei Gene für die  $\gamma$ -Ketten codieren. Die Aufklärung der strukturellen Basis der „a“-Locus-Spezifitäten hängt jedoch zur Zeit von der Korrelation der Aminosäure-Sequenzen in der variablen Region mit der Spezifität und dem Fehlen jeglicher ähnlicher Korrelationen in den Sequenzen der konstanten Regionen ab. Das ist zwar ziemlich indirekt, doch sofern man es akzeptieren will, haben wir eine solche Korrelation gefunden, die sich über ungefähr 16 Positionen der  $\gamma$ -Kette erstreckt, als wir mit dem gesammelten IgG von mehreren Kaninchen gearbeitet haben<sup>[33]</sup>. Arbeiten mit homogenen Antipolysaccharid-Antikörpern von Kaninchen haben diese Korrelation für einige, aber nicht für alle diese Positionen bestätigt<sup>[34, 35]</sup>.

Diese „a“-Locus-Marken könnten ganz sicher bei genetischen Untersuchungen von entscheidender Bedeutung sein; in der Tat würde ihr Vorkommen in der variablen Region von einigen Forschern als starker Hinweis gegen die Wahrscheinlichkeit von Millionen Kopien der variablen Regionen in der Keimbahn angesehen werden. Es lohnt sich daher zu versuchen, widerspruchsfreie Hinweise zu gewinnen, daß diese wahrscheinlichen genetischen Marken tatsächlich welche sind. Als Alternative sollte es aber auch möglich sein, die vorhandenen chemischen Hinweise zu benutzen, um direkt die Vererbung eines gegebenen allelen Peptids statt einer antigenen Spezifität zu verfolgen. Eins dieser Peptide, das in zwei oder drei Formen in verschiedenen Kaninchen vorkommt, kann relativ leicht nach Reaktion der Halbcystinreste an Position 92 mit  $^{14}\text{C}$ -Jodesigsäure durch Autoradiographie identifiziert werden<sup>[36]</sup>. Es gibt vorläufige Hinweise, daß sich das Peptid tatsächlich wie eine erbliche Eigenschaft verhält; wenn dies sich bestätigt, wird man einen direkten Hinweis besitzen, daß es sich um eine Strukturgen-Marke in der variablen Region handelt. Weitere Versuche sind im Gange und sollten zur Kenntnis des genetischen Ursprungs der variablen Regionen beitragen.

Einige Aspekte der Strukturuntersuchungen von Immunglobulinen sind insoweit abgeschlossen, als man jetzt die chemischen Strukturen mehrerer menschlicher Myeloproteine und die fast vollständigen Strukturen von Kaninchen-Immunglobulinen kennt. Die Lösung der strukturellen Basis der Bindungsspezifität von Antikörpern, die mir das zentrale Problem schien, nähert sich offenbar ebenfalls dem Abschluß. Strukturuntersuchungen werden allerdings immer noch eine Rolle bei der Lösung des genetischen Ursprungs der Antikörper spielen, und selbstverständlich gibt es auch noch viele weitere Anwendungsmöglichkeiten, die hier nicht diskutiert wurden. Die Wechselwirkung von Immunglobulinen mit Komplement-Komponenten und mit Zelloberflächen sind zwei davon, an denen das Interesse schon heute sehr schnell zunimmt.

Eingegangen am 16. Februar 1973 [A 966]  
Übersetzt von Dr. Harold Rüdiger, Köln

- [1] K. Landsteiner: *The Specificity of Serological Reactions*. Harvard University Press, Cambridge (USA) 1946.
- [2] I. A. Parmentev, US-Pat. 2065196 (1936).
- [3] M. L. Petermann u. A. M. Pappenheimer, *J. Phys. Chem.* 45, 1 (1941).
- [4] M. L. Petermann, *J. Amer. Chem. Soc.* 68, 106 (1946).
- [5] K. Landsteiner, *J. Exp. Med.* 75, 269 (1942).
- [6] R. R. Porter, *Biochem. J.* 46, 479 (1950).
- [7] J. R. Kimmel u. E. L. Smith, *J. Biol. Chem.* 207, 515 (1954).
- [8] R. R. Porter, *Nature* 182, 670 (1958).
- [9] R. R. Porter, *Biochem. J.* 73, 119 (1959).
- [10] J. L. Palmer, W. J. Mandy u. A. Nisonoff, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 48, 49 (1962).
- [11] A. Nisonoff, F. C. Wissler, L. N. Lipman u. D. L. Woernley, *Arch. Biochem. Biophys.* 89, 230 (1960).
- [12] G. M. Edelman, *J. Amer. Chem. Soc.* 81, 3155 (1959).
- [13] R. R. Porter in A. Gellhorn u. E. Hirschberg: *Basic Problems of Neoplastic Disease*. Columbia University Press, New York 1962.
- [14] J. B. Fleischmann, R. R. Porter u. E. M. Press, *Biochem. J.* 88, 220 (1963).
- [15] M. J. Crumpton u. J. M. Wilkinson, *Biochem. J.* 88, 228 (1963).
- [16] R. H. Pain, *Biochem. J.* 88, 234 (1963).
- [17] I. J. O'Donnell, B. Frangione u. R. R. Porter, *Biochem. J.* 116, 261 (1970).
- [18] E. M. Press, P. J. Piggot u. R. R. Porter, *Biochem. J.* 99, 356 (1966).
- [19] J. M. Wilkinson, E. M. Press u. R. R. Porter, *Biochem. J.* 100, 303 (1966).
- [20] D. I. Stott u. A. J. Munro, *Biochem. J.* 128, 1221 (1972).
- [21] R. R. Porter, Brookhaven Symp. Biol. 13, 203 (1960).
- [22] D. Inbar, J. Hochman u. D. Givol, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 2659 (1972).
- [23] N. Hilschmann u. L. C. Craig, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 53, 1403 (1965).
- [24] K. Titani, E. Whitley, L. Avogadro u. F. W. Putnam, *Science* 149, 1090 (1965).
- [25] G. M. Edelman u. J. A. Gally, *J. Exp. Med.* 116, 207 (1962).
- [26] E. M. Press u. N. M. Hogg, *Nature* 223, 807 (1969).
- [27] 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).
- [28] R. R. Porter in F. P. Inman: *Contemporary Topics in Immunochemistry*. Plenum Press, New York 1972, Bd. 1, S. 145.
- [29] T. T. Wu u. E. A. Kabat, *J. Exp. Med.* 132, 211 (1970).
- [30] E. A. Kabat u. T. T. Wu, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 190, 382 (1971).
- [31] R. G. Fruchter, S. A. Jackson, L. E. Mole u. R. R. Porter, *Biochem. J.* 116, 249 (1970).
- [32] C. W. Todd, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 11, 170 (1963).
- [33] L. E. Mole, S. A. Jackson, R. R. Porter u. J. M. Wilkinson, *Biochem. J.* 124, 301 (1971).
- [34] J. B. Fleischman, *Biochemistry* 10, 2753 (1971).
- [35] J. C. Jaton u. D. G. Braun, *Biochem. J.* 130, 539 (1972).
- [36] L. E. Mole, unveröffentlichte Arbeiten (1972).