

Von der Antikörperstruktur zur Diversität der Immunantwort (Nobel-Vortrag)**

Von Cesar Milstein*

*Cuando se acerca el fin, escribió Cartaphilus, ya no quedan imágenes del recuerdo; sólo quedan palabras. Palabras, palabras desplazadas y mutiladas, palabras de otros, fue la pobre limosna que le dejaron las horas y los siglos.^{***}*

J. L. Borges

Nach der natürlichen oder experimentellen Infektion eines Tieres durch ein Bakterium, ein Virus oder einen anderen Fremdkörper wird dieser als Eindringling erkannt und möglichst entfernt oder zerstört. Obwohl das Tier mit vielen Millionen verschiedener chemischer Strukturen noch nie in Berührung gekommen ist, kann es trotzdem spezifisch auf sie reagieren. Wie ist das möglich? Diese Frage bewegte viele Wissenschaftler in unserem Jahrhundert, und das Phänomen wird in seiner Komplexität und Vielschichtigkeit sicherlich auch weiterhin faszinieren. Wenn man zurückblickt, erkennt man, welch enormer Fortschritt in der Vergangenheit schon gemacht wurde. Es genügt, unsere jüngeren Kollegen daran zu erinnern, daß wir vor zwanzig Jahren noch nicht einmal wußten, daß jeder Antikörper eine andere Primärstruktur hat.

Was mich zur Immunologie hinzog war, daß mir schien, alle Probleme ließen sich durch ein einziges Experiment klären: Durch den Vergleich der Aminosäuresequenz zweier Antikörpermoleküle, glaubte ich, könnte das Geheimnis der Antikörper-Diversität gelüftet werden. Glücklicherweise waren meine Immunologienkenntnisse damals so gering, daß ich meine Naivität nicht bemerkte.

Im Jahre 1962, als ich durch Zufall der Betreuer von *Roberto Celis* in Argentinien wurde, kam mir der Gedanke, daß die Antikörper-Diversität durch Verknüpfung vieler kleiner Polypeptide via Disulfidbrücken, wobei unzählige Muster entstünden, verursacht werden könnte. Ich weiß nicht, ob zu jener Zeit noch jemand diese Idee hatte, denn von allen gängigen Theorien über die Antikörper-Diversität war meine wohl die ausgefallenste. Ich halte es mir zugute, daß ich sie nie veröffentlicht habe. Trotzdem war dieser Gedanke für mich fruchtbar, da ich nun die intellektuelle Rechtfertigung hatte, um an Disulfidbrücken zu arbeiten. Als ich 1963 die Arbeit in Cambridge aufnahm, hatte sich das noch heute gültige Antikörpermodell durchgesetzt: zwei schwere und zwei leichte Ketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abb. 1)^[1].

Ich beeilte mich, das Angebot Dr. Sangers zu akzeptieren, am Problem der Antigenbindungsstelle der Antikörpermoleküle zu arbeiten.

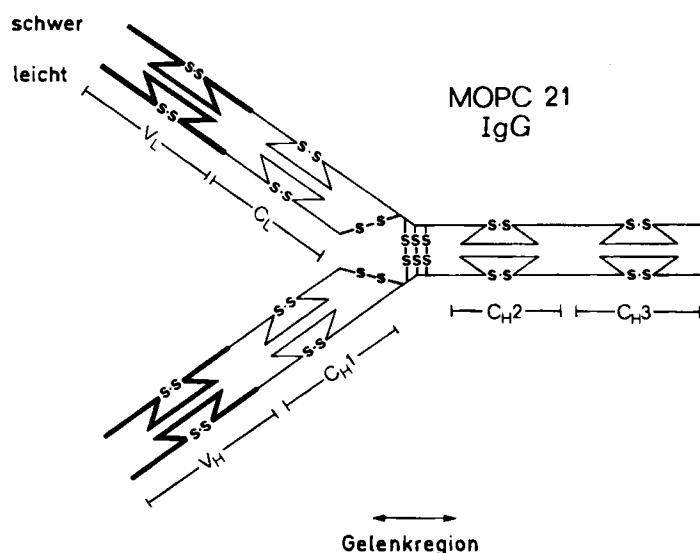


Abb. 1. Antikörper bestehen aus zwei oder mehr Paaren von schweren und leichten Ketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede Kette hat zwei Regionen, eine variable und eine konstante. Die variable Region hat bei jedem Antikörper eine andere Struktur und enthält die Antigenbindungsstelle, die an der Spitze einer Y-artigen dreidimensionalen Struktur liegt. Die konstante Region ist invariabel innerhalb einer Klasse oder Unterklaasse und hat Effektor-Funktion (Bindung des Komplements, Bindung an oder Transport durch Membranen etc.). Anzahl und Position der Disulfidbrücken sind charakteristisch für die verschiedenen Klassen und Unterklassen. Die Abbildung zeigt das Maus-Myelomprotein MOPC 21, mit dem wir in unserem Laboratorium arbeiteten.

Die Natur der Antikörper-Diversität

Zuerst analysierte ich die Fingerprint-Muster verschiedener iodierter Antikörper nach Verdauung. Selbst gereinigte Antikörper schienen jedoch zu komplex und unterschieden sich kaum vom unfraktionierten Immunglobulin. Ich publizierte meine Ergebnisse nicht, die mich lediglich überzeugt hatten, daß die Proteinchemie von Antikörpern auf diese Weise nicht in den Griff zu bekommen war und daß ein anderer Zugang gefunden werden mußte.

So begann ich, die Aminosäuresequenzen von Immunglobulinen im Bereich der Disulfidbrücken zu analysieren.

[*] Dr. C. Milstein

Laboratory of Molecular Biology, Medical Research Council
Hills Road, Cambridge CB2 2QH (England)

[**] Copyright © The Nobel Foundation 1985. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieser Übersetzung.

[***] Wenn das Ende naht, hat Cartaphilus geschrieben, bleiben keine Bilder der Erinnerung mehr, es bleiben nur Wörter. Wörter, sinnlose und verstümmele Wörter, Wörter von anderen, wie armeselige Almosen, die die Stunden und Jahrhunderte hinterlassen haben.

Ich erkannte bald, daß je eine positionsvariable und -konstante Disulfidbrücke existieren müsse^[2,3]; die volle Bedeutung dieser Beobachtung wurde erst evident, als *Hilschmann* und *Craig* die variablen und konstanten Teile der leichten Kette von Antikörpern beschrieben^[4]. Der variable Teil enthält die eine, der konstante die andere Disulfidbrücke. In späteren Untersuchungen mit *Pink*, *Frangione*, *Svasti* und anderen fand ich sich wiederholende S-S-Schleifen als gemeinsame strukturelle Eigenschaft verschiedener Klassen und Unterklassen von IgG-Ketten. Was sie voneinander unterscheidet, ist die Stellung der S-S-Brücken zwischen den Ketten^[5].

Die Zeit zwischen 1965 und 1970 war, sowohl was die theoretische als auch was die experimentelle Seite angeht, sehr aufregend. Wie konnte man diese variablen und konstanten Regionen erklären? Es gab auf der einen Seite Millionen von Antikörperstrukturen, die sich auf der anderen Seite von einem Protein mit unveränderlicher Primärsequenz ableiteten, das durch nur ein oder wenige Gene codiert sein sollte. Wie konnte man dieses Rätsel lösen? *Dreyer* und *Bennett*^[6] schlugen die Existenz von Tausenden von Genen in der Keimbahn vor und nahmen an, daß das Paradoxon einfach zu lösen sei, wenn man ein völlig neues Modell zur Erklärung heranziehe. Es wurde bekannt als die „zwei-Gene-ein-Polypeptid-Hypothese“. Uns gefiel das nicht, und wir schlugen einen Mechanismus vor, der eine „Hypermutation“ bei gewissen Gensegmenten annahm^[7]. Es existierten aber noch weitere Modelle zur Erklärung der Antikörper-Diversität; eins, das 1967 auf einem Cold-Spring-Harbor-Symposium ausgiebig diskutiert wurde, basiert auf einem somatischen „cross-over“ zwischen Genpaaren^[8]. Ich war hocherfreut, als ich bald nach diesem Symposium zeigen konnte, daß mindestens drei Gene an der Bildung der menschlichen K-Kette beteiligt sein müssen^[9]. Die vielen Tausend vermuteten V-Regionen konnten zu wenigen Familien oder Untergruppen zusammengefaßt werden. Die Tatsache, daß diese Familien von nicht-allelischen V-Genen codiert werden – und die Genetik der C-Region, nach der ein einziges mendelndes C-Gen existiert –, überzeugten mich und viele andere, daß die „zwei-Gene-ein-Polypeptid-Hypothese“ zutrifft.

Danach folgte eine Zeit, in der die bisherigen Ergebnisse bestätigt und die Untersuchungen ausgeweitet wurden. Sowohl die Existenz von Familien oder Untergruppen von V-Genen, als auch die von hypervariablen Resten innerhalb der variablen Segmente wurde bewiesen^[9–11]. Kristallographische Befunde ergaben, daß solche hypervariablen Reste benachbart liegen und bestätigten somit die Vermutung, daß sie ein Teil der Antikörperbindungsstelle (Paratop) sind. Dies konnte an Kristallen des Myelomprotein-Antigen-Komplexes direkt gezeigt werden^[12]. Diese Ergebnisse waren überzeugend und wurden allgemein anerkannt. Das Konzept, daß getrennte „Pools“ von V- und C-Genen existieren, die sich ständig vergrößern und verkleinern, rundete schließlich das Bild ab. 1970 waren wir überzeugt, daß „the section of the genome involved in the coding of immunoglobulin chains undergoes an expansion-contraction evolution: that the number of individual genes coding for basic sequences is not large, and that it varies in different species and even within species at different stages of its own history. The task of providing for the endless variety of individual chains is left to somatic processes“^[13].

