

# Herstellung und Diversifizierung von monoklonalen Antikörpern (Nobel-Vortrag)\*\*

Von Georges Köhler\*

Eine Maus kann zehn Millionen verschiedene Antikörper produzieren, von denen jeder von einem eigenen B-Lymphozyten hergestellt wird. Etwa tausend verschiedene Antikörper sind in der Lage, eine einzige antigene Determinante zu erkennen. Wenn man eine normale Immunantwort analysiert, die eine Maus auf eine solche Determinante gibt, findet man nur fünf bis zehn verschiedene Antikörper, die wahrscheinlich eine rein zufällige Auswahl aus dem gesamten Repertoire sind. Selbst Seren, die nur Antikörper gegen eine einzige Determinante enthalten und die man durch allogene Immunisierung und adsorptive Reiniung erhält, zeigen noch vier Nachteile:

1. Die Titer sind niedrig.
2. Die Antikörperpopulation, obwohl spezifisch für nur eine einzige Determinante, ist nichtsdestoweniger heterogen.
3. Der Vorrat ist limitiert.
4. Es ist unmöglich, dieselbe Kombination spezifischer Antikörper in einem anderen Tier zu reproduzieren.

Die Methode der Lymphozytenfusion, die zusammen mit C. Milstein, MRC, Cambridge (England), entwickelt wurde, liefert eine Handhabe, um diese Nachteile zu überwinden (Abb. 1). Myelomzellen (Tumorzellen) einer Maus werden mit Milzzellen aus einer vorher mit einem Antigen immunisierten Maus fusioniert. Etwa 50% der Hybridzellen haben die erwünschte Kombination parentaler Eigenschaften: Starkes Wachstum in Zellkultur ist die von der Myelomzelle eingebrachte Eigenschaft, während die Fähigkeit zur Antikörperproduktion von der B-Zelle aus der Milz stammt. Ein relativ hoher Anteil der Hybridomazellen sezerniert Antikörper, die für das zur Immunisierung verwendete Antigen spezifisch sind<sup>[1,2]</sup>. Diese Technik hat folgende Vorteile:

1. Nur eine Spezifität. Jeder Hybrid-Zellklon produziert nur einen Antikörper.
2. Unbegrenzter Vorrat an Antikörpern. Die Hybridzellen sind unsterblich wie Tumorzellen, können eingefroren werden, sezernieren 10–50 µg/mL Antikörper in das Kulturmedium und produzieren, wenn sie in Mäuse injiziert werden, Titer in der Größenordnung von 1–10 mg Antikörper pro mL Körperflüssigkeit.
3. Ungereinigte Antigene erbringen reine Antikörperreaktanten. Der monoklonale Antikörper charakterisiert

definitionsgemäß nur eins aus der Vielzahl der in die Maus injizierten Antigene.

4. Alle Spezifitäten können erhalten bleiben. Es wurde beobachtet, daß spezifische Hybridome immer dann entstehen, wenn eine Immunantwort in der Maus hervorgerufen werden kann.
5. Anreicherung spezifischer Hybridome. Spezifische B-Zellen sind sogar in der Milzzellpopulation immunisierter Mäuse selten; in der entsprechenden Hybridomapopulation sind sie jedoch um das 10- bis 100fache angereichert.
6. Dominanz der Antikörpersekretion. B-Zell-Hybridome sezernieren hohe Antikörpermengen unabhängig davon, ob auch die normale B-Zelle dies tat.
7. Antikörper werden manipulierbar. Die Hybridomazelllinien können mutiert werden und produzieren dann Antikörper, die man in der Natur nicht findet.
8. Es handelt sich um eine allgemein anwendbare Methode. Bisher wurde die Zelfusion nur zur Rettung von T-Zell-Funktionen angewendet; dadurch konnten T-Hybridomazelllinien erzeugt werden, die verschiedene Lymphokine sezernieren und Killerfunktion oder Helfer- und Suppressoraktivitäten ausüben.

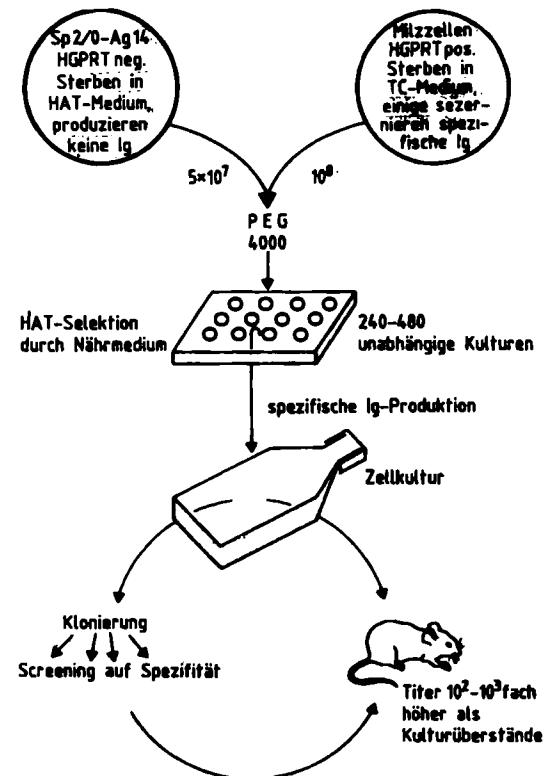


Abb. 1. Die Hybridomatechnik. Die Fusionslinie Sp2/0-Ag14 stammt selbst aus einer Hybridomazelle und produziert keine endogenen Immunglobuline [61]. HGPRT = Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase, ein Enzym, das für die DNA-Synthese benötigt wird, wenn der normale Syntheseweg durch Aminopterin blockiert ist. HAT = Nährmedium aus Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin [1, 62, 63]. PEG = Polyethylenglycol.

