

# Histokompatibilitätsantigene der Maus

Von Roland Henning<sup>[\*]</sup>

In diesem Aufsatz werden experimentelle Ergebnisse und neue Theorien zur chemischen Struktur und zur biologischen Funktion von Histokompatibilitätsantigenen bei der Immunüberwachung virusinfizierter und maligner Zellen dargelegt. Von diesen Antigenen, auch Transplantationsantigene genannt, sind die H-2-Antigene der Maus am besten untersucht. Es handelt sich um membrangebundene Glykoproteine, die u. a. die Abstoßung von transplantiertem Fremdgewebe bewirken. Ein Fernziel der Forschung auf diesem Gebiet ist die Nutzbarmachung des Immunüberwachungssystems für die Therapie bisher unbeeinflußbarer Krankheiten.

## 1. Einleitung

Histokompatibilitätsantigene sind membrangebundene Glykoproteine, die für die Abstoßung von Gewebetransplantaten fremder Organismen verantwortlich sind. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, daß diese Membranproteine an Immunreaktionen teilhaben, um den Körper gegen Virusinfektionen und Entstehung von Tumoren zu schützen. Es handelt sich um polymorphe Proteine, die bei der Maus auf dem 17. Chromosom im Histokompatibilitätskomplex (siehe Abb. 1) codiert sind. Viele Befunde dieses an der Maus am besten untersuchten Systems können auch im weitgehend analogen menschlichen HLA-System gezeigt werden.

Experimentell korrekt fundierte und richtig interpretierte Beobachtungen über Gewebsabstoßungen datieren um die Jahrhundertwende<sup>[1]</sup>. Damals gelang es, Mäuseinzuchtstämme, d. h. genetisch einheitliches Tiermaterial, zu züchten. Mäuse eines solchen Inzuchtstammes verhalten sich etwa wie eineiige Zwillinge. Gorer<sup>[2]</sup> untersuchte 1938 das Blutgruppensystem der Maus und fand, daß das von ihm beschriebene Antigen II mit der Gewebsabstoßung korreliert und genetisch determiniert ist. Dieses Antigen II wurde später in H-2-Antigen umbenannt<sup>[3]</sup>. Medawar<sup>[4]</sup> beschrieb 1944 die Phasen der Gewebsabstoßung und führte diese Beobachtung bis zur praktischen Anwendung der Hauttransplantation beim Menschen. Der nächste entscheidende Schritt war die Einführung kongener Inzuchtrößen durch George D. Snell<sup>[5]</sup>. Bei kongenen Mauslinien handelt es sich z. B. um zwei Mäuseinzuchtstämme, die sich nur in einem Locus des Histokompatibilitätskomplexes unterscheiden. Durch Kreuzimmunisierung solcher kongener Inzuchtstämme ist es möglich, Antikörper (Alloantikörper)

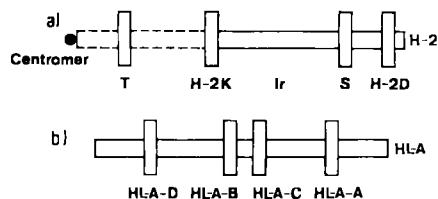


Abb. 1. H-2- und HLA-Genkomplex (Histokompatibilitätskomplex). a) Der H-2-Genkomplex auf dem 17. Chromosom der Maus wird von den Loci H-2K und H-2D begrenzt. Innerhalb des Genkomplexes befinden sich die I- und die S-Region. b) Der HLA-Genkomplex auf dem 6. Chromosom des Menschen ist ähnlich wie der H-2-Genkomplex der Maus aufgebaut, nur liegt die HLA-D-Region, die der I-Region der Maus entspricht, außerhalb der Loci HLA-A und HLA-B. Diese beiden Loci sind dem K- und dem D-Locus der Maus äquivalent (nach [8]).

zu erzeugen, die spezifisch gegen ein einziges Genprodukt des Histokompatibilitätskomplexes gerichtet sind. Derartige Alloantiseren sind die Hauptinstrumente der modernen Transplantationsserologie, mit deren Hilfe Histokompatibilitätsantigene mit hoher Spezifität charakterisiert, isoliert und chemisch untersucht werden können.

Mit immungenetischen Methoden fand man, daß Histokompatibilitätsantigene und die Spezifität humoraler Immunantworten häufig eng miteinander gekoppelt sind, und man schloß daraus, daß die dafür verantwortlichen Gene (Ir-Gene) auf dem gleichen Chromosom wie H-Antigene codiert sein müssen<sup>[6]</sup>. Klein und Shreffler stellten 1971 die Hypothese auf<sup>[7]</sup>, daß das für die Gewebsabstoßung verantwortliche Histokompatibilitätsantigen von zwei Loci, dem K- und dem D-Locus, auf dem 17. Chromosom der Maus codiert wird (Zwei-Locus-Modell)<sup>[7]</sup>. Neben dem K- und dem D-Locus sind auf dem Histokompatibilitätskomplex die oben erwähnte I-Region und außerdem die S-Region zu finden. Letztere codiert für bestimmte Bestandteile des Komplementsystems. Abbildung 1 gibt eine schematische Übersicht über die Anordnung der Histokompatibilitätskomplexe auf dem 17. Chromosom der Maus und dem 6. Chromosom des Menschen.

## 2. Chemische Struktur von H-2-Antigenen

Die Histokompatibilitätsantigene der Maus (H-2-Antigene) findet man auf nahezu allen Zellen der Maus, in höchsten Konzentrationen auf Lymphozyten<sup>[8]</sup>. Diese Substanzen zeichnen sich durch einen außergewöhnlich hohen, genetisch determinierten Polymorphismus aus. Unter Polymorphismus versteht man eine Variabilität in der Aminosäuresequenz. Bei den H-2-Antigenen handelt es sich um integrale Membranglykoproteine, die aus mindestens zwei Polypeptidketten bestehen: Einer schweren Kette mit einem Molekulargewicht von etwa 46 000<sup>[9]</sup> und einer leichten Kette mit einem Molekulargewicht von 12 000. Die schwere Kette, ein Glykopolypeptid, ist für die antigenen Eigenschaften verantwortlich. Die leichte Kette, ein Polypeptid, entspricht dem aus menschlichem Urin isolierten  $\beta_2$ -Mikroglobulin<sup>[10]</sup>. Sie ist bei der Maus und beim Menschen nicht-kovalent mit der schweren Kette der Histokompatibilitätsantigene assoziiert<sup>[11-13]</sup>.

### 2.1. Molekülstruktur von H-2-Antigenen in Lösung

Die Isolierung von H-2-Antigenen ist durch folgende Eigenschaften erschwert: 1. Den genetisch determinierten Polymorphismus, 2. die niedrigen Konzentrationen in der äußeren

[\*] Prof. Dr. R. Henning  
Abteilung Biochemie II der Universität  
Oberer Eselsberg, D-7900 Ulm

Zellmembran und 3. die Unlöslichkeit in wässrigen Medien. Als Ausgangsmaterial dienen entweder normale Lymphocyten der Maus oder Mäuse-Leukämiezellen, die permanent in Grewekultur gehalten werden können. Aus diesen Zellen können H-2-Antigene nahezu ohne Verlust der antigenen Eigenschaften mit Detergentien extrahiert werden (z. B. Nonidet P 40, Natriumdesoxycholat<sup>[14]</sup>). Es ist auch möglich, wasserlösliche, immunologisch vollständig aktive Fragmente von H-2-Antigenen durch kontrollierte proteolytische Verdauung von Zelloberflächen mit der pflanzlichen Protease Papain herzustellen<sup>[15]</sup>.

Wegen der geringen Konzentrationen werden H-2-Antigene bevorzugt nach radioaktiver Markierung isoliert. Dazu geht man von Zellen aus, die mit <sup>125</sup>I oder mit <sup>3</sup>H- oder <sup>14</sup>C-Aminosäuren markiert wurden. Aus den Detergents- oder Papainextrakten der so markierten Zellen können H-2-Antigene durch Immunpräzipitation isoliert und durch SDS-Polyacrylamid-

Molekulargewichtsbestimmung durch Gelchromatographie oder Ultrazentrifugation mit einem biologischen Test, dem Cytotoxizitätstest, in biologisch aktiver Form verfolgt werden (Tabelle 1). Aus den durch Gelchromatographie bestimmten Diffusionskonstanten und den in der Ultrazentrifuge gemessenen Sedimentationskoeffizienten wurde nach der Svedberg-Gleichung des Molekulargewicht von H-2-Antigenen in Detergentslösung zu 116000 berechnet. Nach SDS-Gelelektrophoretischer Bestimmung der Molekulargewichte der einzelnen Polypeptidketten kann unter der Annahme mindestens einer Disulfidbrücke zwischen den schweren Ketten ein Arbeitsmodell (Tabelle 1 und Abb. 2) für die Molekülstruktur von H-2-Antigenen aufgestellt werden<sup>[16]</sup>: In Detergentslösung liegen zwei durch mindestens eine Disulfidbrücke verbundene schwere Ketten und zwei nicht-kovalent assoziierte leichten Ketten vor. Das Papain-behandelte Molekül (H-2<sub>pap</sub>) enthält nur ein Fragment einer schweren Kette (F<sub>H</sub>) und einer leichten Kette.

Tabelle 1. Bestimmung des Molekulargewichts ( $M_r$ ) von denaturierten H-2-Antigenen durch SDS-Gelelektrophorese und von biologisch aktiven H-2-Antigenen in Detergents- oder Papainlösung durch Sephadex-Gelchromatographie („Gelfiltration“) und Ultrazentrifugation [16]. Abkürzungen:  $r$  = Stokes-Radius;  $D$  = Diffusionskoeffizient;  $S$  = Sedimentationskonstante; DOC = Na-Desoxycholat; SDS = Polyacrylamidgelelektrophorese in Na-Dodecylsulfat; red. = mit Mercaptoethanol reduziert; H-Kette, L-Kette,  $\beta_2$ ,  $F_H$  siehe Abb. 2.