Die mRNA für leichte Ketten und das Sekretionssignal

Ich wurde dann etwas unruhig. Die Proteinchemie allein schien uns nicht viel weiterzuhelfen. In jener Zeit sorgte in unserem Laboratorium die neue Sequenzierungsmethode von *Sanger* und seiner Gruppe für große Aufregung. *George Brownlee*, einer meiner besten Freunde dort, hielt die Zeit für reif, daß man kompliziertere RNAs als 5S- oder 6S-RNA untersucht. Zusammen versuchten wir also, die mRNA von Immunglobulinen zu isolieren – ein schwieriges Unterfangen. Als *Tim Harrison*, ein neuer Mitarbeiter von *George*, zu uns stieß, beschlossen wir, nicht mehr mit soliden Tumoren^[14], sondern mit Zellkulturen zu arbeiten, die wir freundlicherweise von Kollegen am Salk-Institut erhielten^[15]. Den ersten wichtigen Durchbruch auf diesem Gebiet beschrieb eine Veröffentlichung über die in-vitro-Synthese von leichten Immunglobulinketten^[16]. Wir verfolgten diesen Weg sofort weiter und entdeckten zu unserer großen Freude ein Vorläufermolekül der leichten Ketten. Weitere Experimente überzeugten uns davon, daß die N-terminale Verlängerung ein Erkennungssignal für den vektoriellen Transport durch Membranen während der Proteinsynthese ist. Dies war der erste Beweis dafür, daß ein N-terminales Segment, das während der Proteinsynthese schnell abgespalten wird, als Sekretionssignal fungieren kann^[17, 18].

Unser Hauptinteresse galt jedoch weiterhin der Sequenz der mRNA für leichte Ketten. Damals gab es noch keine Methoden zur DNA-Sequenzierung, und mRNA konnte nur durch komplizierte „Fingerprints“ radioaktiver mRNA sequenziert werden. Für jede radioaktive mRNA-Präparation, die wir sequenzieren wollten, mußten wir Zellen mit etwa 100 mCi anorganischem ³²P-Phosphat markieren. Wir zogen also unsere schweren Bleischürzen an, markierten hinter dicken Plastikwänden unsere Zellen und reinigten hektisch unsere mRNA, machten „Fingerprints“, immer im Wettlauf mit dem unausweichlichen radioaktiven Zerfall. Obwohl wir nicht sehr weit sequenzierten, konnten wir doch Oligonucleotide isolieren, die der Proteinsequenz entsprachen^[19]. Unter diesen Oligonucleotiden befanden sich auch welche, die in die V- und C-Region hineinreichten; damit wurde deutlich, daß die Proteinkette aus einer einzigen mRNA stammte. Wir beendeten dann unsere „radioaktive Phase“ und erprobten andere Methoden zur mRNA-Sequenzierung; wir arbeiteten mit synthetischen Primern und cDNA-Synthese. Dies Projekt lief jedoch nur nebenbei, unsere Hauptanstrengungen galten anderen Zielen. Es machte sich trotzdem bezahlt^[21], und ich werte später darauf zurückkommen, weil es Teil meiner Geschichte ist.

Spontane somatische Mutationen bei Myelomen

Mit der Einführung von Gewebekulturmethoden in unserem Laboratorium änderte sich auch unsere Forschungsrichtung. Gemeinsam mit meinem neuen Studenten *D. S. Secher* und dem später zu uns gestoßenen *R. G. H. Cotton* analysierte ich Häufigkeit und Art somatischer Mutationen von Myelomzellen in Kultur. Wir hofften, eine hohe Mutationsrate der hypervariablen Segmente zu entdecken

(die Versuchsanordnung ist in Abb. 2 beschrieben). Eine Kultur wurde mindestens drei Monate gezüchtet, so daß sich Mutanten anreichern konnten; einzelne Zellen wurden dann kloniert. Die Kolonien wurden mit markierten Aminosäuren inkubiert und das radioaktive Immunglobulin danach auf Mutanten mit veränderten elektrophoretischen Eigenschaften untersucht. Nach einigen tausend Klonen stießen wir auf unsere erste Strukturmutante^[22]:

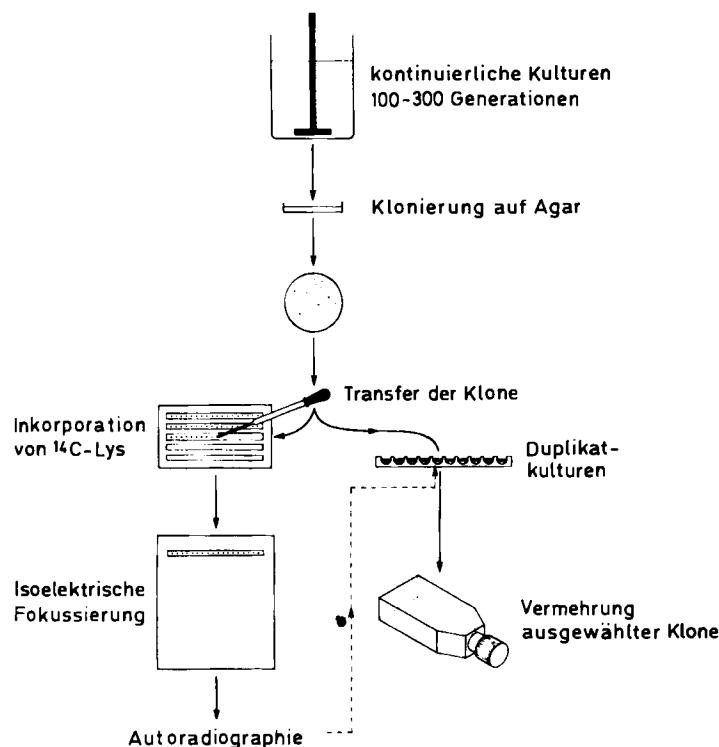


Abb. 2. Versuchsanordnung für das Screening der Muster von isoelektrischen Fokussierungen des Immunglobulins, das von 7000 Klonen von P3-Myelomzellen sekretiert wurde. Mutanten und deren primärer Defekt wurden durch Aminosäure- und RNA-Sequenzierung analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt [25].

die Analyse von 7000 Klonen bescherte uns einen Mutantenpool, der in Tabelle 1 beschrieben ist. Dieses aufwendige Experiment bewies zum erstenmal die Existenz somatischer Mutanten aus Säuerzellen auf dem Protein- und Nucleinsäureneniveau^[23]. Zudem schien die Mutationsrate

Tabelle 1. Spontan entstandene Strukturmutanten der schweren Kette von MOPC 21.

Mutante	Proteindefekt	Genetischer Defekt
IF1	die letzten 82 Reste von CH3 fehlen: Unterschiede im Kohlenhydratteil	Ser (387) → Ter kleine Deletion?
IF2	Deletion von CH1	Deletion von 5.5 kB einschließlich dem CH1-Exon Fehlerhafte Regulation?
IF3	Veränderte Sequenz der Reste 367-380 Deletion des übrigen CH3	Leserasterverschiebung (-2) Vorzeitige „ohre“-Termination
IF4	Austausch von Asparagin 452 gegen Aspartat	A → G-Umwandlung („missense“)
NSII/1	Deletion der letzten 67 Reste	Trp(406) → Ter G → A-Umwandlung („non-sense“)

von großer Bedeutung für die Diversität zu sein. Da die Mutationen nicht in der variablen Region vorkamen, schlossen wir, daß in den untersuchten Zellen keine hypermutierenden Gensegmente existierten. Wir waren also nicht viel weiter gekommen.

Myelomhybride

Während diese Arbeit weiterlief, bereitete Cotton ein anderes Experiment vor, das wichtiger werden sollte, als wir zuerst dachten^[25]: die Fusion zweier Myelomzellen in Kultur (Abb. 3). Es zeigte sich, daß das Phänomen der „allelischen Exklusion“ nicht dominant ist. Bei der Fusion entstand vielmehr ein Hybrid, das die Antikörperketten beider Eltern exprimierte. Zusätzlich bewiesen wir, daß eine *cis*-Expression der V- und C-Regionen vorlag, wahrscheinlich weil die V- und C-Segmente schon auf DNA-Ebene durch Translokation in den Vorläufern der Plasmazellen integriert wurden. Dies widersprach der Theorie, daß die leichten und schweren Ketten von Hybridmolekülen stückweise zusammengesetzt werden.