[\*] Prof. Dr. G. Köhler

Basel Institute for Immunology  
Grenzacherstrasse 487, CH-4058 Basel (Schweiz)

Neue Adresse:  
Max-Planck-Institut für Immunbiologie  
Postfach 1169, D-7800 Freiburg

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

Einige ausgewählte Anwendungen monoklonaler Antikörper sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1. Anwendungsgebiete für monoklonale Antikörper.

Aufgabe	Anwendung	Erfolg/ Beispiel	Lit.
Definieren von antigenen Determinanten	- auf Bakterien Viren Parasiten - auf Zellen	Klassifizierung wird leichter [4] [5] elf menschliche T-Zell-Antigene gefunden Typisierung von Histokompatibilitäts-Antigenen Tumor-Antigene	[3] [6] [7] [8, 11]
Reinigen	- Peptide, Proteine, Hormone - Zellmembranen	5000fache Anreicherung von Interferon 200fache Anreicherung des Ia-Antigens der Ratte	[9] [10]
Auffinden und Quantifizieren	- in Rohgemischen	menschliches Chorion-Gonadotropin bei Schwangerschaftstests	[11]
Kartieren	- Epitopcharakterisierung	sieben Determinanten auf Maus-μ-Ketten (konstante Region)	[12]
Modifizieren	- Infektiosität - Toxizität - Funktion - Immunogenität	Sporozooten von <i>Plasmodium berghei</i> Digoxin-Überdosis α Ly2 unterdrückt T-Zell-Killerfunktion α-Rhesusfaktor	[13] [14] [15] [16]
Auswählen	- α-Idiotyp - Mutationen	Verstärkung und Unterdrückung der anti-NP-Immunität Histokompatibilitäts-Antigen	[17] [18]
Lokalisieren	- in Organen - im Körper	Influenza-A-Virus Nervensystem des Blutegels Tumordarstellung im Menschen	[19] [20] [21]

Früher wurden konventionelle Seren benutzt, um Antigene zu definieren, zu reinigen, zu quantifizieren, zu kartieren, zu modifizieren, auszuwählen und zu lokalisieren. Von wenigen Ausnahmen abgesehen<sup>[18, 19]</sup> haben die monoklonalen Antikörper also nicht zu Anwendungen geführt, über die vorher nicht nachgedacht worden war. Als spezifisch reagierende, reine Chemikalien mit unbeschränktem Vorrat ersetzen sie jedoch die konventionellen Seren und tragen dadurch zu einer weltweiten Standardisierung von Reaktionen bei, die durch Antikörper vermittelt werden.

Zu den großen Vorteilen der Hybridomazelllinien zählt nicht nur die Produktion monoklonaler Antikörper, son-

dern auch die Verfügbarkeit der Maschinerie, die sie produziert. Dies ermöglicht die Diversifizierung eines spezifischen Antikörpers: Man kann auf Mutationen selektieren, man kann neue immunglobulinspezifische schwere und leichte Ketten in Hybridomazelllinien einfügen, man kann die Antikörpergene klonieren, in vitro mutieren und in Zelllinien oder in die Keimbahn einer Maus einführen. Die Varianten geben einen Einblick in Struktur-Funktions-Beziehungen bei Immunglobulinen sowie deren RNAs und Genen. Aus der Analyse von Varianten wurden auch eine recht spekulative Hypothese über die Wechselwirkung von H- und L-Ketten in Multigenfamilien abgeleitet.

## Diversifizierung von monoklonalen Antikörpern

Viele Forscher haben Varianten monoklonaler Antikörper erzeugt (Tabelle 2), die vielleicht interessantere Eigenschaften haben als die, welche ich hier beschreiben werde. Dies ist jedoch eine Darstellung der Entwicklung aus persönlicher Sicht und soll kein zusammenfassender Überblick sein. Der Bericht konzentriert sich, wenn möglich, auf Experimente mit der Hybridomazelllinie Sp6/HLGK. Die Linie stammt aus einer Balb/c-Maus, die mit Trinitrophenyl-lipopolysaccharid (TNP-LPS) immunisiert worden war. Sie sezerniert ein Immunglobulin aus einer schweren μ-Kette, die mit einer leichten κ-Kette mit anti-TNP-Spezifität assoziiert ist (bei Sp6 und äquivalenten Hybridomen mit HL bezeichnet), außerdem eine γ- und eine ε-Kette, die vom Myelom-Fusionspartner X63-Ag8 herrühren (bei Sp6 und äquivalenten Hybridomen mit GK bezeichnet)<sup>[2]</sup>.

Tabelle 2. Mutationen und Änderungen in Zelllinien, die monoklonale Antikörper produzieren.