Präparat	$M_r$	$r$ [Å]	Gelfiltration $D$ [ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ]	Ultrazentrifugation $S$
Detergents-gelöste H-2-Antigene (DOC) (H-2 <sub>det</sub> )	116000 [a]	47	$4.5 \cdot 10^{-7}$	5.9 S
H-Kette (unreduziert, SDS)	92000			
H-Kette (reduziert, SDS)	46000			
L-Kette ( $\beta_2$ ) (red. + unreduziert, SDS)	12000			
2H + 2L (SDS)	116000			
Papain-gelöste H-2-Antigene (H-2 <sub>pap</sub> )	49000	31	$6.9 \cdot 10^{-7}$	3.7 S
H-Kette ( $F_H$ ) (red. + unreduziert, SDS)	39000			
L-Kette ( $\beta_2$ ) (red. + unreduziert, SDS)	12000			
1 $F_H$ + 1L	51000			

[a] Berechnet nach der Svedberg-Gleichung.

gelelektrophorese untersucht werden. Das Molekulargewicht der Polypeptidketten und die Art der Bindung zwischen den Ketten werden in diesem Elektrophoresesystem in An- oder Abwesenheit von Reduktionsmitteln bestimmt (Tabelle 1)<sup>[16]</sup>.

In Gegenwart von Reduktionsmitteln erscheinen bei der Gelelektrophorese von Detergents-gelöstem H-2-Antigen (H-2<sub>det</sub>) eine schwere Kette (H-Kette) mit einem Molekulargewicht von 46000 und eine leichte Kette (L-Kette) mit einem Molekulargewicht von 12000. In Abwesenheit von Reduktionsmitteln hat die schwere Kette auf dem SDS-Gel das doppelte Molekulargewicht (ca. 92000). Nach Reelektrophorese dieses Materials in Gegenwart von Reduktionsmitteln (z. B. Mercaptoethanol) findet man nur eine schwere Kette mit einem Molekulargewicht von 46000. Somit müssen die schweren Ketten von H-2-Antigenen in Detergentslösung durch mindestens eine Disulfidbrücke zu einem Dimer verbunden sein. Die leichten Ketten sind weder mit der schweren Kette noch miteinander kovalent verknüpft. Antigene, die durch Papain in Lösung gebracht wurden (H-2<sub>pap</sub>), enthalten nur ein Fragment (F<sub>H</sub>) der schweren Kette mit einem Molekulargewicht von 39000 und eine intakte leichte Kette. In Papain-gelöstem Material wurden keine Disulfidbrücken zwischen den Fragmenten der schweren Kette gefunden.

Die Molekulargewichte von H-2-Antigenen können auch unter nicht-denaturierenden Bedingungen bestimmt werden<sup>[16]</sup>. Unter diesen Bedingungen können die Antigene zur

Nahezu gleiche Ergebnisse gelten für die menschlichen HLA-Antigene.

## 2.2. Molekülstruktur und Orientierung von H-2-Antigenen auf der Zelloberfläche

Die biologischen Funktionen von H-2-Antigenen sind an deren Gegenwart auf der Zelloberfläche gebunden. Es ist daher außerordentlich wichtig zu wissen, ob das Strukturmodell für gelöstes H-2-Antigen gleichermaßen für an die Zelloberfläche gebundenes Antigen gilt. Um zu untersuchen, ob H-2-Antigene auf der Zelloberfläche ebenfalls als Dimere mit Disulfidbrücken vorkommen, wurden intakte Zellen vor der Detergentsextraktion mit Iodacetamid behandelt. Dadurch werden freie SH-Gruppen bereits auf der Oberfläche der intakten Zelle blockiert<sup>[16]</sup>. Untersucht man Immunpräzipitate von derart alkylierten Zellen durch SDS-Gelelektrophorese, so zeigt sich, daß die schweren Ketten von H-2-Antigenen selbst in Abwesenheit von Reduktionsmitteln vorwiegend als Monomere vorliegen, während, wie bereits erwähnt, die schweren Ketten von H-2-Antigenen aus nicht-alkylierten Zellen als Dimere mit Disulfidbrücken gefunden werden. Das deutet darauf hin, daß die Disulfidbrücke während oder nach der Detergentsextraktion des Antigens aus der Zellmembran entsteht (Abb. 2). Möglicherweise bilden sich in der Membran bereits nicht-kovalent assoziierte Dimere. Milde Oxidationsmittel können

die Bildung von Disulfidbrücken zwischen schweren Ketten auslösen und so die Konzentration von membrangebundenen, disulfidverknüpften Dimeren erhöhen<sup>[16]</sup>. Es entstehen jedoch anscheinend keine Dimerhybride, z. B. zwischen den Produkten des K- und des D-Locus oder zwischen K- und D-Antigenen verschiedener H-2-Typen (Haplotypen)<sup>[17, 18]</sup>.

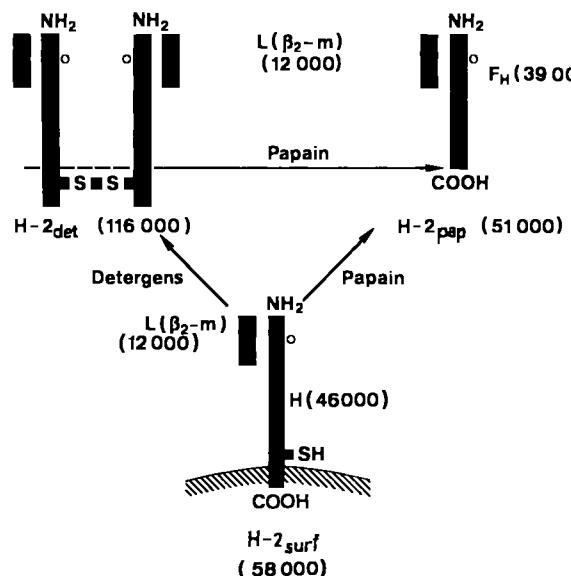


Abb. 2. Molekülbau der H-2-Antigene auf der Zelloberfläche und in Lösung. Die H-2-Antigene werden von der Zelloberfläche mit nicht-ionischen Detergents oder mit der Protease Papain in Lösung gebracht. Abkürzungen: L( $\beta_2$ -m) = leichte Kette (entspricht dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin); H = schwere Kette; H-2<sub>pap</sub> = wasserlösliches Fragment nach Papainbehandlung; F<sub>H</sub> = Papainfragment der H-Kette; H-2<sub>det</sub> = Detergents-gelöstes H-2-Antigen; H-2<sub>surf</sub> = H-2-Antigen auf der Zelloberfläche; o = Kohlenhydrat. In Klammern sind die Molekulargewichte angegeben (nach [16]).

Sehr wichtig zum Verständnis der biologischen Funktion ist außerdem die Orientierung der Peptidketten von H-2-Antigenen auf der Zellmembran. Dazu wird die N-terminale Aminosäuresequenz der schweren Ketten des Detergents-gelösten H-2-Antigens mit derjenigen des F<sub>H</sub>-Fragments von Papain-ge spaltenem Material verglichen. Mit dieser Methode läßt sich nachweisen, welches Ende der schweren Kette nach außen zeigt und welches Ende mit der Zellmembran assoziiert ist. Radiochemische Sequenzanalysen von schweren Ketten und deren Papain-Fragmenten zeigen, daß die Positionen für Tyrosin, Histidin und Arginin (Positionen 3, 6 bzw. 7) übereinstimmen<sup>[16]</sup>. Daraus darf man schließen, daß der C-Terminus von H-2-Antigenen mit der Membran assoziiert ist und bei der Papain-Behandlung abgespalten wird, so daß am abgespaltenen Fragment ein neuer C-Terminus entsteht. Dementsprechend ist der N-Terminus nach außen gerichtet. Diese Anordnung gleicht der Orientierung der weniger vollständig untersuchten Membran-Glykoproteine, z. B. Glykophorin oder Immunglobulin<sup>[19-21]</sup>. Abbildung 2 zeigt die gegenwärtigen Vorstellungen über die molekulare Anatomie der H-2-Antigene.

### 2.3. Proteinchemische Vergleiche von H-2K- und H-2D-Genprodukt

Nach Ergebnissen immungenetischer Analysen ist anzunehmen, daß die H-2K- und H-2D-Gene durch Gen-Duplikation entstanden sind<sup>[7]</sup>. Kann man ein Molekül nur an seinen

physikalischen oder chemischen Eigenschaften sicher als K- oder D-Antigen erkennen? Folgende Möglichkeiten sind denkbar, um Unterschiede zwischen beiden Genprodukt-Typen feststellen zu können: 1. Bestimmung des Molekulargewichts der schweren Ketten, 2. vergleichende Peptidanalysen nach enzymatischer Spaltung, 3. Aminosäuresequenzanalysen.

Ein Vergleich des Laufverhaltens der schweren Ketten der K- oder D-Antigene in der SDS-Polyacrylamidelektrophorese ergab geringfügige, aber exakt reproduzierbare Unterschiede. Übertragen in eine Molekulargewichtsskala machen diese geringen Unterschiede nie mehr als ca. 5 % des Molekulargewichts aus<sup>[22]</sup>. Diese Abweichungen lassen sich aber nicht sicher als Molekulargewichtsunterschiede deuten, sondern könnten auch durch unterschiedliche Bindungskapazitäten für SDS – bedingt durch ungleiche Kohlenhydratstrukturen – erklärt werden. Das Fragmentierungsverhalten schwerer Ketten bei der Behandlung mit Clostidiopeptidase, Papain oder chemischen Methoden zeigt charakteristische Eigenschaften für jedes Genprodukt; es lassen sich aber auch hier keine allgemeingültigen Regeln ableiten, die als Erkennungskriterium für ein K- oder D-Genprodukt dienen können<sup>[22]</sup>.