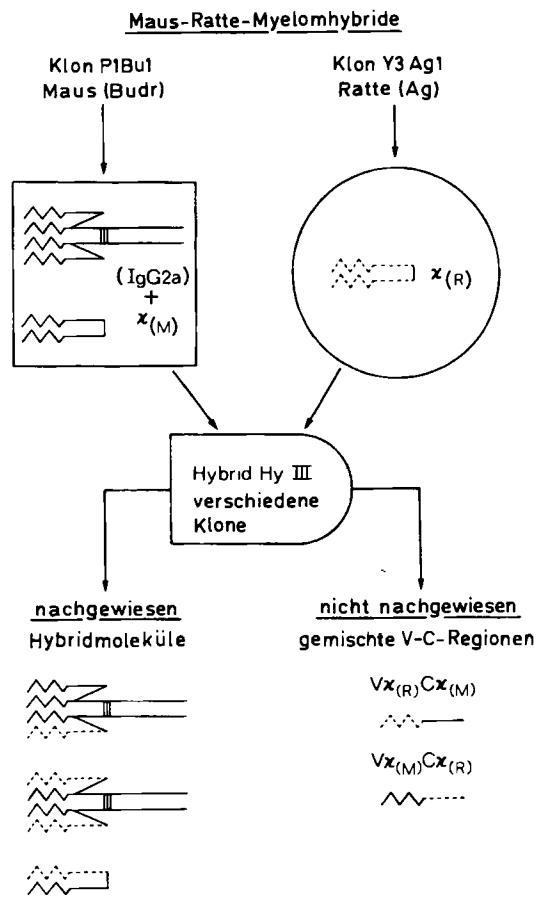


Abb. 3. Codominante *cis*-Expression von Antikörpergenen in Myelomhybriden [25].

Mit diesen Ergebnissen reiste ich nach Basel, um einen Vortrag zu halten – mit dem Erfolg, daß Georges Köhler nach Cambridge kam. Er arbeitete auch an unserem Hauptprojekt, den somatischen Mutanten in immunglobulin-produzierenden Zellen, und an einem Nebenprojekt, der phänotypischen Expression von somatischen Zellhybriden, die aus Myelomen und Myelommutanten herge-

stellten wurden. Es wurde immer klarer, daß wir auf der Suche nach Mutanten neue Wege einschlagen mußten; wir beschlossen, mit solchen Myelomzelllinien zu arbeiten, die Antikörper exprimieren konnten, und von diesen Mutanten herzustellen. Zu jener Zeit waren zwar entsprechende Myelomzelllinien bekannt, aber keine war für unsere Zwecke brauchbar. Die Myelomzelllinie P3 (MOPC 21) wäre vom chemischen Standpunkt aus ideal gewesen, da Proteinsequenzierungen nach wie vor ein Problem waren und wir mit dem MOPC-21-Protein umzugehen wußten. Aber wir konnten für dieses Myelomprotein kein passendes Antigen finden. Wir waren also erfolglos, aber andere Arbeitsgruppen, die sich auch mit dem Problem beschäftigten, schafften es; als erste konnten Scharff et al. auf diese Weise somatische Mutanten (mit Mutationen in der variablen Region) isolieren^[26].

Trotzdem verhalf uns dieser Mißerfolg zum Durchbruch. Da wir keine Zelllinie hatten, die unseren Anforderungen entsprach, mußten wir eine konstruieren. Das Projekt im Hintergrund – die Hybridisierung von Myelomzellen – führte zur Methode, mit der Hybridome produziert werden können. Wie in Abbildung 4 gezeigt, hybridisierten wir eine Myelomzelle und eine antikörperproduzierende Zelle und nicht mehr zwei Myelomzellen. Das entstandene Hybrid war eine unsterbliche Zelle, die die gleichen Antikörper wie die Elternzelle exprimierte, und die unsterblich war wie die Myelomzelle.

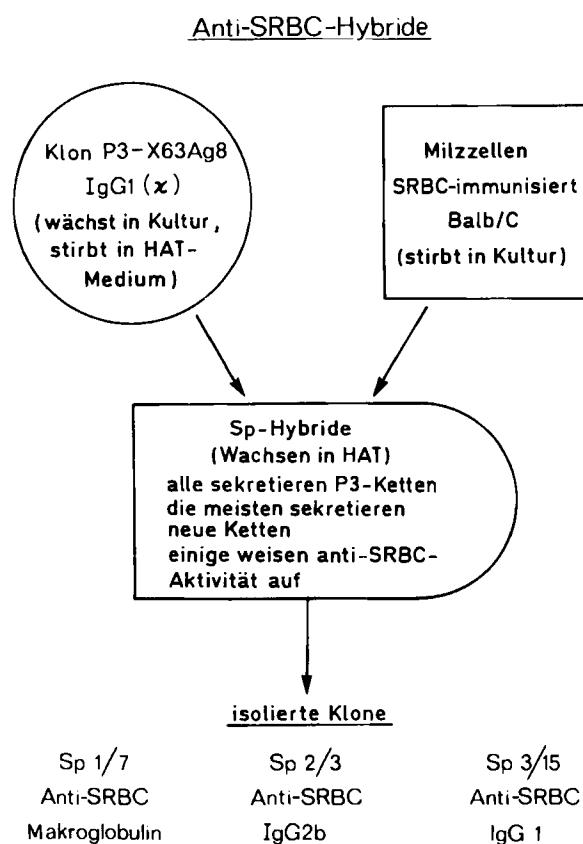


Abb. 4. Das erste erfolgreiche Hybridom wurde aus Zellen einer Maus hergestellt, die mit roten Blutzellen aus Schaferythrozyten (sheep red blood cells, SRBC) immunisiert worden waren [56]. Diese wurden mit einer Myelomzelllinie fusioniert, die das IgG-Protein MOPC 21 (siehe Abb. 1) produzierte, in Zellkultur wuchs und resistent gegen Azaguanin war. Hybride wurden durch Wachstum in HAT(Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin)-Medium selektiert [57].

Endlich hatten wir eine ständig wachsende Zelllinie mit spezifischer Antikörperproduktion, mit der wir nach Mutanten der hypervariablen Region suchen konnten. Dieses Projekt führte meine Studentin Deborah Wilde durch. Während sie immer mehr durch ihre Mißerfolge „bei der Suche nach einer Nadel im Heuhaufen“ entmutigt wurde, dämmerte mir, daß unserer neuen Methode zur Produktion von monoklonalen Antikörpern „a la carte“ viel mehr Bedeutung zukam als ursprünglich gedacht. Aber wir hatten nach den ersten Erfolgen technische Schwierigkeiten mit unseren Fusionsexperimenten. Dann rettete uns Giovanni Galfré, der neu zu uns gekommen war, indem er entdeckte, daß eine unserer Vorratslösungen mit einer toxischen Substanz kontaminiert war. Danach entwickelten wir eine verbesserte Arbeitsvorschrift (Abb. 5) und wandten die neue Technologie erstmals praktisch an.

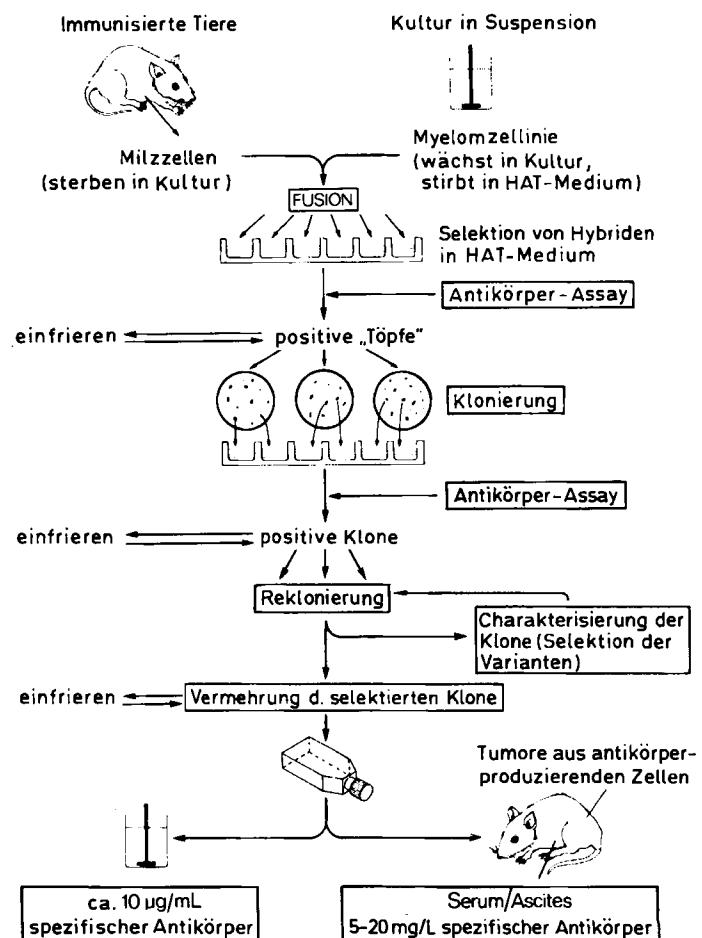


Abb. 5. Allgemein verwendeter Versuchsaufbau zur Herstellung von Hybridomen [58].

Ich stellte dann das Problem der Antikörper-Diversität für einige Jahre zurück, um die praktische Bedeutung der monoklonalen Antikörper für Grundlagenforschung und medizinische Diagnostik zu demonstrieren (Tabelle 2). Wir konnten zeigen, daß die Myelomhybride zur Produktion von Standardreagentien wie den anti-Histokompatibilitätsantigenen^[27] und den anti-Ig-Allotypen^[28] geeignet sind. Mit ihnen konnten Zelloberflächen- und Tumorantigene untersucht werden, und Reagenzien zur Zellfraktionierung wurden so gewonnen^[29-31]. Monoklonale Antikörper konn-

Tabelle 2. Ausgewählte monoklonale Antikörper aus unserem Laboratorium.