Selektion	Mutation/Änderung	Häufigkeit	Lit.
Verlust des Isotyps	Verlust der H- oder L-Kette Deletion von Domänen Verlust von λ-Ketten-Sekretion aufgrund von Punktmutationen	1/10 <sup>2</sup> 1/10 <sup>3</sup> > 1/10 <sup>4</sup>	[22] [23, 24] [25, 26]
Änderung des isoelektrischen Punkts	Deletion von Domänen Rasterverschiebung, Punktmutationen	1/10 <sup>3</sup>	[27]
Zellsorter, positive Selektion auf veränderten Isotyp	Änderung des Isotyps, oft mit Deletionen verbunden	≈ 1/10 <sup>5</sup> –1/10 <sup>7</sup>	[28–30]
Verlust des Idiotyps, Verlust und Gewinn der Antigenbindungsfähigkeit	mögliche Genkonversion, Punktmutationen	1/10 <sup>2</sup> –1/10 <sup>3</sup>	[31–33]
Verlust der lytischen Aktivität	Deletionen, Rasterverschiebung, Insertionen	1/10 <sup>3</sup> –1/10 <sup>4</sup>	[34–36]
„Reverse Genetik“	Chimäre Antikörper $V_H \cdot C_x$ $V_{\text{Maus}} \cdot C_{\text{Mensch}}$		[37, 38] [39, 40]
Sekundäre Hybride	Antikörper-Enzym Monovalente Antikörper zwei Spezifitäten Komplementierung der Spezifität		[41] [41a] [41b] [49]

## Varianten mit Verlust von Immunglobulinketten führen zur Hypothese der Toxizität der schweren Kette

Die ersten Hybridome produzierten alle zwei Immunglobuline: Das eine stammte vom spezifischen Lymphozyten, das andere vom Myelom. Sie gehörten daher, wie Sp6, zum HLGK-Typ. Um ausschließlich spezifische Antikörper zu erhalten, wurden Sublinien selektiert, die die nicht-spezifischen G- und K-Ketten des Myelom-Fusionspartners nicht mehr produzierten<sup>[2, 42]</sup>. Es wurde beobachtet, daß schwere Ketten (H, G) leichter verlorengehen als leichte Ketten (L, K). Beim Beispiel Sp6 vollzog sich der Kettenverlust in der Reihenfolge Sp6/HLGK → Sp6/HLK → Sp6/HL und nicht Sp6/HLGK → Sp6/HLG → Sp6/HL. Dies erinnerte an Resultate von *Coffino* und *Scharff* et al.<sup>[22, 43]</sup>, die bei der Myelomlinie MPC11 einen Verlust von  $1 \cdot 10^{-3}$  bis  $2 \cdot 10^{-3}$  schweren Ketten pro Zelle und Generation beobachteten, ein Verlust leichter Ketten fand jedoch noch nicht einmal mit einer 100mal niedrigeren Häufigkeit statt. Nach einem Verlust von schweren Ketten gehen leichte Ketten jedoch in ähnlichem Ausmaß wie schwere Ketten verloren.

Um die Allgemeingültigkeit dieser Beobachtung zu prüfen, wurde eine Reihe von Hybridomalinen etabliert, die drei, zwei und einen Antikörper produzieren, und ihre Varianten mit Kettenverlust wurden überwacht (Tabelle 3<sup>[42]</sup>). L-Ketten-Verlust wurde zunehmend nur in solchen Kombinationen unterbunden, die einen ansteigenden Überschuß an H-Ketten produzierten. Daraus wird geschlossen, daß schwere Ketten, die nicht mit genug leichten Ketten aufgewogen werden, toxisch für die Zellen sind. Die Zelllinien, die schwere Ketten im Überschuß produzieren, haben ein verminderteres Wachstum und können nicht aus der Zellpopulation „herauskloniert“ werden. Eine zusätzliche Stütze für die Hypothese der Toxizität schwerer Ketten lieferte die Analyse von Sp6-Varianten. Eine Sublinie (Sp6/HLk) wurde etabliert, die eine veränderte K-Kette produzierte, welche mit geringerer Effizienz mit der H-Kette kombinierte (diese Eigenschaft wird durch den kleinen Buchstaben k in Sp6/HLk symbolisiert). Die Sp6/HLk-Linie verlor L mit einer tausendmal niedrigeren Frequenz als die ursprüngliche Sp6/HLK-Linie<sup>[34, 42]</sup>. Wir schlossen daraus, daß die Variante k die parentale K-Kette nicht darin ersetzen konnte, eine toxische Anhäufung freier H-Ketten zu verhindern. Wir haben die H- und L-Ketten-Gene von Sp6 kloniert und sie getrennt oder miteinander verbunden wieder in die Myelomlinie X63Ag8.6.5.3. eingeführt, die kein

Tabelle 3. Toxizität der H-Kette.

Ig-Ketten der Ausgangslinie	→ Verlust der H- oder L-Ketten	~ Häufigkeits-Verhältnis
3H + 3L	→ $\frac{2H+3L}{3H+2L}$	≈ 2 / 1
2H + 2L	→ $\frac{1H+2L}{2H+1L}$	≈ 8 / 1
1H + 1L	→ $\frac{0H+1L}{1H+0L}$	≥ 100 / 1
2H + 3L 1H + 2L 0H + 1L	→ L-Verlust so häufig wie H-Verlust	

Tabelle 4. Expression klonierter Sp6-μ- und -κ-Gene in X63Ag8.6.5.3-B-Myelomzellen [a].

Gen	DNA-Kopienzahl	RNA [%] (bezogen auf Sp6-Eltern)	Protein [%] (bezogen auf Sp6-Eltern)
		μ	κ
κ	50 (41)	—	62 (10)
μ	7 (8)	1.3 (9)	—
μ + κ	5 (11)	6 (8)	4 (8)
μ + κ	≈ 1	5	13

[a] Daten von J. McCubrey, unveröffentlicht. – In Klammern: Anzahl der untersuchten stabilen Zelllinien.