Vergleichende Peptidanalysen tryptischer Fragmente verschiedener H-2-Antigene auf Ionenaustauschersäulen<sup>[14]</sup> oder bei der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie<sup>[22]</sup> kommen zu den gleichen Ergebnissen. Diese Peptidanalysen zeigen den bei einer Gen-Duplikation zu erwartenden hohen Grad an Gemeinsamkeiten; die Unterschiede sind aber nicht für K- oder D-Genprodukte charakteristisch. Die Ergebnisse der Aminosäuresequenzbestimmung sollen im folgenden ausführlich besprochen werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es bisher keine eindeutigen physikalischen oder chemischen Kriterien gibt, nach denen K- und D-Genprodukte generell voneinander unterschieden werden können.

Fundamentale Fragen der molekularen Prinzipien des Polymorphismus, der evolutionären Zusammenhänge zwischen Histokompatibilitätsantigenen und Immunglobulinen und letzten Endes der molekularbiologischen Aussagen zur Funktion können ausschließlich über die Aufklärung der Primärstruktur der antigenen Einheiten von H-2-Antigenen beantwortet werden.

Die Aminosäuresequenz des menschlichen  $\beta_2$ -Mikroglobulins ist vollständig aufgeklärt<sup>[23, 24]</sup>. Dieses Molekül besitzt sehr auffällige Ähnlichkeiten mit konstanten Regionen von schweren und leichten Ketten der Immunglobuline, und dieser Befund setzte Spekulationen über einen gemeinsamen evolutionären Ursprung von Histokompatibilitätsantigenen und Immunglobulinen erneut in Gang (vgl. Abschnitt 1)<sup>[25, 26]</sup>.  $\beta_2$ -Mikroglobulin ist nur Spezies-spezifisch, d. h. bei Individuen der gleichen Tierspezies wurden keine Unterschiede gefunden. Die Variation zwischen den Spezies ist nicht sehr ausgeprägt. Wenn man die Aminosäuresequenz des  $\beta_2$ -Mikroglobulins von Kaninchen, Hund, Maus und Meerschweinchen mit der des Menschen vergleicht, sieht man nur wenige Unterschiede<sup>[27]</sup>. Diese Aminosäuresequenzen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Der Polymorphismus und damit die antigenen Eigenschaften von H-2-Antigenen sind auf die schweren Ketten beschränkt. Die niedrigen Konzentrationen sowie die hydrophobe Natur von K- und D-Antigenen erforderten eine neue Strategie zur Isolierung und Sequenzanalyse. Konventionelle Techniken des Edman-Abbaus zur Aufklärung der Primärstruktur können nicht direkt angewendet werden, sondern

Tabelle 2. Vergleich partieller N-terminaler Aminosäuresequenzen von H-2-Antigenen (Maus) [16, 22, 29–32, 74], HLA-Antigenen (Mensch) [33–35] und  $\beta_2$ -Mikroglobulinen (Mensch, Kaninchen, Hund, Maus und Meerschweinchen) [23, 24, 70–73]. X: Aminosäuren, die an dieser Stelle in anderen H-2-Haplotypen identifiziert wurden, können an dieser Stelle nicht gefunden werden. □: Diese Positionen kommen gemeinsam bei H-2- und/oder HLA-Antigenen und/oder  $\beta_2$ -Mikroglobulinen vor.

				1				5				10				15			
H-2	K <sup>b</sup>	X	Pro	His	—	Leu	Arg	Tyr	Phe	Val	Thr	Ala	Val	—	Arg	Pro			
	K <sup>d</sup>	Met	X	His	—	X	Arg	Tyr	X	X	Thr	—	X	—	Arg	Pro			
	K <sup>k</sup>	Met	Pro	His	—	Leu	Arg	Tyr	Phe	His	—	Ala	Val	—	Ile	Pro			
	D <sup>b</sup>	—	Pro	—	—	—	Arg	Tyr	—	—	Ala	Ala	Val	—	Arg	Pro			
	D <sup>d</sup>	Met	X	His	—	Leu	Arg	Tyr	Phe	Val	Thr	Ala	Val	Thr	Arg	Pro			
HLA	A2	Gly	Ser	—	Ser	Met	Arg	Tyr	Phe	Phe	Thr	Ser	Val	Ser	Arg	Pro			
	A1,2	—	Ser	—	Ser	Met	Arg	Tyr	Phe	Phe	Thr	Ser	Val	Ala	Arg	Pro			
	B7	Gly	Ser	His	Ser	Met	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Thr	Ser	Val	Ser	Arg	Pro			
	B8,13	—	Ser	—	Ser	Met	Arg	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Val	Ser	Arg	Pro			
$\beta_2$ -Mikroglobulin																			
Mensch	Ile	Gln	Arg	Thr	Pro	Lys	Ile	Gln	Val	Tyr	Ser	Arg	His	Pro	Ala				
Kaninchen	Val	Gln	Arg	Ala	Pro	Asn	Val	Gln	Val	Tyr	Ser	Arg	His	Pro	Ala				
Hund	Val	Gln	His	Pro	Pro	Lys	Ile	Gln	Val	Tyr	Ser	Arg	His	Pro	Ala				
Maus	Ile	Gln	Lys	Thr	Pro	Gln	Ile	Gln	Val	Tyr	Ser	Arg	His	Pro	Pro				
Meerschw.	Val	Leu	His	Ala	Pro	Glx	Val	Gln	Val	Tyr	—	—	His	Pro	Ala				
				20				25				30							
—	Leu	—	—	Pro	Arg	Tyr	—	—	—	Leu	Tyr	—	—	—	—				
—	X	—	—	Pro	Arg	Phe	—	—	—	—	Tyr	—	—	—	—				
—	Leu	—	Lys	Pro	Phe	Ala	—	—	—	—	Tyr	—	—	—	—				
—	Leu	—	—	Pro	Arg	Tyr	—	—	—	—	Tyr	—	—	—	—				
—	—	—	—	Pro	Arg	Tyr	—	—	—	—	Tyr	—	—	—	—				
Gly	—	Gly	Glu	—	—	Phe	Ile	Ala	Val	—	—	—	—	—	—				
Gly	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—				
Gly	Arg	Gly	Glu	Pro	Pro	Phe	Ile	Ala	Val	Gly	Tyr	Val	Asp	Glu	Thr				
Gly	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—				
Glu	Asn	Gly	Lys	Ser	Asn	Phe	Leu	Asn	Cys	Tyr	Val	Ser	Gly	Phe	His				
Glu	Asn	Gly	Lys	Asp	Asn	Phe	Leu	Asn	Cys	Tyr	Val	Ser	Gly	Phe	His				
Glx	Asx	Gly	Lys	Pro	Asx	Phe	Leu	Asx	Cys	Tyr	Val	Ser	Gly	Phe	His				
Glu	Asn	Gly	Lys	Pro	Asn	Ile	Leu	Asn	Cys	Tyr	Val	Thr	Glu	Phe	His				
Glu	Asn	Gly	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—				

es müssen radiochemische Sequenztechniken benutzt werden<sup>[28]</sup>. Zur Isolierung von K- und D-Antigenen wurde die Technik der indirekten Immunpräzipitation mit monospezifischen H-2-Antisera benutzt. Die Methodik sei hier kurz beschrieben: H-2-Antigene von Mauslymphomzellen werden individuell mit <sup>3</sup>H- oder <sup>14</sup>C-markierten Aminosäuren in der Gewebekultur markiert. Die Zellen werden anschließend mit dem Detergens Nonidet P 40 extrahiert. Die antigenen Eigenschaften von H-2-Antigenen werden von nicht-ionischen Detergentien nicht beeinträchtigt; die H-2-Antigene können deswegen mit einem monospezifischen Maus-anti-H-2-Antiserum und anschließender Zugabe von Ziegen-anti-Maus-Immunglobulin aus dem Gemisch der markierten Proteine präzipitiert und durch präparative SDS-Polyacrylamideelektrophorese isoliert werden. Das so erhaltene Material kann in einem automatischen Proteinsequenator dem sequentiellen Edman-Abbau nach Zugabe eines Carrierproteins unterworfen werden. Die resultierenden Phenylthiohydantoinaminozäuren lassen sich durch die üblichen Methoden der Dünnschichtchromatographie oder der Hochdruckflüssigkeitschromatographie identifizieren (Vor- und Nachteile dieser Methodik siehe<sup>[22]</sup>). Die N-terminalen Aminosäuresequenzen von H-2-Antigenen und von HLA-Antigenen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Alle fünf in der Tabelle aufgeführten H-2-Genprodukte besitzen weitgehend homologe N-terminalen Aminosäuresequenzen innerhalb der ersten 30 Positionen. Diese Beobachtungen bestätigen sehr eindrucksvoll die von Klein und Shreffler 1971

aufgestellte Theorie<sup>[7]</sup>, daß die K- und D-Loci durch Gen-Duplikation entstanden sind. Die N-terminalen Sequenzen sind derart homolog, daß der zu erwartende Polymorphismus nur in wenigen Positionen positiv erkannt werden kann. Zusätzlich zu den positiven Sequenzunterschieden konnte die Abwesenheit bestimmter Aminosäuren in einzelnen Genprodukten festgestellt werden (in Tabelle 2 mit X markierte Positionen). Die Abwesenheit von Methionin in Position 1 in K<sup>b</sup> und von Prolin, Valin und Valin in den Positionen 2, 9 bzw. 12 in K<sup>d</sup> sind Beispiele für derartige negative Unterschiede. Wegen der engen Grenzen der Methodik konnten die Aminosäuren in diesen Positionen noch nicht identifiziert werden.