Hybridom	Antigen	Verwendung	Mitarbeiter, Jahr, Literatur
R3/13	Ratten MHC	Reagentien zur Gewebetypisierung	Galfre et al. (1977) [27]
R2/10P		Synergistische Effekte	
R2/10S			Howard et al. (1979) [60]
W3/13	Marker für T-Zellen aus der Ratte	Analyse von Zelloberflächenantigenen	Williams et al. (1977) [29]
W3/25			
H6/31	Maus-IgD-Allotyp	Standard-Allotypenreagens	Pearson et al. (1977) [61]
W6/32	HLA-A,B,C	Verwendung für genetische Analysen	Barnstable et al. (1978) [62]
W6/1	Blutgruppe A vom Chromosom 11 gesteuert	und biochemische Studien	
W6/34 und andere			
M1/69, M1/70	Mac-1 und andere Mausleukozyten-Oberflächenantigene	Neues Differenzierungsantigen von Mausleukozyten	Springer et al. (1978, 1979) [63, 64]
M1/22	Forssman	Embryoentwicklung	Stern et al. (1978) [30]
H9/25	Alloantigen auf killer- und plaquebildenden Zellen		Takei et al. (1980) [65]
NA1/34	Subpopulation von menschlichen Thymozyten (CD1)	zur Charakterisierung von Subpopulationen von lymphoiden Zellen des Menschen	McMichael et al. (1979) [66]
NC1/34	Substanz P	Radioimmunoassay Immunocytochemische Lokalisierung von Neurotransmittern Intern markierte Antikörper	Cuello et al. (1979) [32, 67]
YC5/45	Serotonin	Doppelklokalisation auf dem EM-Niveau	
6D4 NB1/19	Blutgruppe A Blutgruppe B	Standardreagentien zur Blutgruppenbestimmung	Voak et al. (1980) [33, 68]
NK2	anti-Interferon aus Menschen	Proteinreinigung im großen Maßstab	Secher und Burke (1980) [34]

ten in Radioimmunoassays und in der Neuropharmakologie eingesetzt werden^[32], sie eigneten sich zur Blutgruppenuntersuchung^[33] und für die Reinigung von Naturprodukten im großen Maßstab^[34]. Des weiteren gingen wir auf eine zweite Spezies – die Ratte – über^[35] und produzierten bispezifische Immunglobuline (Hybridhybridome)^[36].

Die genetische Ursache der Antikörper-Diversität

Zwischen 1970 und 1975 wurden große Anstrengungen unternommen, um die Zahl der Keimbahngene, die die variablen Regionen der Immunglobulinketten codieren, zu bestimmen. Wir begannen damit, als Terry Rabbitts zu uns stieß. Nach viel Arbeit und viel Radioaktivität fanden wir, daß die Zahl der Keimbahngene nicht viel größer ist, als nach unserer Kenntnis der Untergruppen zu erwarten war. Ähnliche, diese Ansicht stützende Befunde wurden auch

von anderen Arbeitsgruppen erhalten^[37, 38]; 1976 war die Theorie allgemein anerkannt^[39]. Danach spürte man schnell zunehmend den Einfluß der Gentechnologie. Innerhalb weniger Jahre und hauptsächlich durch die Beiträge von Tonegawa, Leder, Rabbitts, Hood, Baltimore und anderen rundete sich das Bild über die Anordnung der Immunglobulingene, und man begann ihre Rolle für die Entstehung der Antikörper-Diversität zu verstehen^[40]. Die Vorläufer der antikörperproduzierenden Zellen exprimieren keine Immunglobuline; während ihrer Differenzierung zu prä-B- und B-Zellen bilden sie zuerst die schweren und dann die leichten Ketten (Abb. 6). Der erste Antikörper ist

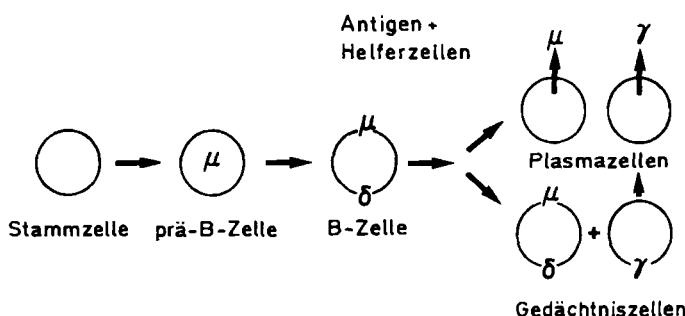


Abb. 6. Differenzierung von B-Zellen.

membrangebunden und fungiert als Rezeptormolekül für antigene Signale. Stimulierte Zellen teilen sich und differenzieren zu antikörperproduzierenden Zellen und Gedächtniszellen.

Die Vorgänge auf zellulärere Ebene korrelieren mit Veränderungen der DNA-Struktur (Abb. 7). Die DNA der Keimbahn enthält die V- und C-Gene – wie vorhergesagt – auf verschiedenen DNA-Fragmenten. Zusätzlich treten weitere Fragmentierungen auf, von denen nur einige in Abbildung 7 gezeigt sind. Leichte und schwere Ketten können nur dann transkribiert und translatiert werden, wenn bestimmte Genfragmente (jedes V und J für die leichten und V, D und J für die schweren Ketten) durch einen Deletionsmechanismus integriert werden. Bei dieser Integration entsteht die enorme Diversität.

Viele Jahre diskutierten Molekularimmunologen über die genetische Ursache der Antikörperfvielfalt (Diversität). Sind die Theorien mit den bis heute erarbeiteten experimentellen Befunden in Einklang? Durch die methodischen Fortschritte der Molekularbiologie konnte gezeigt werden, daß keine Theorie ganz richtig ist, daß aber die meisten doch ein Körnchen Wahrheit enthalten. Es existierten damals im Prinzip zwei Richtungen. Die Vertreter der „Keimbahn-Theorie“ meinten, alle Vielfalt werde durch Gene der Keimbahn vererbt; die anderen schlossen somatische Prozesse ein, die für die Entstehung der Vielfalt verantwortlich sein und von einer kleinen Anzahl von Keimbahngen ausgehen sollten. Es stellte sich heraus, daß beide Richtungen ein bißchen Recht haben (Tabelle 3).

Tabelle 3. Mechanismen, die zur Antikörper-Diversität führen.

- „Keimbahn-Mechanismus“: viele V-Gen-Segmente
- „Kombinationsmechanismus“: a) Verschiedene Kombinationen von V-(D)-J, b) Verschiedene Kombinationen von V_H und V_L
- „Verknüpfungsmechanismus“: Variation an den V-J-, V-D- und D-J-Verknüpfungsstellen
- „Punktmutationsmechanismus“: Veränderung einzelner Nucleotide innerhalb der gesamten V-Region

Organisation der Immunglobulingene der Maus

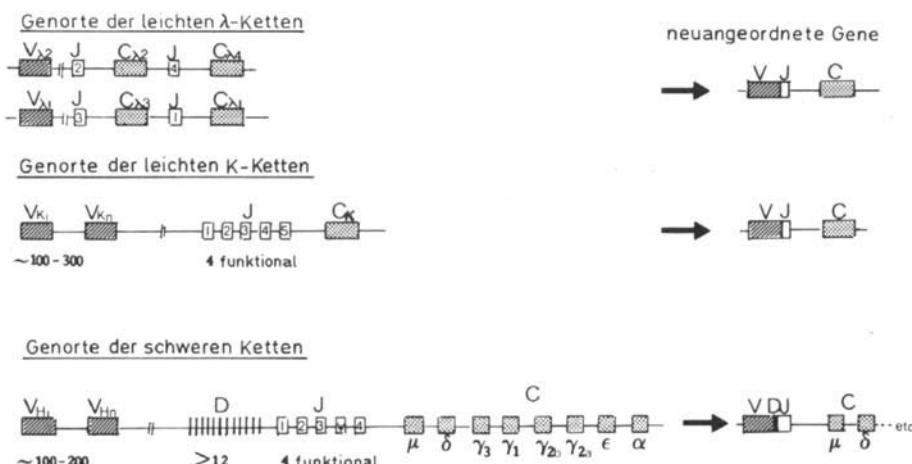


Abb. 7. Anordnung von Immunglobulingenen in der Keimbahn. Während der Differenzierung zu prä-B- und B-Zellen führen umfangreiche DNA-Deletionen zur Integration von Fragmenten (Neuanordnung der Gene). Weitere Zellteilungen führen zu somatischen Mutationen der integrierten Gene; dies ist großer Bedeutung für die Reifung der Immunantwort.