Immunglobulin produziert (Tabelle 4). Falls freie schwere Ketten toxisch für die Zelle sind, sollten wir erwarten, daß „Nur-μ-Transformanden“ selektiert werden, die niedrigere Mengen an μ-Ketten als (μ und κ)-Transformanden produzieren. Zwischen diesen beiden Transformandengruppen wurde ein fünf- bis dreizehnfacher Unterschied beobachtet. Durchschnittlich findet man in den Nur-μ-Transformanden hundertmal weniger μ-RNA oder Protein als in den Sp6-Eltern. Dieser niedrige Anteil ist vergleichbar mit dem, der in nur μ exprimierenden Prä-B-Zellen gefunden wurde<sup>[44]</sup>, und er ist möglicherweise für die Zellen nicht mehr toxisch. Bei Proteinen, die so wie H und L in Immunglobulinen aus zwei verschiedenen Untereinheiten bestehen, wird eine Kette oft im Überschuß produziert (L-Ketten in Zellen, die Immunglobulin produzieren). Gegen potentiell toxische Effekte von freien leichten, jedoch nicht von freien schweren Ketten wird daher selektiert werden. In der multigenen Ig-Familie mit etwa 5000–10000 H- und 250 L-Ketten könnte die Eliminierung von Zellen, die H-L-Paare mit zu geringen Affinitäten für eine Antikörperbildung produzieren, ein wichtiger Kontrollmechanismus sein.

Somatische Mutanten von H- und L-Ketten dominieren späte Immunantworten<sup>[45, 46]</sup>. Es ist vorstellbar, daß Mutationen in den variablen Regionen von H- und L-Paaren mit ursprünglich niedriger Affinität deren Paarungsaffinität erhöhen. Solche Zellen verhindern eine durch die Toxizität freier H-Ketten hervorgerufene Eliminierung und tragen zur somatischen Diversifizierung von Antikörpermolekülen bei.

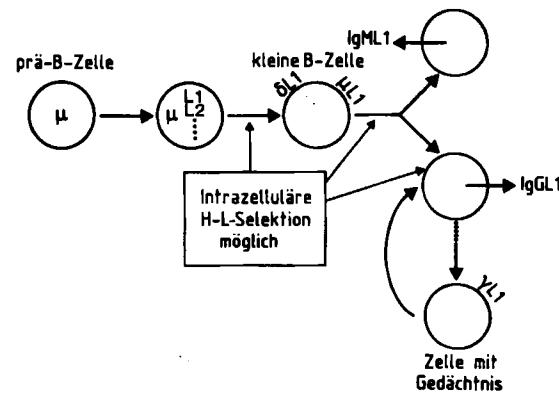


Abb. 2. Schematische Darstellung der Entwicklung von B-Zellen. Die Punkte, an denen eine erhöhte Produktion schwerer Ketten oder die Produktion verschiedener Isotypen der schweren Kette toxisch für die Zelle werden könnten, sind gekennzeichnet. Mutationen in den variablen Regionen, die die Paarungsaffinitäten von schweren (H) und leichten (L) Ketten erhöhen, könnten die Toxizität der freien schweren Ketten verhindern; solche Mutationen könnten angereichert werden.

külen bei. Erhöhung der Ig-Produktion oder Übergang zu anderen Ig-Klassen könnten neue Selektionsrunden induzieren (Abb. 2). Die bevorzugte Assoziation ursprünglicher H-L-Paare in Kompetitionsexperimenten<sup>[47, 48]</sup> sind durch diesen intrazellulären Selektionsmechanismus leicht erklärbar.

### **Antikörperserien mit einer einzigen Spezifität, die durch sekundäre Fusionen erzeugt werden**

Die Sp6/HK- und Sp6/LK-Linien (Abkömmlinge von Sp6/HLGK mit Kettenverlusten) produzieren keine Antikörper mit anti-TNP-Spezifität mehr (eine Eigenschaft, die auf die HL-Kombination beschränkt ist). Beide Linien wurden mit nichtimmunisierten Mausmilzzielen fusioniert, die vier Tage mit dem Mitogen Lipopolysaccharid stimuliert worden waren. Die resultierenden Hybride wurden auf die ursprüngliche anti-TNP-Spezifität getestet<sup>[49]</sup>. In etwa jedem hundertsten Hybridom der Sp6/HK-Linie und in ungefähr jedem zweitausendsten Hybridom der Sp6/LK-Linie war die anti-TNP-Aktivität wieder hergestellt; der zweite Wert war nicht von Werten der Hybridlinie Sp2/0 zu unterscheiden, welche überhaupt keine Ig-Ketten beisteuert. Die Allgemeingültigkeit dieser Aussage wurde durch ähnliche Resultate an drei weiteren Hybridompaaren des HK- oder L-Typs bestätigt. Die HK-Linien konnten leicht komplementiert werden, die L-Linien ergaben „Hintergrund“-Komplementierung. Aus diesen Ergebnissen wurden folgende Schlüsse gezogen<sup>[49]</sup>:

1. Etwa 40 Gene für die variable Region der leichten Kette tragen zum Repertoire an leichten Ketten in der Maus bei.
2. Etwa 250 verschiedene leichte Ketten findet man in nichtstimulierten Milzzielen, was auf die Kombination von 40 V-Region-Genen mit vier J(„Joining“ = verbindenden) Segmenten und ihre frühe somatische Diversifizierung zurückzuführen ist.
3. Etwa 20- bis 40mal mehr schwere als leichte Ketten werden in frühen, nichtstimulierten Milzlymphozyten exprimiert.
4. Eine statistische Analyse der Daten führt zu der Verallgemeinerung, daß man eine vorgegebene Antikörperspezifität finden würde, wenn man alle Kombinationen einer bestimmten leichten Kette mit sämtlichen schweren Ketten testen könnte. Könnte man alle Kombinationen einer bestimmten schweren Kette mit allen leichten Ketten testen, so würde man eine vorgegebene Antikörperspezifität nur in jedem zwanzigsten Fall erhalten.