Die Frage nach der Strukturhomologie zwischen H-2- und HLA-Antigenen kann positiv beantwortet werden. Von zwei Laboratorien<sup>[33–35]</sup> wurden N-terminalen Aminosäuresequenzen mehrerer HLA-Genprodukte nahezu gleichzeitig mitgeteilt. Die Sequenzanalysen an HLA-Antigenen wurden mit konventionellen Edman-Abbaumethoden durchgeführt. Legt man alle bekannten N-terminalen Sequenzen von H-2- und HLA-Antigenen untereinander (Tabelle 2), so sieht man, daß mindestens in 13 der ersten 27 Positionen übereinstimmende Aminosäuren zu finden sind. Die Aminosäuren in den Positionen 6, 7, 15, 20 und 27 sind in allen Fällen gleich. In den Positionen 8, 10, 12 und 14 ist die Variation gering. Die Produkte beider Gen-Loci eines Systems (z. B. des H-2-Systems) sind einander wesentlich ähnlicher als den Produkten der entsprechenden Loci der anderen Spezies. Daraus kann

man schließen, daß die Gen-Duplikation in den beiden Spezies Maus und Mensch unabhängig voneinander und nach der Entwicklung der Spezies stattgefunden hat. In Tabelle 2 ist zusätzlich erkennbar, daß H-2- und HLA-Antigene einige Positionen gemeinsam mit  $\beta_2$ -Mikroglobulinen verschiedener Spezies besitzen. Obwohl anzunehmen ist, daß  $\beta_2$ -Mikroglobuline evolutionär mit schweren Ketten von Histokompatibilitätsantigenen verwandt sind, lassen die in Tabelle 2 gezeigten Sequenzhomologien nur sehr vage Vermutungen über den Grad dieser Verwandtschaft zu.

Die seit langem vermuteten Strukturhomologien zwischen Immunglobulinen und Histokompatibilitätsantigenen konnten in jüngster Zeit wahrscheinlich gemacht werden. Es ist gelungen, Aminosäuresequenzen von internen Peptiden der schweren Kette von HLA-Antigenen zu untersuchen<sup>[35]</sup>. *Strominger* et al. fanden in Nachbarschaft zum dritten Cysteinrest der schweren Kette von HLA-Antigenen (siehe Abb. 3) ausgedehnte Sequenzhomologien zu Immunglobulinen und konnten damit die seit langem diskutierten Theorien über die evolutionäre und damit strukturelle Verwandtschaft zwischen den beiden Systemen beweisen<sup>[25, 26]</sup>. Auch die von dieser Arbeitsgruppe beschriebenen Positionen von internen Disulfidbrücken legen eine strukturelle und damit zugleich eine evolutionäre Verwandtschaft zwischen Histokompatibilitätsantigenen und Immunglobulinen nahe (Abb. 3).

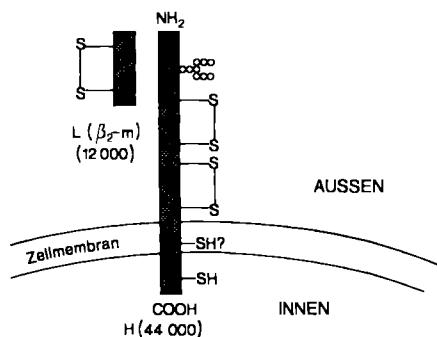


Abb. 3. Modell eines HLA-Antigens auf der Zelloberfläche (modifiziert nach [35]). Dieses Modell deutet die Position der Disulfidbrücken in der schweren Kette der HLA-Antigene an, die ähnlich wie bei Immunglobulinen in einer „Domänenstruktur“ angeordnet sind. Die Bindungsstelle für  $\beta_2$ -Mikroglobulin im N-terminalen Bereich ist eine theoretische Annahme und beruht nicht auf experimentellen Grundlagen.

Die Annahme der evolutionären Verwandtschaft von H-Antigenen und Immunglobulinen kann auch durch weitere, jüngst bekannt gewordene Sequenzhomologien zwischen Immunglobulin, C-reaktivem Protein und Komponenten des Komplementsystems gestützt werden<sup>[36, 37]</sup>. Alle diese Proteine sind im weiteren Sinne dem Immunsystem zuzuordnen. Phylogenetische Studien der einzelnen Komponenten legen nahe, daß die Histokompatibilitätsantigene am frühesten im evolutionären Stammbaum auftauchen. Biologisch gesicherte Anzeichen für Transplantationsimmunität konnten vor kurzem auf Korallenriffen gezeigt werden<sup>[38]</sup>. Transplantierte Korallenriffteile werden abgestoßen, bei wiederholter Transplantation sogar in wesentlich kürzerer Zeit (Immunität).

Die Anwendung der Radiosequenzierungstechnik auf H-2-Antigene, die durch hochspezifische Immunpräzipitationstechniken gewonnen wurden, brachte in kurzer Zeit eine Reihe von grundlegenden Erkenntnissen. Daneben wurde eine völlig neuartige Methodologie zur Untersuchung der Primärstruktur von Membranproteinen entwickelt, die bisher keiner Struk-

turanalyse zugänglich waren. Dank der Methode der Immunpräzipitationsisolierung stehen jetzt alle Zellmembranantigene, gegen die spezifische Antikörper erzeugt werden können, für eine ausführliche Strukturuntersuchung zur Verfügung. Im menschlichen HLA-System konnten bereits Strukturhomologien zwischen Immunglobulinen und Histokompatibilitätsantigenen gezeigt werden<sup>[35]</sup>.

### 3. Histokompatibilitätsantigene als Erkennungsmerkmale in der Immunabwehr

Die Übertragung von Geweben zwischen Individuen scheitert an den Histokompatibilitäts- oder Transplantationsantigenen. Sie bilden die biologische Barriere für Gewebetransplantate. Besondere, mit der Eliminierung fremder Zellen betraute Immunabwehrzellen (T-Lymphocyten, die sich in „Killer“-Zellen umwandeln) zerstören fremde Zellen; dies ist ein Prinzip der zellulären Immunabwehr. Da Gewebetransplantationen in der Evolution keine Rolle spielen, müssen diese sehr potennten Abwehrmechanismen eine wichtige Funktion innerhalb eines individuellen Organismus erfüllen<sup>[25]</sup>. Transplantationsantigene scheinen wichtige Merkmale für die Unterscheidung abartiger Zellen von den eigenen, normalen Zellen zu sein. Nach neuesten Befunden sind H-2-Antigene an der Erkennung und Zerstörung abnormaler Zellen durch cytotoxische Lymphocyten beteiligt. Als abnormale Zellen müssen z. B. virusinfizierte Zellen, chemisch modifizierte Zellen und Tumorzellen erkannt und eliminiert werden.

### 3.1. Histokompatibilitätsantigene werden zur Eliminierung „fremder“ Zellen gebraucht

Die Wirksamkeit der gegen abnormale Zellen erzeugten cytotoxischen Zellen scheint davon abzuhängen, ob ein ursprünglich auf den zur Immunisierung benutzten Zellen vorhandenes H-2-Antigen auch auf der Zielzelle vorhanden ist<sup>[39]</sup>. Zur Erläuterung dieses komplexen Vorganges möge folgendes Modellexperiment dienen: Eine Inzuchtmaus vom Typ H-2<sup>b</sup> (die Histokompatibilitätsantigene vom Typ H-2<sup>b</sup> enthält) wird mit dem Virus X infiziert. In dem Tier entwickeln sich gegen Virus-X-infizierte Zellen gerichtete cytotoxische Lymphocyten, deren lytische Aktivität in einem Cytotoxizitätstest nachgewiesen werden kann; dabei verfolgt man den <sup>51</sup>Cr-Austritt aus <sup>51</sup>Cr-markierten Zielzellen. Im vorliegenden Experiment werden nur solche <sup>51</sup>Cr-markierte Zielzellen erkannt und abgetötet, die 1. mit dem gleichen Virus X infiziert sind und 2. die gleichen Histokompatibilitätsantigene vom Typ H-2<sup>b</sup> wie die Virus-X-infizierten Zellen der Inzuchtmaus besitzen<sup>[39]</sup>. Das beschriebene Modellexperiment wurde an einer Vielzahl von Mäusestämmen und Mauszelllinien verschiedener H-2-Typen mit einer Reihe von Viren getestet (Ektromelie<sup>[40]</sup>, Lymphocytäre Choriomeningitis<sup>[41]</sup>, Sendai<sup>[42]</sup>, SV-40<sup>[43]</sup>, Tollwut<sup>[39]</sup>, Maussarkom<sup>[44]</sup>, Friends Mäuseleukämie<sup>[45]</sup>, Vacciniavirus<sup>[46]</sup>). In den meisten Fällen wurde eine deutliche Abhängigkeit vom Typ der H-2-Antigene gefunden („H-2-restriction“). Gleichartige Befunde konnten durch chemische Modifizierung von Zelloberflächen mit Trinitrobenzolsulfosäure (TNB)<sup>[47]</sup> erhoben werden. Die universale Bedeutung dieser Beobachtungen wurde weiterhin durch gleichartige Befunde an Tumorzellen unterstrichen, auf denen zusätzlich Tumvorvirus-codierte Proteine wirksam sind<sup>[48-50]</sup>.

Diese Beobachtungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Wenn die cytotoxische Zelle und die Zielzelle syngen sind, d. h. die gleichen H-2-Antigene auf der Oberfläche tragen, wird zur Erkennung und Zerstörung der Zielzelle ein zusätzliches Antigen (Neoantigen) benötigt, z. B. ein Virusantigen, ein chemisch modifiziertes Protein oder ein Tumorantigen, eines der schwachen H-Antigene<sup>[51, 52]</sup> oder das Produkt des Y-Gens<sup>[53]</sup>.
2. Sind die Histokompatibilitätsantigene des cytotoxischen Lymphocyt und der Zielzelle verschieden (allogene Situation), so wird zur Erkennung und Zerstörung der Zielzelle kein zusätzliches Antigen benötigt. Diese Situation entspricht einer Gewebetransplantation.
3. Cytotoxische Lymphocyt müssen während des Immunisierungsvorganges mit mindestens einem H-2-Genprodukt (K oder D) der Zielzelle konfrontiert worden sein.
4. Gegen die H-2-Antigene der Zielzelle gerichtete anti-H-2-Seren, die auf die Zielzelle vor dem Kontakt mit den cytotoxischen Lymphocyt aufgebracht werden, blockieren die Aktivität der cytotoxischen Lymphocyt: Die Zielzelle wird nicht zerstört<sup>[57]</sup>.
5. Mutationen in einem H-2-Antigen, das den cytotoxischen Lymphocyt bekannt und für deren Wirksamkeit notwendig ist, verhindern jegliche cytotoxische Aktivität: Die Zielzelle wird nicht zerstört.