Die leichten und die schweren Ketten der Antikörper sind auf 50–300 Genorten der Keimbahn codiert. Diese Zahl variiert von Art zu Art. Die Keimbahn trägt also ihren Teil zur Bildung der Diversität bei. Rekombination und Genkonversion sind wahrscheinlich wichtige Ereignisse für Erhaltung und Evolution dieses „Genpools“ der Keimbahn; wir wissen jedoch noch nicht, inwieweit diese Ereignisse für die somatische Entstehung der Diversität bedeutsam sind^[41]. Abbildung 7 zeigt, daß die schwere Kette der V-Region von V-, D- und J-Segmenten und die leichte Kette von V- und J-Segmenten codiert wird. Die Kombination der Fragmente zu einem einzigen Gen ist – obwohl eine wichtige Komponente bei der Entstehung der Antikörper-Diversität – nicht der von der Mini-Gen-Hypothese^[42] vorhergesagte kritische Mechanismus. Wichtig ist auch die Diversität, die bei der Verknüpfung der Genfragmente entsteht, denn dieser Vorgang verläuft fehlerhaft; Ähnliches wird auch von anderen Theorien vorhergesagt^[43]. Ferner gibt es somatische Punktmutationen, deren Mechanismus noch geklärt werden muß. Verursacht werden könnten sie durch nicht fehlerfrei arbeitende Reparatur-Enzyme^[7], durch genetische „hot spots“^[24], durch Selektion, durch das Antigen^[44] oder andere Netzwerkelemente^[45] oder durch eine Kombination aller dieser Faktoren. Die Prägungstheorien waren schnell vergessen, als die chemische Diversität von Antikörpern bekannt wurde^[46]. Aber auch sie könnten ein Körnchen Wahrheit enthalten. Vor kurzem wurde bekannt, daß bewegliche Segmente eines Peptidantagens bessere Immunogene sind als unbewegliche, wahrscheinlich weil sie ihre Struktur der Bindungsstelle eines vorgeprägten Antikörpers besser anpassen können^[47, 48]. Es besteht ferner die Möglichkeit, daß auch die Antigenbindungsstelle etwas flexibel ist und sich bis zu einem gewissen Grad der Antigenstruktur anpassen kann. Natürlich muß als Preis für die dynamische Adaptation eine Affinitätsminderung in Kauf genommen werden. Adaptationsfähigkeit darf nicht mit Spezifitätsbildung verwechselt werden. Später werde ich diskutieren, wie eine verbesserte Paßform für den Liganden durch somatische Mutationen und Antigenselektion zustandekommt.

Molekulare Analyse einer Immunantwort durch monoklonale Antikörper und mRNA-Sequenzierung

Wenden wir uns nun wieder der Immunisierung eines Tieres mit einer bestimmten Substanz zu. Das Immunsystem erkennt die Substanz als fremd, so daß B-Zellen zur Antikörperproduktion stimuliert werden (Abb. 8). Die Antikörper werden sekretiert und im Serum mit anderen vermischt. Die einzelnen Antikörpermoleküle sind einander extrem ähnlich und können nach einer Vermischung nicht mehr getrennt werden. Aus diesem Grund war es vor Einführung der Hybridom-Technologie unmöglich, die Antikörper-Diversität als Antwort auf ein Immunogen zu untersuchen. Durch unsterbliche Zellhybride können nun einzelne Antikörper getrennt produziert werden, entweder in Zellkultur oder in Maus-Myelomen. Verschiedene Komponenten des Antigens können jetzt getrennt analysiert werden. Mit monoklonalen Antikörpern gegen bisher undefinierte zelluläre Strukturen lassen sich die chemische Natur und die Funktion dieser Strukturen aufklären. Schließlich können sie als Reagenzien für diagnostische und therapeutische Zwecke dienen. Dies sind nur die wichtigsten Anwendungen, die bis vor wenigen Jahren noch zu überblicken waren^[49]. Heute sind monoklonale Antikörper in Grundlagenforschung, klinischer Biochemie, Therapie und Industrie schon so weit verbreitet, daß ich gar nicht erst versuchen will, dies zu diskutieren.

Verschiedene Antikörper erkennen unterschiedliche antigene Determinanten des Immunogens, und jeder Erkennungsprozeß ist für sich äußerst kompliziert (Abb. 8). Man weiß seit langem, daß selbst die einfachsten antigenen Determinanten von einer Vielzahl von Antikörpermolekülen erkannt werden. Monoklonale Antikörper können rein hergestellt werden und zur Beantwortung der alten Frage beitragen, wie viele Antikörper ein Tier als Reaktion auf ein bestimmtes Antigen produziert und inwieweit diese einzelnen Moleküle sich voneinander unterscheiden. Dies führt mich zur Sequenzierung von mRNA zurück.

Während der Enthusiasmus über monoklonale Antikörper und DNA-Rekombinationstechniken in den späten

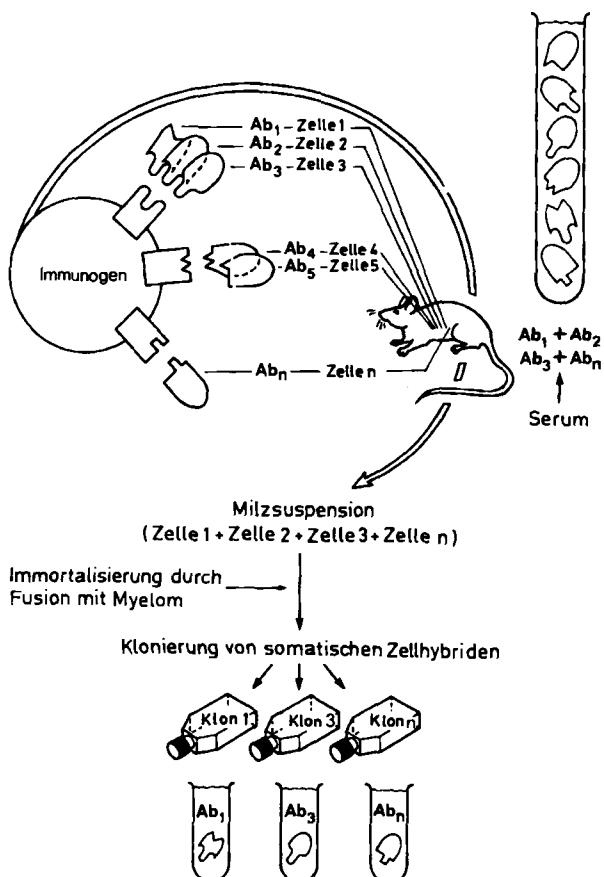


Abb. 8. Schritte der Immunantwort und ihre Analyse mit Hilfe der Hybridom-Technologie. Wird einem Tier ein Immunogen injiziert, so produziert das Tier sehr viele verschiedene Antikörper (Ab_1 - Ab_n): gegen verschiedene Antigene, gegen verschiedene Determinanten derselben Antigens und sogar verschiedene Antikörper gegen die gleiche Determinante. Sie alle gelangen ins Serum, und eine Trennung der einzelnen Komponenten ist unmöglich. Dabei wird jeder Antikörper von einer bestimmten Zelle produziert. Werden die antikörperproduzierenden Zellen durch somatische Zellfusion unsterblich gemacht und geeignete Hybridzellen kloniert, so kann jeder einzelne Antikörper in einem anderen Gefäß hergestellt werden. Die Hybridzellen werden dann Tieren injiziert, wo sie myelomatige Tumoren entwickeln. Das Serum tumortragender Tiere enthält große Mengen monoklonaler Antikörper.

siebziger Jahren allerorts anhielt, wendete *Pamela Hamlyn Sangers* Methode zur schnellen DNA-Sequenzierung auf die mRNA der leichten Ketten an. Ihr Erfolg^[21] half uns, Zelllinien zu entwickeln, die monoklonale Antikörper gegen ganz bestimmte Antigene produzieren. Wir waren nun imstande, die mRNA der jeweiligen Antikörper schnell zu sequenzieren, und anstatt zu fragen „Was ist die Natur der Antikörper-Diversität?“ konnten wir uns nun mit dem Problem beschäftigen „Wie diversifizieren Antikörper bei einer Immunantwort?“ Mit anderen Worten, wie finden alle die Ereignisse auf Genebene, die die Antikörper-Diversität verursachen, tatsächlich als Antwort auf einen Antigenstimulus im Tier statt?

In Zusammenarbeit mit *Matti Kaartinen*, *Gillian Griffiths* und *Claudia Berek* untersuchten wir die Wirkung des Haptens Phenylloxazolon^[50,51]. Abbildung 9 zeigt das Prinzip dieses Versuches. Das an Serumalbumin aus Huhn gekoppelte Hapten wird Mäusen injiziert, die nach 7 oder 14 Tagen getötet werden; dann werden Hybridome hergestellt und willkürlich einige Klone isoliert. Andere Tiere werden erst nach sechs Wochen getötet, so daß Sekundärhybridome hergestellt werden können.

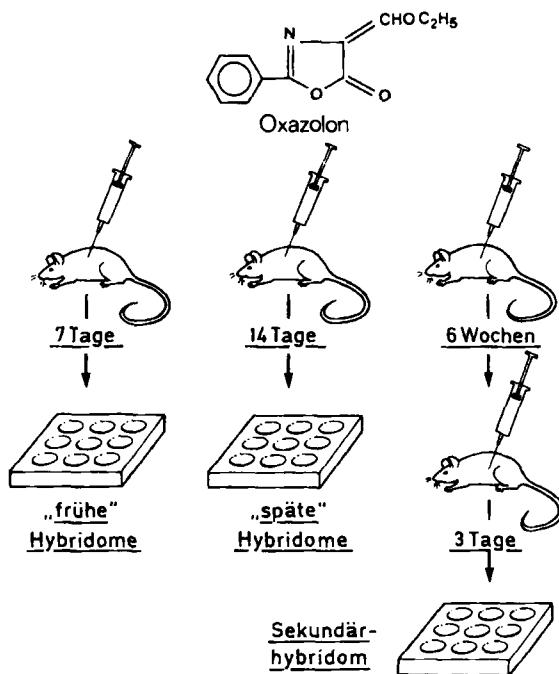


Abb. 9. Herstellung monoklonaler Antikörper zu Beginn und während der Reifung der Immunantwort auf ein Oxazolonderivat.