Die obigen Aussagen müssen mit Vorsicht betrachtet werden, da sie an einer begrenzten Anzahl von Hybridomen gewonnen wurden. Trotzdem meine ich, daß die Hybridomatechnik einen neuen Weg zur Analyse des Problems der Antikörperfertivität eröffnet hat. Sie ermöglicht die getrennte Analyse von H- und L-Ketten, wodurch die enorme Heterogenität, welche die Kombination von schweren und leichten Ketten in Antikörpermolekülen erzeugt, vermieden wird. Die Sp6-Linie ist in zehn Sublinien diversifiziert worden, von denen jede eine andere leichte Kette produziert, die zusammen mit der schweren Kette von Sp6 die ursprüngliche anti-TNP-Aktivität wiederher-

stellt. An solchen Zelllinien können Einsichten über jene Wechselwirkungen zwischen den variablen Regionen von schweren und leichten Ketten gewonnen werden, welche notwendig sind, um eine bestimmte antigenspezifische Bindung zu gewährleisten. Ein praktischer Aspekt solch sekundärer Serien von Antikörpern mit einer einzigen Spezifität wäre die Isolierung von Antikörpern mit niedrigerer Affinität als diejenige der Ausgangslinie. Solche Antikörper könnten für die affinitätschromatographische Reinigung von Antigenen vorteilhaft sein.

### **Diversifizierung durch Mutantenselektion**

Wir haben Mutanten der Sp6- und der PC700(IgM-anti-Phosphorylcholin(PC))-Linien untersucht. Die Selektionsmethode war einfach. Das Hapten TNP oder PC wurde kovalent an die Zellmembranen gebunden. Die Zellen wurden verdünnt und in Gegenwart von Komplement inkubiert. Zellen, die Wildtyp-IgM sezernieren, binden vornehmlich ihre eigenen Antikörper und sterben ab. Zellen, die weniger Wildtyp-IgM oder weniger lytisches IgM ausscheiden, reichern sich an. Drei bis vier Selektionsrunden führen zu einer fast „reinen“ Zellmutantenpopulation. Tabelle 5 faßt die bisher für die Sp6-Linie charakterisierten

Tabelle 5. Mutationen mit Einfluß auf Sp6-Immunglobulin M.

Defekt	Anzahl	Beschreibung	Lit.
nicht bestimmt, vermutlich Punktmutationen	2	10fach niedrigere Affinität 200fach verringerte lytische Aktivität	[34]
Insertion	2	Verlust der L-Produktion oder verringerte L-Produktion	[36]
Deletion	4	Verlust von C $\mu$ 1, C $\mu$ 2, C $\mu$ 3 [a]	[35]
Rasterverschiebung	16	Verlust von C-terminalen Fragmenten	[50]

[a] Nur im PC700-System [52] gefunden.

Mutanten zusammen. Die Deletionsvarianten wurden benutzt, um eine Reihe monoklonaler Antikörper zu kartieren<sup>[12]</sup>. Abbildung 3 zeigt die IgM-Struktur von einigen der Deletionsvarianten und die Zuordnung der monoklonalen Antikörper zu jeder der fünf  $\mu$ -Domänen. Die monoklonalen Antikörper gegen acht definierte, nicht kreuzreagierende Determinanten von Maus- $\mu$ -Ketten wurden benutzt, um neue IgM-Varianten zu definieren<sup>[50]</sup>, um die Clq-Bindung im Areal der Bindung des monoklonalen Antikörpers C2-23 zu kartieren<sup>([38], unveröffentlicht)</sup> und um die Quaternärstruktur einiger der IgM-Mutanten zu bestimmen<sup>[12]</sup>.

### **Diversifizierung durch reverse Genetik**

Das Gen für die leichte Kette von Sp6 ist kloniert und sequenziert worden<sup>[36]</sup>. Das Gen für die variable Region der schweren Kette von Sp6 wurde in das V $\kappa$ -C $\kappa$ -Intron eingefügt, wobei von den HindIII- und XbaI-Restriktionschnittstellen Gebrauch gemacht wurde. Nach Transfektion in die X63 Ag 8.6.5.3(X63/0)-Myelomlinie<sup>[51]</sup> fand man ein chimäres V $\mu$ -C $\kappa$ -Protein (Abb. 4). Eine Fusion dieser Linie mit Sp6/L (igm 10) ergab Hybride, die kovalent

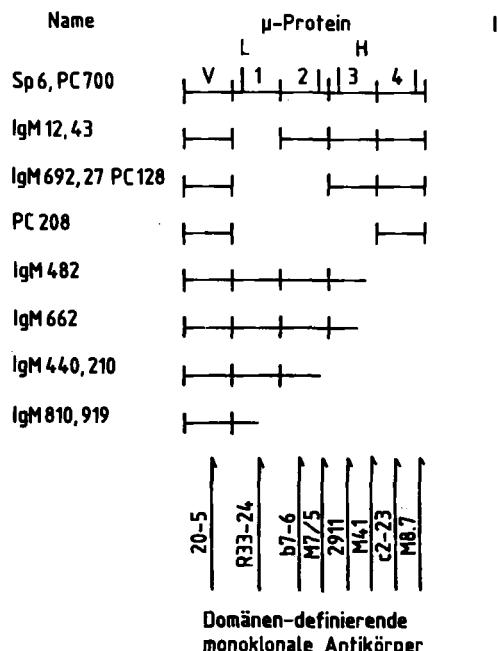
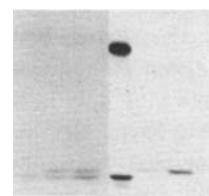
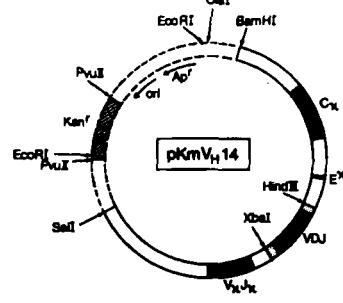