Eine stark vereinfachende Hypothese zur Erklärung dieser Beobachtungen wäre, daß alle direkten, von den cytotoxischen Lymphocyt abhängigen Vorgänge der Zellzerstörung nur mit Hilfe von H-2-Antigenen ablaufen. Die Reaktionsmechanismen in der syngenen wie in der allogenen Situation scheinen gleich zu sein. Im allogenen Fall wird nur das fremde H-2-Antigen und kein (zusätzliches) Neoantigen zur Erkennung gebraucht. Man könnte daraus ableiten, daß bei cytotoxischen Reaktionen im syngenen Fall ein durch das Neoantigen verändertes H-2-Antigen („altered self“)<sup>[39]</sup> und im allogenen Fall ein von vornherein verschiedenes H-2-Antigen zur Erkennung fremder Zellen gebraucht wird.

### 3.2. „Killer“-Zellen benötigen einen oder zwei Rezeptoren zur Zerstörung von Zielzellen

Lawrence hat bereits 1959 eine Hypothese aufgestellt, nach der abnormale Zellen innerhalb eines Individuums in einer cytotoxischen Reaktion nur dann zerstört werden können, wenn ein Antigen X zusätzlich zu einem bekannten Antigen erkannt wird<sup>[54]</sup>. Dieses „Selbst“-X-Antigen sollte einen Molekülkomplex bilden und entspricht im Prinzip dem, was viel später als Grundlage der T-B-Zell-Kollaboration beschrieben wurde<sup>[55, 56]</sup>.

Als X-Antigen können nach den jetzigen experimentellen Erfahrungen viruscodierte Antigene sowie Tumortransplantationsantigene (siehe Abb. 6 und 7) wirken und getrennt von oder gemeinsam mit H-Antigenen in Form von „Antigenhybriden“ als Erkennungsmerkmale dienen.

Zur Erklärung dieser Vorgänge werden gegenwärtig zwei Hypothesen diskutiert. Wie können cytotoxische Lymphocyt in einer allogenen Situation nur ein Antigen (das Aloantigen) und in einer syngenen Situation das syngene H-2-Antigen + Neoantigen erkennen? In der syngenen Situation müßte man annehmen, daß der cytotoxische Lymphocyt zwei getrennte Rezeptoren besitzt (Zwei-Rezeptoren-Modell): Einen

Rezeptor, um das syngene H-2-Antigen zu erkennen und einen anderen Rezeptor, um mit dem Neoantigen in Verbindung zu treten. Es wäre aber auch möglich, daß die cytotoxische Zelle nur einen Rezeptor besitzt, der einen Molekülkomplex aus dem H-2-Antigen und dem Neoantigen (Antigenhybrid) oder ein verändertes H-Antigen („altered-self“) (Ein-Rezeptor-Modell) erkennt. Da in der allogenen Situation nur ein Rezeptor benötigt wird, muß man versuchen, eine Theorie aufzustellen, die auch in der syngenen Situation mit einem Rezeptor auskommt.

### 3.3. „Killer“-Zellen mit einem Rezeptor zur Zerstörung von Zielzellen

Im folgenden sollen kurz einige Experimente beschrieben werden, die ein Ein-Rezeptor-Modell stützen. Aus räumlichen Gründen, d. h. wegen der maximal möglichen Spannweite eines Proteineinrezeptors, muß man fordern, daß ein aus dem H-2-Antigen und dem Neoantigen bestehender Molekülkomplex erkannt wird. Die antigene Determinante ist entweder ein Produkt der Zelle, nämlich das H-2-Antigen, welches durch die physikalische oder chemische Wechselwirkung mit dem Neoantigen verändert wurde, oder es handelt sich um eine aus H-2-Antigen und Neoantigen gebildete Determinante (H-2-Antigen-Virusantigen-Hybridkomplex). Da die H-2-Antigene in diesem Fall noch mit den entsprechenden monospezifischen H-2-Antiseren reagieren und die cytotoxische Reaktion dadurch blockiert werden kann, muß man annehmen, daß die serologischen Eigenschaften der H-2-Antigene unverändert geblieben sind. Es kann sich also nicht um tiefgreifende chemische Veränderungen handeln, sondern um geringfügige Veränderungen, die die antigenen Determinanten nicht beeinflussen. Chemische Veränderungen sind unwahrscheinlich, weil bereits einfache Mutationen im H-2-Antigen die cytotoxische Reaktion vollständig verhindern<sup>[57]</sup>. In jüngster Zeit mitgeteilte Versuche, bei denen das Neoantigen von außen in Form eines inaktivierten Sendaivirus aufgebracht wurde<sup>[58]</sup>, schließen eine direkte chemische Veränderung des H-2-Antigens durch das Neoantigen ebenfalls weitgehend aus.

Molekülassoziationen auf der Zelloberfläche können mit der einfachen Versuchsanordnung des „Cocapping“ untersucht werden (siehe<sup>[59]</sup> sowie Abb. 4 und 5). Zu diesem Zweck werden Zelloberflächenantigene mit einem spezifischen, gegen diese Antigene gerichteten und an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörper markiert. Nach einigen Minuten bilden sich durch passive Diffusion kleine Mikroaggregate auf der Zelloberfläche („Patching“). Inkubiert man die Zellen für weitere 15–30 min bei 37°C, so werden die kleinen Fluoreszenz-markierten Aggregate langsam auf einem Pol der Zelle in einem Käppchen zusammengezogen („Capping“). Will man nun prüfen, ob ein anderes Molekül bei diesem Vorgang mitbewegt wurde, so muß man einen zweiten, gegen dieses Molekül gerichteten Fluoreszenz-markierten Antikörper aufbringen. Entweder ist nach dem „Capping“ des ersten Antigens das zweite Antigen noch diffus auf der Zelloberfläche verteilt, oder es liegt am gleichen Pol der Zelle wie das erste Antigen vor. Derartige simultane Beobachtungen werden dadurch ermöglicht, daß beide Antikörper mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind, die durch geeignete Wahl von Sperrfiltern und Anregungsfrequenzen im ultravioletten Licht unterschieden werden können (Abb. 4).

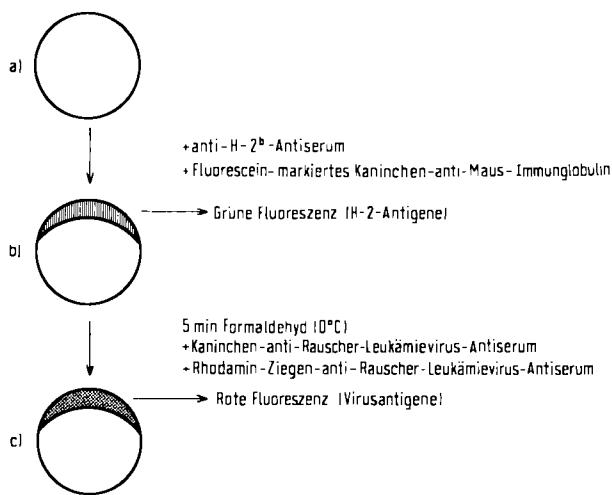


Abb. 4. Versuchsschema zur Induktion des „Cocapping“ von H-2-Antigenen und Leukämievirusantigenen auf Mäuseleukämiezellen. a) Leukämievirusinfizierte Mauslymphomzelle (H-2<sup>b</sup>); b) H-2-Antigene an einem Pol der Zelle nach „Capping“; c) Virusantigene in gleicher Lokalisation wie H-2-Antigene nach „Cocapping“.

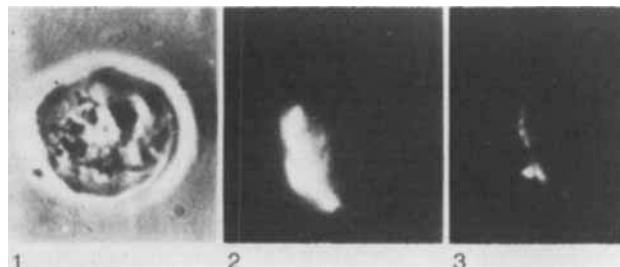


Abb. 5. „Cocapping“ von H-2-Antigenen und Leukämievirusantigenen (siehe dazu Abb. 4). 1. Phasenkontrastaufnahme einer Mäuseleukämiezelle (EL 4); 2. „Capping“ von H-2-Antigenen (durch Immunfluoreszenz sichtbar gemacht (Fluorescein)); 3. „Cocapping“ von Leukämievirusantigenen (durch Rhodamin sichtbar gemacht).