In Abbildung 10 sind Hybridome, die sieben oder vierzehn Tage nach der ersten Immunisierung erhalten wurden, verglichen. Jeder Punkt in der Abbildung repräsentiert die Avidität eines jeden der 32 monoklonalen Antikörpers. Die Antikörpervielfalt entspricht in beiden Stadien annähernd der Komplexität eines typischen Antiserums.

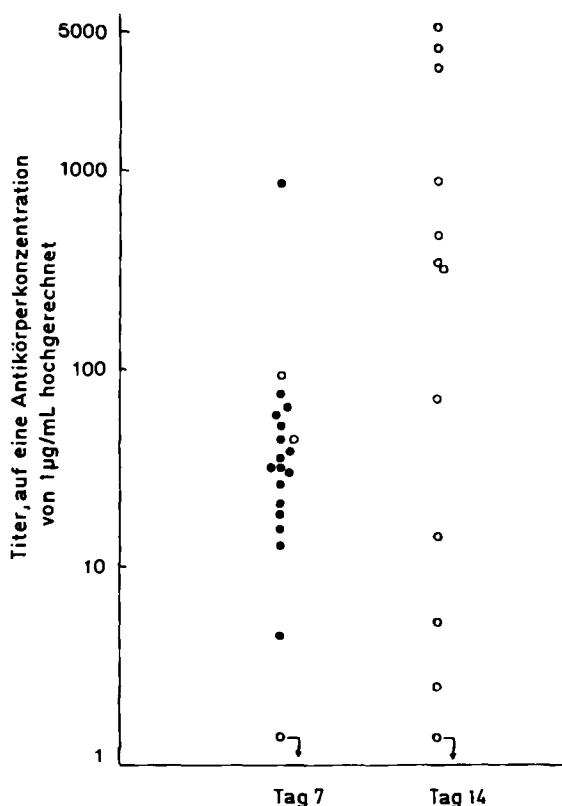


Abb. 10. Die Avidität monoklonaler Antikörper nach sieben und vierzehn Tagen nach der Immunisierung. „Haptened phage inhibition“ (HPI) pro µg anti-phOx-Immunglobulin aus Überständen von IgG-sekretierenden Hybridomen. Links: Fusion nach sieben Tagen, rechts: Fusion nach vierzehn Tagen. ●: Oxazolon-Idiotyp-positive IgG; ○: Idiotyp-negative IgG [50].

Die durchschnittlichen Antikörpertiter in beiden Stadien unterscheiden sich kaum, derjenige nach vierzehn Tagen liegt wie erwartet lediglich etwas höher. Der Antikörpertiter und auch die durchschnittliche Avidität steigen im Verlauf der Immunisierung. Man spricht von einer Reifung der Immunantwort. Die Streuung der Ergebnisse ist nach sieben Tagen viel geringer als nach 14 Tagen.

Da jeder monoklonale Antikörper von einer unsterblichen Hybridomzelle stammt, konnten wir noch weiter gehen und die Aminosäuresequenz jedes monokonalen Antikörpers bestimmen. In der Praxis sequenzierten wir die mRNA, denn das war technisch einfacher und noch informativer. Die RNA der Hybridome wurde isoliert und die

ungereinigten mRNAs direkt sequenziert (Abb. 11). So konnten die Sequenzen von Antikörpern in verschiedenen Stadien der Immunantwort verglichen werden.

Der Großteil der anti-Oxazolon-Antikörper wurde nach sieben Tagen durch einen einzigen Satz von V-Genen der Keimbahn exprimiert, obwohl ein Pool von über 100 für jede der beiden Ketten existiert (Abb. 12). Dieses Genpaar der Keimbahn (wir nennen es V_H -Oxl und V_L -Oxl) wird zu diesem Zeitpunkt in seiner nicht-mutierten Form exprimiert. Die kleinen Unterschiede zwischen den Antikörpern entstehen bei der Verknüpfung der DNA-Fragmente V, D und J, die der variablen Region des Antikörpers entsprechen. Nach vierzehn Tagen scheinen noch immer die Gene

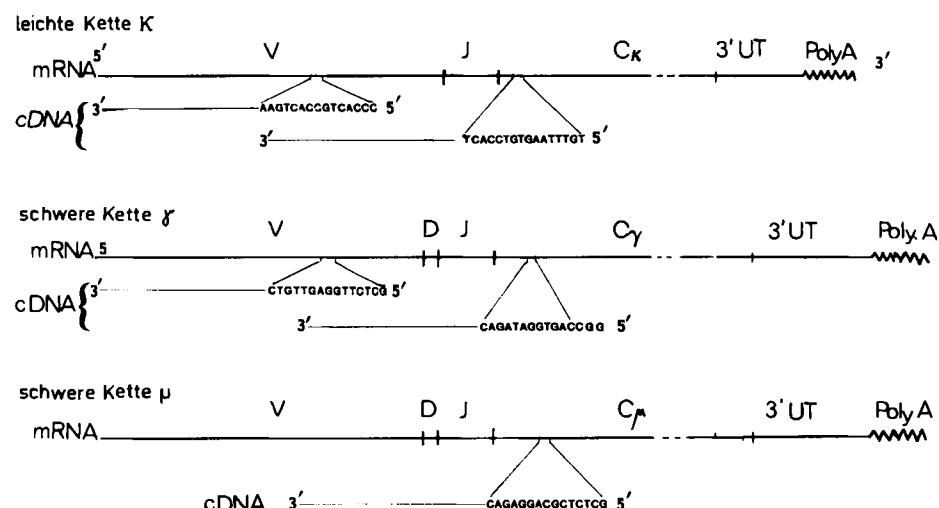


Abb. 11. Strategie zur mRNA-Sequenzierung. Durch synthetische Oligonukleotid-Primer, die mit Basen aus mRNA-Segmenten hybridisieren können, wird eine reverse Transkription initiiert. Dissoziationskonstante können als Stoppsignale in die cDNA eingebaut werden, so daß sich die Nukleotidsequenz bestimmen läßt [59].

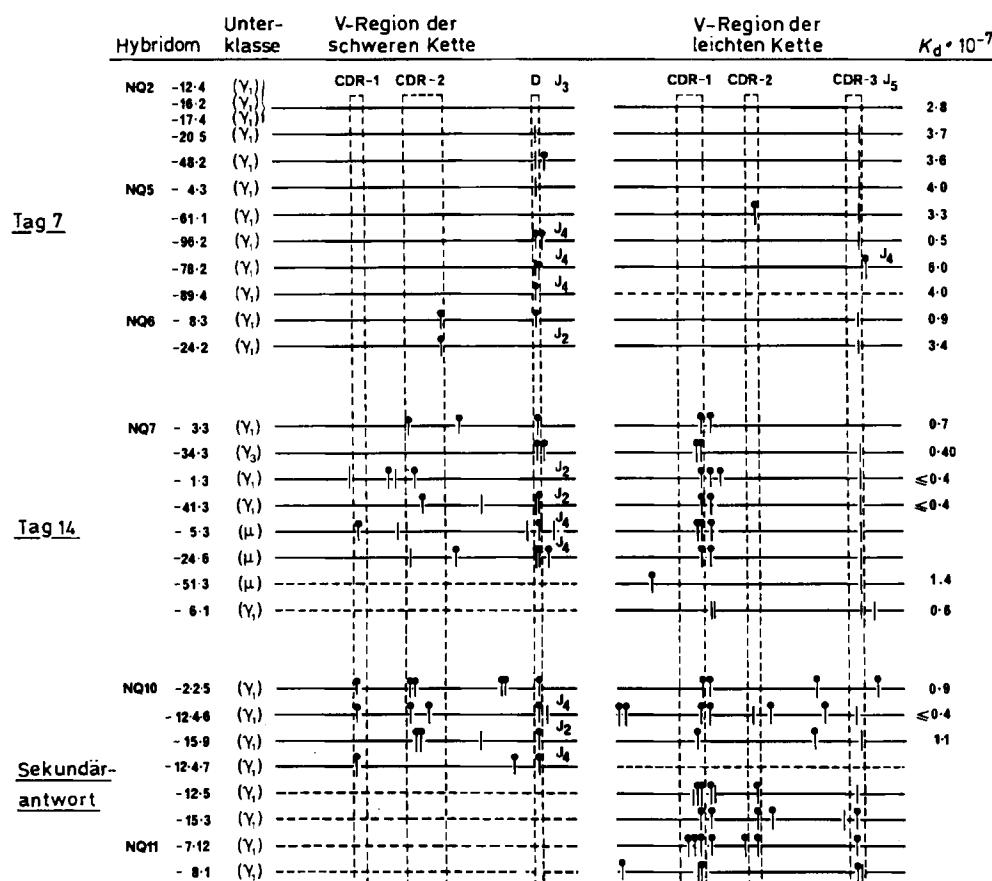


Abb. 12. Vergleich der Sequenz von mRNAs aus anti-phOx-Antikörper-sekretierenden Hybriden in verschiedenen Stadien nach der Immunisierung. Nur die Sequenzen, die dem Prototyp ähneln, sind gezeigt. Die Sequenz der variablen Region eines jeden Hybridoms wurden mit den Sequenzen von V_H -Oxl und V_L -Oxl verglichen. Durchlaufende horizontale Linien bezeichnen identische Sequenzen, unterbrochene Linien solche mit großen Unterschieden. Ein schwarzer Kreis bedeutet, daß diese Veränderungen einen Unterschied in der Aminosäuresequenz erwarten lassen. Komplementäre Regionen (CDR-1, -2, -3) und D- und J-Regionen sind gekennzeichnet, und unterschiedliche J-Segmente sind verdeutlicht. Dissoziationskonstanten, die durch Fluoreszenzlösung bestimmt wurden, sind ganz rechts angegeben [51].