Abb. 3. Deletionen in Maus- $\mu$ -Ketten. Beim Wildtyp- $\mu$ -Protein (Sp6 und PC 700) ist die Domänenstruktur dargestellt und die Disulfidbrücken zu den leichten (L) oder schweren (H) Ketten sind angegeben. Die leichte Kette von IgM 12 und IgM 43 ist nicht kovalent an die  $\mu$ -Kette gebunden, was in allen anderen Mutanten mit bekannter IgM-Struktur der Fall ist. Die monoklonalen Ratte-anti-Maus- $\mu$ -Antikörper wurden aus etwa 20 Antikörpern ausgewählt und definieren unabhängige Bindungsstellen. Die Linie 20-5 produziert einen Maus-anti-Idiotyp-Antikörper, der mit Sp6-, aber nicht mit PC 700-IgM reagiert.

gebundene Dimere mit der V<sub>x</sub>-C<sub>x</sub>- und der chimären V <sub>$\mu$</sub> -C<sub>x</sub>-Kette produzierten. Die von der Anwesenheit der schweren Kette abhängige Bindung des anti-Idiotyp-spezifischen Antikörpers 20-5 war wiederhergestellt. Wegen der niedrigen anti-TNP-Affinität von Sp6-IgM ( $10^{-4}$  M<sup>[34]</sup>) konnten wir keine Antigenbindungsaktivität bestimmen. Ein ähnliches chimäres Protein, das ein Arsonylderivat bindet, wurde jedoch beschrieben<sup>[37]</sup>. Kleine, antigenbindende Moleküle, denen die Determinanten der konstanten Region der schweren Kette fehlen, könnten nützlich sein, wenn nur eine Bindungsstelle notwendig ist (um die Modulierung von Zelloberflächenantigenen zu vermeiden) und wenn ein kleineres Molekül mit weniger unspezifischen Wechselwirkungen (über die Fc-Rezeptoren) und möglicherweise einer höheren Eliminierungsrate gebraucht wird. Auch könnten solche Moleküle weniger immunogen sein. Da die meisten therapeutisch interessanten Antikörper aus der Maus stammen, könnte die Konstruktion chimärer Antikörper aus menschlichen konstanten Regionen und variablen Regionen der Maus eine Lösung sein, um Immunogenität zu vermeiden, die Effektorfunktionen des Antikörpers jedoch beizubehalten. Daß dies möglich ist, wurde kürzlich mit Sp6-IgM gezeigt<sup>[39]</sup>. Die variablen Regionen der schweren und der leichten Kette aus der Maus wurden vor die entsprechenden menschlichen konstanten  $\mu$ - und  $\alpha$ -Regionen gesetzt. Chimäres Maus-Mensch-IgM wurde aus den Überständen einer plasmidtragenden Myelomlinie gewonnen. Das IgM war pentamer und insofern funktionsfähig, als es TNP-gekoppelte Schaferythrozyten lysieren konnte.



anti Id	20-5	Sp6	Nr. 3	Nr. 15	X630
-	+	+	+	-	-

Abb. 4. Produktion chimerärer Antikörper. Oben: Das Plasmid pKmVh14 trägt das Gen für Kanamycin-Resistenz (Kan', schattiert), pBR322-Sequenzen (Ring gestrichelt) und eine Insertion des Sp6- $\alpha$ -Gens von der BamHI- bis zur SalI-Restriktionsstelle. Das Sp6-Gen für den variablen Teil der schweren Kette (VDJ) wurde zwischen den Schnittstellen der Restriktionsendonuklease XbaI und HindIII vor dem  $\lambda$ -Enhancerelement eingefügt. Unten: Reduzierende SDS-Gelelektrophorese von Produkten, die nach Transfektion des pKmVh14-Plasmids in X630-Myelomzellen gebildet wurden. Die stabil transformierten Linien 3 und 15 zeigen jeweils eine Bande, deren Laufweite geringfügig kleiner ist als diejenige der leichten Kette von Sp6. In den (15 x IgM 10)-Hybridlinien 8 und 21 wird sowohl die leichten Kette von Sp6 als auch das vom pKmVh14 gesteuerte V<sub>H</sub>C<sub>x</sub>-Protein beobachtet. Nur in diesen Hybridlinien wird die vom 20-5-Antikörper erkannte, anti-idiotypische Struktur wieder hergestellt.

## Das Modell der transgenen Maus

Bis heute haben drei Arbeitsgruppen rearrangierte Immunglobulingene in die Keimbahn der Maus eingeführt, und zwar sowohl ein  $\mu$ - und ein  $\alpha$ -Gen allein als auch eine Kombination beider Gene, die aus der Sp6-Linie stammen (Tabelle 6).

Tabelle 6. Immunglobulingene, die in Keimzellen der Maus eingeführt wurden.

Gen (Spezifität)	Injizierte Moleküle	Implantierte Zygoten	Nachkommen (mit dem Transgen)	Anzahl Kopien pro Genom	Gene in Keimbahn	Lit.
$\mu$ (NP)	50	284	13 (5)	17-140	3	[53]
$\alpha_{21}$ (?)	440	197	11 (6)	20-200	6	[54-56]
$\mu, \alpha$ (TNP)	50	13	5 (1)	4	1	[57]

Im Falle von Sp6 wurden etwa 50 Moleküle der Gene für die schwere und die leichte Kette, die beide in einem

pBR322-Plasmidvektor (pRHL<sub>TNP</sub>) kloniert waren, in befruchtete Eier von Swiss-Albino-Mäusen injiziert. Aus 13 implantierten Zygoten erhielt man fünf Nachkommen, von denen einer das Gen trug. Die Analyse des Keimbahnvererbungsmusters ergab, daß vier Kopien des pRHL<sub>TNP</sub>-Plasmids in ein autosomales Chromosom integriert waren.