Mit dieser Versuchsanordnung wurde nun folgende Frage untersucht: Sammeln sich Virusantigene, z. B. das Mäuseleukämievirusglykoprotein gp 69/71, nach „Capping“ von H-2-Antigenen auf Mauslymphomzellen vom Typ H-2<sup>b</sup> (z. B. EL-4-Zellen) in dem aus H-2-Antigenen gebildeten Käppchen, oder werden sie diffus über die Zelloberfläche verteilt? In nahezu

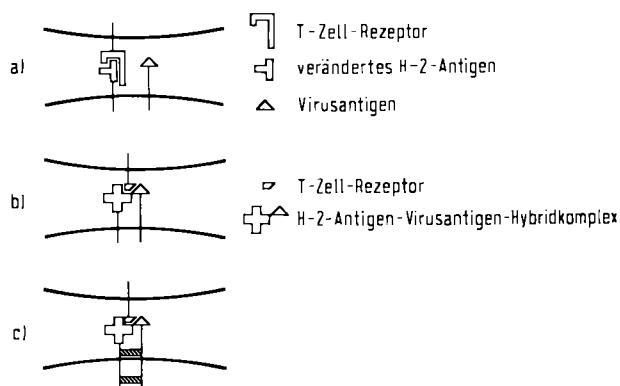


Abb. 6. Ein-Rezeptor-Modelle zur Immunüberwachung von virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen durch cytotoxische Lymphozyten. Darstellung der Beteiligung von Histoinkompatibilitätsantigenen. a) Cytotoxische Lymphozyten (T-Zellen, „Killer“-Zellen) besitzen einen Rezeptor, der ein durch das Neoantigen verändertes („altered-self“) H-2-Antigen erkennt. b) Ein T-Zell-Rezeptor erkennt ein durch Proteinwechselwirkungen gebildetes Hybrid aus H-2-Antigen und Virusantigen. c) Wie b), jedoch sind zusätzlich über oder unter der Zelloberfläche liegende Proteine erforderlich.

jedem Falle konnte man beobachten, daß die Virusantigene im gleichen Käppchen wie die H-2-Antigene konzentriert werden<sup>[48]</sup>. Das bedeutet: „Capping“ von H-2-Antigenen verursacht „Cocapping“ eines Virusantigens. Ein Beispiel ist in Abbildung 5 dargestellt. Ähnliche Aussagen wurden mit einer anderen, ebenfalls serologischen Methode, der „Lysostrip“-Technik<sup>[60, 61]</sup>, gewonnen<sup>[62]</sup>. Obwohl diese Ergebnisse keinesfalls als direkter Beweis für die Bildung eines Antigen-Virusantigen-Hybridkomplexes angesehen werden dürfen, so kann man doch als Arbeitshypothese davon ausgehen (Abb. 6).

Die chemischen und physikalischen Grundlagen für derartige Molekülassoziationen sind nicht einfach zu erklären. Müssen stöchiometrische Verhältnisse angenommen werden, d. h. Komplexe aus je einem H-2-Antigen und einem Virusantigen, oder sind größere, nicht-stöchiometrische Molekülassoziationen beider Antigene zu vermuten? Wenn nur 1:1-Komplexe auftreten, müßte eine spezifische, monovalente Bindungsstelle auf beiden Molekülen erwartet werden, die keine weitere Verknüpfung zuläßt. Wenn H-2-Antigene eine starke Tendenz zur Assoziation mit anderen Proteinen besäßen, müßten H-2-Antigene ständig mit den verschiedensten Zelloberflächenproteinen solche Molekülkomplexe bilden (z. B. mit den schwachen Histokompatibilitätsantigenen<sup>[51, 52]</sup> und dem Produkt des Y-Gens<sup>[53]</sup>). Bei einer multispezifischen Bindungskraft wäre das Ausmaß der Assoziation von H-2-Antigenen mit Virusantigenen, wie sie in den „Cocapping“- und „Lysostrip“-Versuchen beobachtet werden konnten, unwahrscheinlich hoch.

Die Ergebnisse der „Cocapping“- und „Lysostrip“-Experimente lassen sich aber auch mit speziellen Bindungseigenschaften der Virusproteine erklären. Virusproteine besitzen schon von ihrer Funktion her eine hohe Adsorptionskapazität an Zelloberflächenproteine und können so möglicherweise auch innerhalb der Zellmembran Molekülkomplexe mit H-2-Antigenen bilden. In diesem Falle wäre das nachgewiesene Ausmaß der Bildung von H-2-Antigen-Virusantigen-Hybridkomplexen für die cytotoxische Reaktion nicht notwendig. Im Hinblick auf den Mechanismus der cytotoxischen Reaktion wäre die Interpretation dieser Befunde jedoch richtig, da man weiß, daß H-2-Antigene mit anderen untersuchten Zelloberflächenantigenen keine derart ausgeprägten Molekülkomplexe bilden. H-2-Antigene bilden weder untereinander Molekülkomplexe noch sind sie mit Immunglobulinen oder Ia-Antigenen assoziiert, wie „Cocapping“- und „Lysostrip“-Versuche ergaben<sup>[17, 48, 61 – 63]</sup>.

Keines der derzeit bekannten Experimente erlaubt eine endgültige Entscheidung für ein Ein-Rezeptor-Modell zur Erklärung der Erkennung und Eliminierung abnormaler Zellen durch cytotoxische Lymphozyten.

### 3.4. „Killer“-Zellen mit zwei Rezeptoren zur Zerstörung von Zielzellen

In diesem Modell (Abb. 7a) besitzt der cytotoxische Lymphocyt einen Rezeptor, der spezifisch H-2-Antigene erkennt (H-2-Rezeptor), und einen Neoantigenrezeptor. Der H-2-Rezeptor kann nach ähnlichen Grundlagen wie die Produkte des H-2K- und des H-2D-Locus determiniert sein. Weiterhin müssen in jeder Maus ständig Zellen mit Rezeptoren für alle H-2-Antigen-Typen vorrätig sein. Diejenigen H-2-Rezeptoren, die syngene H-2-Antigene erkennen, müssen durch besondere Toleranzmechanismen selektiert werden, um feine Abwei-

chungen von der Norm erkennen zu können. Der Neoantigenrezeptor muß einen hohen Polymorphismus aufweisen, damit er eine Vielzahl verschiedener Antigene erkennen kann.

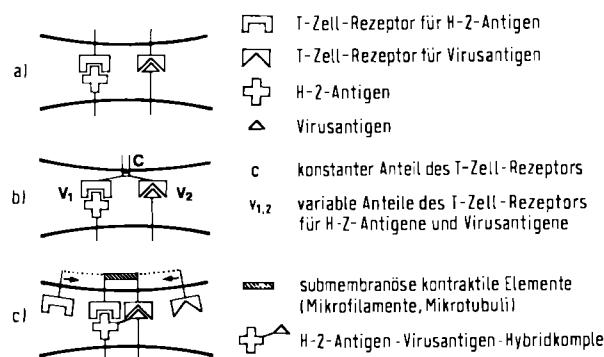


Abb. 7. Zwei-Rezeptoren-Modelle zur Immunüberwachung von virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen durch cytotoxische Lymphocyten. Darstellung der Beteiligung von Histokompatibilitätsantigenen. a) Cytotoxische Lymphocyten (T-Lymphocyten, T-Zellen, „Killer“-Zellen) besitzen zwei genetisch getrennt codierte Rezeptoren für H-2-Antigene und für Neoantigene. b) Cytotoxische Lymphocyten besitzen einen bivalenten, immunglobulinähnlichen Rezeptor mit zwei verschiedenen variablen Regionen und zwei möglicherweise gleichen konstanten Regionen, die durch Disulfidbrücken verknüpft sind. c) Zwei Rezeptoren wie in a); durch einen Hybridkomplex können beide Rezeptoren zusammengezogen werden und so Signale zur Zellteilung und Differenzierung von T-Lymphozyten auslösen.

Mit der Einführung eines zweiten Rezeptorsystems tritt ein Problem auf, das zunächst gegen ein Zwei-Rezeptoren-Modell zu sprechen scheint. Nach allen serologischen und zellimmunologischen Beobachtungen müssen beide Rezeptoren gemeinsam auf der cytotoxischen Zelle vorkommen. Das wurde durch simultane Anwendung von cytotoxischen T-Zellen bewiesen, die gegen das H-2-Antigen oder gegen das Neoantigen gerichtet sind. Durch Mischung dieser beiden Arten von T-Zellen konnte keine Cytotoxität gegen die gewünschte Zielzelle (mit einem bestimmten H-2-Antigen-Typ und einem bestimmten Neoantigen) erreicht werden. Bei einer clonalen Verteilung beider Rezeptoren muß gefordert werden, daß die statistisch zu erwartende Häufigkeit des gemeinsamen Vorkommens zweier polymorphen Rezeptoren auf einer Zelle so hoch ist, daß genügend Zellen zur Auslösung einer zellulären Immunantwort vorhanden sind. Da die Wahrscheinlichkeit des gleichzeitigen Vorkommens zweier stark heterogener Rezeptoren auf einer Zelle aus statistischen Gründen niedrig sein muß, ist ein Zwei-Rezeptoren-Modell dieser Form noch sehr problematisch.

Aus der Vielzahl dieser Argumente kann man leicht ableiten, wie verworren die Situation im Moment noch ist. Obwohl die serologischen und zellimmunologischen Experimente in letzter Zeit außerordentlich verfeinert worden sind und alle nur denkbaren Kombinationen der Experimente in Situationen überprüft wurden, die es erlauben sollten, eindeutige Entscheidungen für ein Ein- oder Zwei-Rezeptoren-Modell herbeizuführen, tritt die Diskussion momentan weitgehend auf der Stelle (Übersichten siehe<sup>[64]</sup>). Entscheidende Fortschritte können nur dann erwartet werden, wenn es gelingt, direkte Beweise entweder für die Bildung eines H-2-Antigen-Virusantigen-Hybridkomplexes und die damit am H-2-Antigen eintretenden Veränderungen zu erbringen, oder zwei Typen von T-Zell-Rezeptoren, von denen der eine wie gefordert H-2-Antigene und der andere Neoantigene erkennt, auf einer Zelle nachzuweisen. Von zwei Laboratorien werden zur Zeit sehr elegante und

erfolgversprechende Versuche durchgeführt, die zumindest einen T-Zell-Rezeptor auf molekularer Basis zu beschreiben scheinen<sup>[65, 66]</sup>. Es scheint sich um ein immunglobulinähnliches Molekül zu handeln, das aus zwei disulfidverknüpften Polypeptidketten ( $M_r = 72\,000$ ) besteht. Sie besitzen eine variable Region ( $V_H$ ), wie sie in normalen Immunglobulinen vorkommt (siehe Abb. 7b und 7c).

#### 4. Ausblick

Der Versuch, die Ergebnisse der chemischen Strukturanalysen und der Beobachtungen der biologischen Funktion von H-2-Antigenen zu einem Bild zu verschmelzen, muß leider noch scheitern. Beide Teilespekte dieses hochkomplizierten Erkennungssystems sind immer noch nicht ausreichend bekannt. Bei isolierter Betrachtung von Struktur und Funktion kann man leicht die wesentlichen Neuerkenntnisse zusammenfassen.