V_H -Oxl und V_k -Oxl exprimiert zu werden; es sind jedoch nun einige Punktmutationen exprimiert, die für die signifikante Zunahme der Affinität zum Hapten verantwortlich sind. Bei Reifung der Immunantwort treten also viele somatische Mutanten auf.

Bei der Sekundärantwort werden auch noch die Genfragmente der Keimbahn exprimiert, die für die Primärantwort charakteristisch sind, sie weisen aber eine etwas höhere Zahl von Punktmutationen auf (Abb. 12). Hauptsächlich werden bei der Sekundärantwort jedoch andere Gene der Keimbahn exprimiert (Tabelle 4).

Tabelle 4. Expression von V-Genen der Keimbahn während der Reifung der Immunantwort auf Oxazolone.

Zeitpunkt der Immunantwort	V_H Oxl- V_k Oxl-Kombination	Andere Kombinationen	V_H Oxl- V_k Oxl-Anteil [%]
Tag 7	11	4	73
Tag 14	6	5	54
nach sechs Wochen	4	18	18

Die Immunantwort auf unser Oxazolon scheint also drei Stadien zu durchlaufen: Im ersten Stadium entstehen die meisten Antikörper durch Kombination einer sehr begrenzten Anzahl von Genfragmenten der Keimbahn; es findet eine „Selbstselektion“ anhand der Fähigkeit, das Antigen zu binden, statt. Im zweiten Stadium vermehren sich die Zellen, die die richtigen Genkombinationen exprimieren, durch Teilung, und es entstehen Mutanten, die Antikörper mit erhöhter Affinität für das Antigen produzieren. Im dritten Stadium erreichen die Antikörper des ersten und zweiten Stadiums eine obere Grenze bei der Optimierung der Dissoziationskonstanten, so daß neue Kombinationen von Keimbahngen und somatische Mutanten selektiert werden. Die drei Stadien gehen nahtlos ineinander über und überlappen sich zum Teil. In vieler Hinsicht verhält sich das System darwinistisch, wobei die Adaptation gleichbedeutend mit verbesserter Bindung des Antigens ist. In welchem Ausmaß noch andere regulatorische Mechanismen in diesen Prozeß eingreifen, bleibt zu klären.

Von monoklonalen Antikörpern zum „Antikörperfengineering“

Durch unsterbliche antikörperproduzierende Zellen können nicht nur Antikörper einer bestimmten chemischen Struktur hergestellt werden; diese Technik bietet auch noch andere Vorteile, allen voran die Möglichkeit der Zellklonierung, die entscheidend zur explosionsartigen Verbreitung der Hybridom-Technologie beitrug. Doch können nur solche Zelllinien, die bereits existieren, kloniert werden. Wir selektieren die Hybride, die monoklonale Antikörper mit den gewünschten Eigenschaften produzieren. Was aber, wenn das immunisierte Tier keine entsprechenden Zellen liefert? Glücklicherweise stehen uns in diesem Fall andere Mittel zur Verfügung.

Hybridome sind etablierte Zelllinien und daher „in-vitro-Manipulationen“, wie sie von der Zellgenetik und molekulärbiologischen Engineering-Techniken bekannt sind, zugänglich. Wir stehen am Beginn einer neuen Ära in der Im-

munchemie, in der Moleküle hergestellt werden können, denen Antikörperstrukturen zugrunde liegen. Die Herstellung bispezifischer Antikörper via Hybrid-Hybridomen ist ein Beispiel für die Anwendung solcher Methoden^[36]. Ein anderes Beispiel ist die Gewinnung von Antikörpermutanten, die einer anderen Antikörperklasse angehören^[52].

Vor einigen Jahren diskutierte ich die Möglichkeit, genetotechnologische Methoden anzuwenden, um noch drastischere Effekte zu erzielen^[53]. Neuere Entwicklungen beweisen die Realisierbarkeit dieser Ideen und das Potential dieser Technologie. Gene von Antikörpern werden in geeignete Vektoren eingebaut, vermehrt, modifiziert und erneut in Myelomzellen gebracht, die dann die rekombinannten Antikörper mit neuen Eigenschaften sekretieren. In meinem Laboratorium hat *Neuberger* eine Zelllinie entwickelt, die einen Maus-Mensch-Antikörper produziert, der aus einer variablen anti-Nitrophenacyl-Region aus der Maus und einer konstanten menschlichen Region der schweren Kette besteht^[54]. In einem anderen Fall wurde die Fc-Region eines Maus-Antikörpers durch *Staphylococcus-Nuclease* ersetzt^[55]. Es entstand ein neuer Antikörper, in dem eine antigenspezifische Fab-Region an einen enzymatischen Effektor gekoppelt ist, der den Fc-Teil ersetzt.

Weitere Modifikationen werden durch die sich rasant entwickelnde ortsspezifische Mutagenese möglich; mit diesem Verfahren können die Antigenbindungsstellen spezifisch verändert werden. Wir werden auf diese Weise testen können, inwieweit einzelne Punktmutationen zur Entstehung hochaffiner Antikörper während der Reifung der Immunantwort beitragen. Dies führt mich zurück zum Problem der Diversität und zur Reifung der Immunantwort.

So spektakulär diese Aussichten auch sind, so braucht man doch zu Beginn die Gene der jeweiligen Hybridomzelllinie. Dann kann die Aminosäuresequenz verändert werden; aber die Auswirkungen auf das Faltungsmuster und die Protein-Ligand-Wechselwirkung ist nach wie vor – außer bei ganz einfachen Fällen – nicht vorhersagbar. Dies wird auch für einige Zeit so bleiben. Erst ein besseres Verständnis der Proteinfaltung wird die völlige Neukonstruktion von Antikörpermolekülen möglich machen.

Während die Immunantwort eines Tieres auf Antikörper-Selektion beruht, wird man künftig in der Immunchemie „instruktiv“ vorgehen, d.h. wir werden vom Antigen „lernen“, welche Antikörperstruktur wir produzieren sollen. Das ist zwar kein Science-fiction, trotzdem werden viele Probleme bei der Übersetzung von eindimensionalen in dreidimensionale Strukturen zu überwinden sein. Der vor uns liegende Weg wird sicherlich mit Fallgruben und Hürden aufwarten, doch die Aussichten sind allemal lohnend – und spannend wird es auch sein. Wie überall gilt auch hier, daß die Sternstunden von morgen die Unbekannten von heute sind.

Die Hybridom-Technologie war ein Nebenprodukt der Grundlagenforschung. Die erfolgreichen Anwendungen beruhen auf unerwarteten und nicht vorhersagbaren Möglichkeiten der Methode. Dies ist ein schlagkräftiges Beispiel dafür, daß eine wissenschaftliche Unternehmung, die anfangs wirtschaftlich und medizinisch uninteressant erscheint, trotzdem eine enorme praktische Bedeutung erlangen kann. Das Projekt begann mit esoterischen Spekulationen, die von der Neugierde genährt wurden, die Natur besser zu verstehen.

Anerkennung gebührt dem Medical Research Council in Großbritannien, der die Bedeutung der Grundlagenforschung für die Medizin erkannte. Wir freuen uns darüber, zu jener glücklichen Minderheit zu gehören, deren Erfolg diese Politik rechtfertigt.

Meine Laufbahn als Wissenschaftler begann im Laboratorium von Stoppani in Argentinien, danach arbeitete ich mit Sanger im Department of Biochemistry in Cambridge. Besonders viel verdanke ich der Atmosphäre im Laboratory of Molecular Biology, in dem die hier beschriebenen Arbeiten durchgeführt wurden, und das in dieser Zeit hauptsächlich von Max Perutz geleitet wurde; innerhalb des Instituts gehörte ich zur Abteilung Protein and Nucleic Acid Chemistry, der Fred Sander vorsteht. Von beiden kam die unausgesprochene Direktive, die ich in Gedanken mit „mach gute Experimente und sorge dich nicht um das Übrige“ übersetzte.

Im Laufe meines Vortrages habe ich versucht, jenen meiner Mitarbeiter zu danken, deren Beiträge entscheidend in bestimmten Phasen unserer Arbeit waren. Bis jetzt nicht erwähnt habe ich John Jarvis, der seit über zwanzig Jahren mein persönlicher Assistent ist – nur wenige Monate mehr beschäftigte ich mich mit Immunologie. Da dieser Preis für die Entdeckung des Prinzips der Hybridom-Technologie vergeben wird, möchte ich besonders die bedeutenden Beiträge von Dick Cotton und David Secher nennen, deren vorbereitende Arbeiten zu dieser Entdeckung führten, ferner die meiner Assistentin für Gewebekultur, Shirley Howe, die nicht nur Vorstudien durchführte, sondern auch an bestimmten Experimenten mit George Köhler zusammenarbeitete. Weiter danke ich jenen Mitarbeitern, die die praktische Bedeutung der Hybridom-Technologie aufzeigten, besonders G. Galfré, A. R. Williams und A. C. Cuello sowie meinem technischen Assistenten Mr. B. W. Wright. Diese Liste müßte viel länger sein, aber ich will sie nicht schließen, ohne meinen Sekretärinnen Margaret Dowding und Judith Firth zu danken. Ihr Umgang mit der Presse kurz nach dem Bekanntwerden der Zuerkennung dieses Preises gehört zu meinen besten Erinnerungen an diesen aufregenden Augenblick.