### Expression von trans-Immunglobulinen

In all den Fällen, in denen die Immunglobulingene vererbt wurden, beobachtete man auch die Expression der jeweiligen Ketten. Expression von  $\alpha_{21}$ -Ketten war auf Zellen des B-Zell-Stammbaums beschränkt, wobei Abelson-Virus-transformierte Prä-B-Zellen ausgeschlossen waren<sup>[51]</sup>. Expression von  $\mu_{NP}$ -Ketten fand man in B- und T-Zellen<sup>[53]</sup>. In anderen Organen wie Niere, Gehirn, Herz, Lunge und Leber wurden die Gene nicht transkribiert. Eine Fluoreszenzanalyse ergab, daß Sp6- $\mu_6$ - und  $\alpha_6$ -Ketten auf der Membran von B-, aber nicht von T-Zellen exprimiert waren, obwohl die  $\mu_6$ -Kette (die  $\alpha_6$ -Kette konnte nicht getestet werden) in etwa einem Viertel Con-A-stimulierter Milz-T-Zellen exprimiert wurde. Das Sp6-Immunglobulin wurde im Serum der transgenen Mäuse als pentameres, funktionsfähiges IgM gefunden, wo es etwa ein Fünftel bis ein Drittel der gesamten IgM-Menge ausmachte. Es dürfte interessant sein zu sehen, ob eine solch massive Produktion einer Spezifität die Wechselwirkungen des idiotypischen Netzwerkes verändert. Die Einführung von Antikörpern mit Spezifitäten, die gegen Eigendeterminanten gerichtet sind, in die Keimbahn der Maus könnte einen Einblick geben, wie Selbsttoleranz auf der Ebene der B-Zellen erreicht wird. Mit den bisher eingeführten Genen wurde eine weitere immunologische Frage, nämlich die der allelen Exklusion, analysiert. Wie ist es möglich, daß B-Zellen schwere und leichte Ketten von nur einem der beiden homologen Chromosomen produzieren, was eine Voraussetzung effektiver klonaler Selektion ist?

### Einfluß transgener $\mu$ - und $\alpha$ -Ketten auf die allele Exklusion

Damit ein funktionstüchtiges Gen für die schwere Kette geschaffen wird, müssen drei räumlich getrennte DNA-Segmente, das für die variable Region ( $V_H$ ), das Diversitäts- (D) und das „Joining“-Segment ( $J_H$ ), zusammenkommen. Um ein funktionstüchtiges Gen für die leichte Kette zu schaffen, müssen ein  $V_L$ - und ein  $J_L$ -Segment verbunden werden. In ungefähr einem Viertel der B-Zellen wird allele Exklusion dadurch erreicht, daß funktionstüchtig rearrangierte  $VDJ_H^+$ - und  $VJ_L^+$ -Einheiten in einem Allel und nicht-funktionstüchtig rearrangierte  $VDJ_H^-$ - und  $VJ_L^-$ -Einheiten im anderen Allel vorliegen, das aufgrund von Fehlern während des Rearrangierens die jeweiligen Ketten nicht mehr produzieren kann. In etwa 75% der B-Zellen ist die variable Region der schweren und/oder der leichten Kette nicht vollständig rearrangiert worden. Um dieses Resultat erklären zu können, ist ein regulatorischer Rückkopplungsmechanismus der Immunglobulinketten auf den Prozeß des Rearrangierens postuliert worden<sup>[58]</sup>.

Um den Effekt rearrangierter und exprimierter Immunglobulin-Transgene auf das Rearrangieren endogener Ig-Gene studieren zu können, wurde eine Reihe von B-Zell-Hybridomen hergestellt und die Expression ihrer endogenen schweren und leichten Ketten untersucht. In Tabelle 7

Tabelle 7. Alleler Ausschluß in trans-Hybridomen.

$\alpha_{21}$ [56]:	24 Hybride	
	11	$H\alpha_{21}$ – (Keimbahn) [a]
2		$H$ – L
7		$-\alpha_{21}L$
2		$-\alpha_{21}$ – (Keimbahn) [a]
2		$-\alpha_{21}$ – (rearrangiert) [a]
$\mu_{NP}$ [57]:	11 Hybride	
	3	$\mu\alpha_{21}$ – HL
	8	$\mu\alpha_{21}$ – L [b]
5 Linien haben noch beide für H codierende Chromosomen	→ 10 Allele:	VDJ <sub>H</sub> <sup>+</sup> DJ Keimbahn
		1 8 1

[a] H = endogene schwere Kette; L = endogene leichte Kette; in Klammern die Konfiguration des Gens für die leichte Kette. [b] Die Konfiguration des Gens für die schwere Kette ist für fünf der acht Hybride ohne H-Kette nachgewiesen.

sind unsere Resultate und Resultate an transgenen Mäusen zusammengefaßt, die nur das rearrangierte  $\alpha$ -Gen tragen<sup>[56, 57]</sup> (Ergebnisse an transgenen Mäusen, die nur das  $\mu$ -Gen enthalten, sind noch nicht verfügbar). Von 24 Hybridomen, die sich von  $\alpha_{21}$ -transgenen Mäusen herleiten, exprimierte keins eine schwere Kette mit zwei leichten Ketten. In sieben Fällen, in denen keine Produktion schwerer Ketten beobachtet wird, sind zwei leichte Ketten, die endogene und die transgene, exprimiert. Diese Resultate befinden sich in Einklang mit einem negativen Rückkopplungsmechanismus von H-L-Molekülen auf das Rearrangieren des Gens für die leichte Kette.