Für die Struktur kann beim gegenwärtigen Wissensstand ein Molekülmodell als Arbeitshypothese vorgeschlagen werden, das die Anzahl der Untereinheiten, die Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten und die Orientierung der Histokompatibilitätsantigene auf der Zelloberfläche beschreibt. Weiterhin sind durch die Sequenzanalysen genetische Zusammenhänge zwischen den K- und D-Produkten sowie mit Histokompatibilitätsantigenen anderer Spezies (Mensch) erkennbar. Die strukturelle Verwandtschaft der Histokompatibilitätsantigene des Menschen mit Immunglobulinen verschiedener Spezies scheint nachgewiesen zu sein. Zur Verbindung von strukturellen und funktionellen Erkenntnissen sind wir auf die gesamte Primärstruktur der schweren Kette von Histokompatibilitätsantigenen und die ihr zugrunde liegenden Strukturregeln angewiesen. Nur dadurch werden die Lokalisation der antigenen Determinanten und die molekularen Prinzipien des Polymorphismus aufgeklärt werden können.

Bei der leichten Kette, dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin, läßt die Primärstruktur zwar evolutionäre Zusammenhänge erkennen, doch in der Frage der Funktion der Histokompatibilitätsantigene ist man damit noch keinen Schritt weitergekommen. Es ist zu diskutieren, ob  $\beta_2$ -Mikroglobulin nicht eine allgemeine Acceptorfunktion für einen T-Zell-Rezeptor haben könnte. Es wäre denkbar, daß der T-Zell-Rezeptor eine konstante Bindungsstelle (C-Region) für  $\beta_2$ -Mikroglobulin hat und mit einer variablen Bindungsstelle (V-Region) die antigene Stelle auf der schweren Kette von H-Antigenen oder die Hybridantigendeterminante bindet. Andererseits könnte  $\beta_2$ -Mikroglobulin auch eine Bindungsfunktion für Komplement haben, um die Auflösung der Zielzelle einzuleiten<sup>[67]</sup>.

Thomas schrieb 1959<sup>[68]</sup> sehr weitschauend, daß die Natur die H-Antigene wohl nicht erfunden habe, um den Transplantationschirurgen das Leben schwer zu machen. Alle neueren Erkenntnisse zeigen, daß der Abstoßung körperfremder Zellen und der Eliminierung körpereigener, aber abnormaler Zellen ähnliche Regeln zugrunde liegen. Die genannten Beispiele abnormaler Zellen (virusinfizierte Zellen, Tumorzellen) treten im langen Leben eines Vertebratenorganismus so häufig auf und sind so einschneidend, daß ein evolutionärer Selektionsdruck zur Entstehung und Aufrechterhaltung eines solchen Abwehrsystems gerechtfertigt scheint. Dieses System scheint sich aus den Abstoßungssystemen einfacher Organismen entwickelt zu haben. Beispielsweise ist bei Schwämmen eine hohe

Spezifität des Zell-Zell-Kontaktes nachgewiesen. Bei derart einfachen multizellulären Organismen, die in kleinen Lebensräumen sehr dicht zusammenleben, ist dieses Prinzip außerordentlich wichtig, um die Individualität aufrechtzuerhalten. Bei Korallen konnte Transplantationsimmunität mit „Gedächtnis“ gezeigt werden<sup>[38]</sup>. Bei Vertebratenorganismen ist es weniger die Gefahr der Vermischung von Zellen verschiedener Individuen als von Veränderungen der Zelle innerhalb eines Organismus durch Virusinfektionen, Tumorentstehung und somatische Mutationen. Eine teleologische Grundlage für das Vorhandensein und Funktionieren eines solchen Systems ist leicht vorstellbar.

Die Diskussion, ob beim T-Lymphocyt ein Ein- oder Zwei-Rezeptoren-Modell wirksam ist, wird möglicherweise mit einem Kompromiß enden. Erstens kann es zwei Typen von variablen Genprodukten geben, die auf T-Zellen clonal verteilt sind. Das erste variable Genprodukt, der H-2-Antigenrezeptor, ist innerhalb eines Organismus im Laufe der Entwicklung durch das Durchlaufen von Toleranzfiltern sehr stark für die Erkennung syngener H-2-Produkte selektioniert. Damit wurde die Anzahl der Clone, die für die H-2-Erkennung notwendig sind, bereits sehr stark herabgesetzt. Das zweite variable Genprodukt, der Neoantigenrezeptor, benötigt allerdings eine breite clonale Verteilung. Das statistische Problem des Vorkommens zweier variabler Rezeptoren auf einer Zelle wäre damit leichter zu lösen.

Zweitens kann man diskutieren, daß zwei variable Rezeptorproteine, etwa in Form von zwei Untereinheiten, in einem bivalent wirksamen Rezeptor verknüpft existieren (Abb. 7b). Ein solcher bivalenter T-Zell-Rezeptor würde zugleich das ungelöste Problem der Moleküllassoziation zwischen H-Antigenen und Neoantigenen überflüssig erscheinen lassen, weil der T-Zell-Rezeptor diese Assoziation selbst herbeiführt. In diesem Modell wäre die Funktion des  $\beta_2$ -Mikroglobulins als Kontaktprotein für einen T-Zell-Rezeptor sehr gut vorstellbar.

Drittens können zwei variable, aber physikalisch getrennte T-Zell-Rezeptoren durch Bindung an einen H-2-Antigen-Neoantigen-Hybridkomplex auf der Oberfläche der T-Zelle durch submembranöse kontraktile Elemente zusammengezogen werden (Abb. 7c). Durch diesen Vorgang könnte ein Signal ausgelöst werden, das die Proliferation der kompetenten T-Zelle auslöst. Signalauslösungen zur Zellteilung und Differenzierung von Lymphocyt durch Bindung extrazellulärer Substanzen an Zelloberflächenproteine sind in mehreren Systemen bekannt<sup>[69]</sup>.

Die meisten derzeit bekannten serologischen und zellimmunologischen Befunde sowie die geschilderten „Cocapping“- und „Lysostrip“-Experimente deuten eher auf ein Ein-Rezeptor-Modell hin.

Es scheint, als ob das Immunabwehrsystem in diesem Bereich einen kaum zu steigernden Grad an Kompliziertheit erreicht hat. Bei derart komplexen Systemen nimmt die Fehleranfälligkeit rapide zu. Die Fehler- und Qualitätskontrolle ist nur dann genügend wirkungsvoll, wenn alle Elemente intakt sind. Das Immunsystem ähnelt in dieser Beziehung dem Zentralnervensystem, das den bei Alterungsvorgängen normalerweise auftretenden Verlust an aktiven Elementen durch Erfahrungselemente (Memory-Zellen) ausgleicht. Dieses Prinzip ist bei den sehr häufigen Bakterien- und Virusinfektionen sehr wirksam. Möglicherweise werden Tumorzell-Umwandlungen im fortgeschrittenen Alter wegen der wesentlich selteneren Entstehung von Tumorzellen durch den altersbedingten

Schwund an aktiven Elementen (d.h. von kompetenten T-Lymphocyten) sowie durch die Abwesenheit von kompetenten Memory-Zellen nicht mehr sicher erkannt. Von der Evolution her ist in dieser Richtung kein Fortschritt mehr zu erwarten, weil die Reproduktionsphase im höheren Alter abgeschlossen ist und die heute eingetretene Lebensverlängerung keinen weiteren Selektionsdruck mehr ausüben kann.

Die beschriebenen Experimente und ihre Diskussion verdeutlichen, daß weder die Chemie noch die Biologie die wesentlichen Fragen dieses hochaktuellen Forschungsgebietes beantworten konnten. Die medizinische Bedeutung der Histokompatibilitätsantigene beschränkt sich bislang vorwiegend auf die Probleme der Organübertragung. Langzeiterfolge sind nur in besonderen Fällen, z.B. bei der Nierentransplantation, erreungen worden. Die Funktionen der Histokompatibilitätsantigene in der Immunüberwachung abnormaler Zellen sind noch nicht genügend verstanden, um eine Therapie aufzubauen, die sich das Immunüberwachungssystem aktiv zunutze macht. Mit genauen molekularbiologischen Kenntnissen wird es möglich sein, bislang unbeeinflußbare Krankheiten, die auf gestörten Regulationsmechanismen der Zelle beruhen, mit biologischen Methoden erfolgreich zu behandeln. Darunter fallen chronisch persistierende Viruskrankungen und damit verbundene unvollständige Abwehrreaktionen, z.B. möglicherweise die multiple Sklerose sowie die Krebserkrankungen. Ein völlig neuer Typ der Immuntherapie etwa durch Anwendung von in vitro erzeugten, spezifisch gegen individuelle Krebszellen gerichteten Abstoßungszellen wird vielleicht schon bald möglich sein. Damit könnte nach den großen Erfolgen der chemisch und bakteriologisch produzierten Medikamente eine neue Ära einer wissenschaftlich fundierten Zelltherapie ausgelöst werden.