Eingegangen am 13. März 1985 [A 547]
Übersetzt von Dipl.-Biol. Christiane Koszka, Wien

- [1] a) G. M. Edelman, *Angew. Chem.* 85 (1973) 1083–1097; b) R. R. Porter, *Angew. Chem.* 85 (1973) 1097–1101.
- [2] C. Milstein, *J. Mol. Biol.* 9 (1964) 836.
- [3] C. Milstein, *Biochem. J.* 101 (1966) 352–368.
- [4] N. Hilschmann, L. C. Craig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53 (1965) 1403–1409.
- [5] a) B. Frangione, C. Milstein, J. R. L. Pink, *Nature London* 221 (1969) 145–148; b) J. Svasti, C. Milstein, *ibid.* 228 (1970) 930–935.
- [6] W. J. Dreyer, C. J. Bennett, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54 (1965) 864–869.
- [7] S. Brenner, C. Milstein, *Nature London* 211 (1966) 242–243.
- [8] O. Smithies, *Science* 157 (1967) 267–273.
- [9] C. Milstein, *Nature London* 216 (1967) 330–332.
- [10] C. Milstein, C. P. Milstein, A. Feinstein, *Nature London* 221 (1969) 151–154.
- [11] T. T. Wu, E. A. Kabat, *J. Exp. Med.* 132 (1970) 211–250.
- [12] Übersicht: L. M. Amzel, R. S. Poljak, *Annu. Rev. Biochem.* 48 (1979) 961–997.
- [13] C. Milstein, J. R. L. Pink, *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 21 (1970) 209–263.
- [14] M. Potter, *Physiol. Rev.* 52 (1972) 631–719.
- [15] K. Horibata, A. W. Harris, *Exp. Cell Res.* 60 (1970) 61–70.
- [16] J. Stavnezer, R.-C. C. Huang, *Nature London New Biol.* 230 (1971) 172.
- [17] C. Milstein, G. G. Brownlee, T. M. Harrison, M. B. Mathews, *Nature London New Biol.* 239 (1972) 117–120.
- [18] T. M. Harrison, G. G. Brownlee, C. Milstein, *Eur. J. Biochem.* 47 (1974) 613–620.
- [19] G. G. Brownlee, E. M. Cartwright, N. J. Cowan, J. M. Jarvis, C. Milstein, *Nature London* 244 (1973) 236–240.
- [20] C. Milstein, G. G. Brownlee, E. M. Cartwright, J. M. Jarvis, N. J. Proudfoot, *Nature London* 252 (1974) 354–359.
- [21] P. H. Hamlyn, M. J. Gait, C. Milstein, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 4485–4494.
- [22] R. G. H. Cotton, D. S. Secher, C. Milstein, *Eur. J. Immunol.* 3 (1973) 136–140.
- [23] K. Adetugbo, C. Milstein, D. S. Secher, *Nature London* 265 (1977) 299–304.
- [24] D. S. Secher, C. Milstein, K. Adetugbo, *Immunol. Rev.* 36 (1977) 51–72.
- [25] R. G. H. Cotton, C. Milstein, *Nature London* 244 (1973) 42–43.
- [26] S. Rudikoff, A. M. Giusti, W. D. Cook, M. D. Scharff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 1979–1983.
- [27] G. Galfré, S. C. Howe, C. Milstein, G. W. Butcher, J. C. Howard, *Nature London* 266 (1977) 550–552.
- [28] T. Pearson, G. Galfré, A. Ziegler, C. Milstein, *Eur. J. Immunol.* 7 (1977) 684–690.
- [29] A. F. Williams, G. Galfré, C. Milstein, *Cell* 12 (1977) 663–673.
- [30] P. L. Stern, K. R. Willison, E. S. Lennox, G. Galfré, C. Milstein, D. S. Secher, A. Ziegler, *Cell* 14 (1978) 775–783.
- [31] C. Milstein, G. Galfré, D. S. Secher, T. Springer, *Ciba Found. Symp.* 66: („Human Biology: Possibilities and Realities“) Excerpta Medica: Amsterdam 1979, S. 251–266.
- [32] A. C. Cuello, G. Galfré, C. Milstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 3532–3536.
- [33] D. Voak, S. Sacks, T. Alderson, F. Takei, E. S. Lennox, J. M. Jarvis, C. Milstein, J. Darnborough, *Vox Sang.* 39 (1980) 134–140.
- [34] D. S. Secher, D. C. Burke, *Nature London* 285 (1980) 446–450.
- [35] G. Galfré, C. Milstein, B. W. Wright, *Nature London* 277 (1979) 131–133.
- [36] C. Milstein, A. C. Cuello, *Nature London* 305 (1983) 537–540.
- [37] T. H. Rabbitts, C. Milstein, *Contemp. Top. Mol. Immunol.* 6 (1977) 117–143.
- [38] S. Tonegawa, N. Hozumi, G. Matthysse, R. Schuller, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 41 (1976) 877–889.
- [39] *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 41 (1976).
- [40] Übersicht: S. Tonegawa, *Nature London* 302 (1983) 571–581.
- [41] G. M. Edelman, J. A. Gally, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57 (1967) 353–358.
- [42] E. A. Kabat, T. T. Wu, H. Bilofsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 2429–2433.
- [43] F. W. Alt, D. Baltimore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 4118–4122.
- [44] M. Cohn, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 190 (1971) 529.
- [45] N. K. Jerne, *Eur. J. Immunol.* 1 (1971) 1–9.
- [46] F. Haurowitz, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 32 (1967) 559–567.
- [47] E. Westhof, D. Altschuh, D. Moras, A. C. Bloomer, A. Mondragon, A. Klug, M. H. V. Van Regenmortel, *Nature London* 311 (1984) 123–127.
- [48] J. A. Tainer, E. D. Getoff, H. Alexander, R. A. Houghton, A. J. Olson, R. A. Lerner, W. A. Hendrickson, *Nature London* 312 (1984) 127–134.
- [49] Siehe z. B.: H. Waldmann, C. Milstein in P. J. Lachmann, D. K. Peters (Hrsg.): *Clinical Aspects of Immunology*, Vol. I, 4. Aufl., Blackwells Scientific Publications, Oxford 1982, S. 476–503.
- [50] M. Kaartinen, G. M. Griffiths, P. H. Hamlyn, A. F. Markham, K. Karjalainen, J. L. T. Pelkonen, O. Mäkelä, C. Milstein, *J. Immunol.* 130 (1983) 937–945.
- [51] G. M. Griffiths, C. Berek, M. Kaartinen, C. Milstein, *Nature London* 312 (1984) 271–275.
- [52] J. L. Preud'homme, B. K. Birshtein, M. D. Scharff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 1427–1430.
- [53] C. Milstein, *Proc. R. Soc. London B* 211 (1981) 393–412 (Wellcome Foundation Lecture).
- [54] M. S. Neuberger, G. T. Williams, E. B. Mitchell, S. S. Jouhal, J. G. Flanagan, T. H. Rabbitts, *Nature London* 314 (1985) 268–270.
- [55] M. S. Neuberger, G. T. Williams, R. O. Fox, *Nature London* 312 (1984) 604–608.
- [56] G. Köhler, C. Milstein, *Nature London* 256 (1975) 495–497.
- [57] W. Szybalski, E. H. Szybalska, G. Ragni, *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 7 (1962) 75–89.
- [58] G. Galfré, C. Milstein, *Methods Enzymol.* 73 (1981) 3–46.
- [59] M. Kaartinen, G. M. Griffiths, A. F. Markham, C. Milstein, *Nature London* 304 (1983) 320–324.
- [60] J. C. Howard, G. W. Butcher, G. Galfré, C. Milstein, C. P. Milstein, *Immunol. Rev.* 47 (1979) 139–174.
- [61] T. Pearson, G. Galfré, A. Ziegler, C. Milstein, *Eur. J. Immunol.* 7 (1977) 684–690.
- [62] C. J. Barnstable, W. F. Bodmer, G. Brown, G. Galfré, C. Milstein, A. F. Williams, A. Ziegler, *Cell* 14 (1978) 9–20.
- [63] T. Springer, G. Galfré, D. S. Secher, C. Milstein, *Eur. J. Immunol.* 8 (1978) 539–551.
- [64] T. Springer, G. Galfré, D. S. Secher, C. Milstein, *Eur. J. Immunol.* 9 (1979) 301–306.
- [65] F. Takei, H. Waldmann, E. S. Lennox, C. Milstein, *Eur. J. Immunol.* 10 (1980) 503–509.
- [66] A. J. McMichael, J. R. Pilch, G. Galfré, D. Y. Mason, J. W. Fabre, C. Milstein, *Eur. J. Immunol.* 9 (1979) 206–210.
- [67] A. C. Cuello, J. V. Priestly, C. Milstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 665–669.
- [68] D. Voak, E. S. Lennox, S. Sacks, C. Milstein, J. Darnborough, *Med. Lab. Sci.* 39 (1982) 109–122.