*Eine Vielzahl der beschriebenen Experimente wurde im Arbeitskreis von Dr. G. M. Edelman an der Rockefeller University, New York, vorgenommen. Der Autor dankt Dr. G. M. Edelman sowie den Kollegen seiner Arbeitsgruppe, Drs. B. A. Cunningham, R. J. Milner, J. W. Schrader, K. Reske und J. A. Ziffer, für die großzügige Unterstützung und die anregenden Diskussionen, ohne die der vorliegende Bericht nicht zustande gekommen wäre.*

Eingegangen am 20. Juni 1977 [A 210]

- [1] C. O. Jensen, Centralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskrankh. 34, 28, 122 (1903).
- [2] P. A. Gorer, J. Pathol. Bacteriol. 47, 231 (1938).
- [3] P. A. Gorer, S. Lyman, G. D. Snell, Proc. Roy. Soc. (London) B 135, 499 (1948).
- [4] P. B. Medawar, J. Anat. 78, 176 (1944).
- [5] G. D. Snell, J. Genet. 49, 87 (1948).
- [6] H. O. McDevitt, M. Sela, J. Exp. Med. 122, 517 (1965).
- [7] J. Klein, D. C. Shreffler, Transplant. Rev. 6, 3 (1971).
- [8] J. Klein: Biology of the Mouse Histocompatibility-2 Complex. Springer, Berlin 1975.
- [9] S. G. Nathenson, S. E. Cullen, Biochim. Biophys. Acta 344, 1 (1974).
- [10] I. Berggård, A. G. Bearn, J. Biol. Chem. 243, 4095 (1968).
- [11] P. Cresswell, M. J. Turner, J. L. Strominger, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 1603 (1973).
- [12] J. Silver, L. R. Hood, Nature 249, 764 (1974).
- [13] P. A. Peterson, L. Rask, J. B. Lindblom, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 35 (1974).
- [14] J. L. Brown, K. Kato, J. Silver, S. G. Nathenson, Biochemistry 13, 3174 (1974).
- [15] B. D. Schwartz, K. Kato, S. E. Cullen, S. G. Nathenson, Biochemistry 12, 2157 (1973).
- [16] R. Henning, R. J. Milner, K. Reske, B. A. Cunningham, G. M. Edelman, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 118 (1976).
- [17] C. Neapport-Sautès, F. Lilly, D. Silvestre, F. M. Kourilsky, J. Exp. Med. 137, 511 (1973).

- [18] V. Hauptfeld, M. Hauptfeld, J. Klein, *J. Exp. Med.* 141, 1047 (1975).
- [19] M. S. Bretscher, *Nature New Biol.* 231, 229 (1971).
- [20] J. P. Segrest, I. Kahane, R. L. Jackson, V. T. Marchesi, *Arch. Biochem. Biophys.* 155, 167 (1973).
- [21] S. M. Fu, H. G. Kunkel, *J. Exp. Med.* 140, 895 (1974).
- [22] B. A. Cunningham, R. Henning, R. J. Milner, K. Reske, J. A. Ziffer, G. M. Edelman, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 41, 341 (1977).
- [23] P. A. Peterson, B. A. Cunningham, I. Berggård, G. M. Edelman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 1697 (1972).
- [24] B. A. Cunningham, J. L. Wang, I. Berggård, P. A. Peterson, *Biochemistry* 12, 4811 (1973).
- [25] F. M. Burnett, *Nature* 226, 123 (1970).
- [26] J. A. Gally, G. M. Edelman, *Annu. Rev. Genet.* 6, 1 (1972).
- [27] B. A. Cunningham, I. Berggård, *Science* 187, 1079 (1975).
- [28] J. W. Jacobs, B. Kemper, H. D. Niall, J. F. Habener, J. T. Potts Jr., *Nature* 249, 155 (1974).
- [29] J. Silver, L. R. Hood, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 599 (1976).
- [30] E. S. Vitetta, J. D. Capra, D. G. Klapper, J. Klein, J. W. Uhr, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 705 (1976).
- [31] B. M. Ewenstein, J. H. Freed, L. E. Mole, S. G. Nathenson, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 915 (1976).
- [32] J. D. Capra, E. S. Vitetta, D. G. Klapper, J. W. Uhr, J. Klein, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 3661 (1976).
- [33] C. Terhorst, P. Parham, D. L. Mann, J. L. Strominger, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 910 (1976).
- [34] J. Bridgen, D. Snary, M. J. Crompton, C. Barnstable, P. Goodfellow, W. F. Bodmer, *Nature* 261, 200 (1976).
- [35] C. Terhorst, P. Parham, D. L. Mann, J. L. Strominger, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74, 4002 (1977).
- [36] L. Du Pasquier in F. Melchers, K. Rajewsky: *The Immune System*. 27. Mosbacher Colloquium. Springer, Berlin 1976, S. 101.
- [37] R. Henning, *Blut* 36, 377 (1978).
- [38] W. H. Hildeman, R. L. Raison, G. Cheung, C. J. Hull, L. Akaka, J. Okamoto, *Nature* 270, 219 (1977).
- [39] P. C. Doherty, R. V. Blanden, R. M. Zinkernagel, *Transplant. Rev.* 29, 89 (1976).
- [40] R. V. Blanden, P. C. Doherty, M. B. C. Dunlop, I. D. Gardner, R. M. Zinkernagel, C. S. David, *Nature* 254, 269 (1975).
- [41] R. M. Zinkernagel, P. C. Doherty, *Nature* 248, 701 (1974).
- [42] P. C. Doherty, R. M. Zinkernagel, *J. Immunol.* 31, 27 (1976).
- [43] G. Trinchieri, D. P. Aden, B. B. Knowles, *Nature* 261, 312 (1976).
- [44] E. Gomard, V. Duprez, Y. Henin, J. P. Ury, *Nature* 260, 707 (1976).
- [45] K. J. Blank, H. A. Freedman, F. Lilly, *Nature* 260, 250 (1976).
- [46] U. Koszinowsky, R. Thomassen, *Eur. J. Immunol.* 6, 679 (1976).
- [47] G. M. Shearer, *Eur. J. Immunol.* 4, 527 (1974).
- [48] J. W. Schrader, B. A. Cunningham, G. M. Edelman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 5066 (1975).
- [49] R. N. Germain, M. E. Dorf, B. Benacerraf, *J. Exp. Med.* 142, 1023 (1975).
- [50] J. W. Schrader, G. M. Edelman, *J. Exp. Med.* 143, 601 (1976).
- [51] M. J. Bevan, *Nature* 256, 419 (1975).
- [52] M. J. Bevan, *J. Exp. Med.* 143, 1283 (1976).
- [53] R. D. Gordon, B. J. Mathieson, L. E. Samelson, E. A. Boyse, E. Simpson, *J. Exp. Med.* 144, 810 (1976).
- [54] H. S. Lawrence, *Physiol. Rev.* 39, 811 (1959).
- [55] B. Kindred, D. C. Shreffler, *J. Immunol.* 109, 940 (1972).
- [56] D. H. Katz, B. Benacerraf, *Transplant. Rev.* 22, 175 (1975).
- [57] R. M. Zinkernagel, P. C. Doherty, *J. Exp. Med.* 141, 1427 (1975).
- [58] J. W. Schrader, G. M. Edelman, *J. Exp. Med.* 145, 523 (1977).
- [59] M. C. Raff, *Sci. Am.* 234, Nr. 5, S. 30 (1976).
- [60] D. Bernoco, S. Cullen, G. Scudder, G. Trinchieri, R. Cepellini in J. Dausset, J. Colombari: *Histocompatibility Testing*. Munksgaard, Kopenhagen 1973, S. 527.
- [61] V. Hauptfeld, M. Hauptfeld, J. Klein, *J. Exp. Med.* 141, 1047 (1975).
- [62] R. Henning, J. W. Schrader, G. M. Edelman, *Nature* 263, 689 (1976).
- [63] R. B. Taylor, W. P. H. Duffus, M. C. Raff, S. de Petris, *Nature New Biol.* 233, 225 (1971).
- [64] *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 41 (1977).
- [65] U. Krawinkel, M. Cramer, C. Berek, G. J. Hämmerling, S. J. Black, K. Rajewsky, K. Eichmann, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 41, 285 (1977).
- [66] H. Binz, H. Wigzell, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 41, 275 (1977).
- [67] G. M. Edelman, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 41, 891 (1977).
- [68] L. Thomas in H. S. Lawrence, J. Y. Hoeber: *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*. Cassell, London 1959, S. 529.
- [69] G. M. Edelman, *Science* 192, 218 (1976).
- [70] O. Smithies, M. D. Poulik, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 2914 (1972).
- [71] B. A. Cunningham, I. Berggård, *Science* 187, 1079 (1975).
- [72] I. Berggård, B. A. Cunningham, noch unveröffentlicht.
- [73] E. Appella, N. Tanigaki, T. Natori, D. Pressman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70, 425 (1976).
- [74] J. D. Capra, E. S. Vitetta, D. G. Klapper, J. W. Uhr, J. Klein, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 3661 (1976).

## Mechanistische und präparative Aspekte der Chemie der Vinylkationen

Von Michael Hanack<sup>[\*]</sup>

In den letzten Jahren ist umfangreiches experimentelles Material erschlossen worden, das zwingend auf Vinylkationen als Zwischenstufen deutet. Vinylkationen können durch elektrophile Additionen an Alkine und Allene sowie unter Beteiligung dieser Gruppierungen bei Solvolysereaktionen erzeugt werden. Die heterolytische Bindungsspaltung von Vinylverbindungen führt ebenfalls zu Vinylkationen. Beispiele für präparative Anwendungen sind Synthesen von substituierten Indenen, Cyclobutanonen und Cyclopropylketonen.

### 1. Einleitung

Es gibt wohl kaum ein Teilgebiet der organischen Chemie, das über 75 Jahre hinweg so intensiv bearbeitet worden ist wie die Chemie der Carbeniumionen. Dabei verstand man unter Carbeniumionen lange Zeit nur solche Zwischenstufen, bei denen der positiv geladene Kohlenstoff mit drei Substituenten

verbunden ist (trisubstituierte oder gesättigte Carbeniumionen) (1).



Erst in den letzten Jahren hat man disubstituierte Carbeniumionen, von denen die Vinylkationen (2) eine wichtige Spezies sind, genauer untersucht, so daß W. M. Jones 1969 schreiben konnte: „Vinyl cations have finally become acceptable members of the reactive intermediate community“<sup>[1]</sup>.

Außer den Vinylkationen gehören z. B. die Acylium- (3) und die Nitriliomionen (4) zu den disubstituierten Carbe-

[\*] Prof. Dr. M. Hanack  
Institut für Organische Chemie der Universität  
Lehrstuhl für Organische Chemie II  
Auf der Morgenstelle 18, D-7400 Tübingen