Die Expression der transgenen  $\mu_6$ - und  $\alpha_6$ -Ketten sollte daher das Rearrangieren der Gene für endogene leichte Ketten verhindern, das in keinem der elf Hybridome entdeckt wurde. Die trans- $\alpha_6$ -Kette wurde jedoch nur zu einem Zehntel der für die endogenen leichten Ketten gefundenen Menge exprimiert, wohingegen die  $\mu_6$ -Kette im Überschuß produziert wurde. Somit sind niedrige Anteile an  $\mu_6$ - $\alpha_6$ -Molekülen bei einem Überschuß von freien  $\mu_6$ -Ketten kein Rückkopplungssignal, das das Rearrangieren des Gens für die leichte Kette stoppt. Die Beobachtung ist in Einklang mit der Entdeckung der außergewöhnlichen Doppelproduzenten leichter Ketten in Myelomzelllinien wie etwa S107, in der eine der leichten  $\alpha$ -Ketten nicht mit der schweren  $\alpha$ -Kette kombinieren konnte<sup>[59]</sup>, oder wie in der MOPC315-Linie, in der eine verkürzte  $\lambda_1$ -Kette, die zur Bindung an ihre schwere Kette nicht fähig ist, zusammen mit einer funktionsfähigen leichten  $\lambda_2$ -Kette gefunden wird<sup>[60]</sup>. Ein hoher Anteil (8/11) der Hybridome der  $\mu_6$ - $\alpha_6$ -exprimierenden Maus zeigte keine Expression einer zweiten endogenen schweren Kette. Fünf dieser Linien enthielten noch beide für die schwere Kette codierenden Chromosomen. Nur in einem der zehn Allele für die schwere Kette wurde eine komplette (aber inaktive)  $VDJ_H^-$ -Einheit gefunden. Ein Allel war offensichtlich in der Keimbahn-Konfiguration eingefroren, und acht stoppten das Rearrangieren im unreifen  $DJ_H$ -Zustand. Auch dieses Resultat

ist also mit einer (lückenhaften) Regulation des Rearranginges des für die schwere Kette codierenden Gens über Rückkopplung durch die  $\mu$ -Kette selbst vereinbar. Ob auch die leichten Ketten in diesen Prozeß einbezogen sind, muß durch die Analyse von Prä-B-Zelllinien geklärt werden. Andere Interpretationen sind jedoch möglich, so etwa die Annahme, daß in transgenen Mäusen andere zelluläre Selektionsprozesse als in normalen Mäusen stattfinden. Dennoch ist die Bedeutung transgener Mäuse für das Studium immunologischer Phänomene klar aufgezeigt.

Lassen Sie mich nun zum allgemeinen Thema dieser Abhandlung zurückkehren und die Frage stellen, ob eine Diversifizierung unseres Sp6-Antikörpers durch Einführen seiner Gene in die Maus erreicht werden konnte oder nicht. Momentan kann man nur spekulieren. Somatische Mutationen finden bei Genen für leichte und schwere Ketten von Immunglobulinen ungefähr  $10^{-3}$  mal pro Base und Generation statt<sup>[45, 46]</sup>. Es erscheint möglich, daß die eingeführten Gene von diesem Mechanismus profitieren und daß wir eine ganze Serie von somatisch mutierten Sp6-IgM-Molekülen erzeugen werden. Abbildung 5 faßt die bisher mit mehreren Techniken erhaltenen Mutanten der

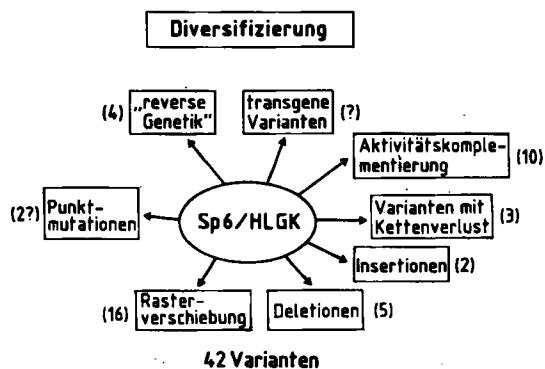


Abb. 5. Zusammenstellung der Sp6-Varianten.

Sp6-Linie zusammen und unterstreicht meine Überzeugung, daß ein einzelner monoklonaler Antikörper nur der Ausgangspunkt einer Vielzahl von künstlichen sekundären Antikörpern sein wird, die alle produziert werden, um jeweils eine spezielle Anforderung zu erfüllen.

Eingegangen am 13. März 1985 [A 549]  
Übersetzt von Joachim Wachenfeld, Vörstetten

- [1] G. Köhler, C. Milstein, Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity, *Nature (London)* 256 (1975) 495; C. Milstein, *Angew. Chem.* 97 (1985) 819; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) Nr. 10.
- [2] G. Köhler, C. Milstein, Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion, *Eur. J. Immunol.* 6 (1976) 511.
- [3] R. A. Polin, Monoclonal antibodies against streptococcal antigens, in R. H. Kennett, T. J. McKearn, K. B. Bechtol (Hrsg.): *Monoclonal Antibodies*, Plenum Press, New York 1980, S. 353–359.
- [4] A. Flamand, T. J. Wiktor, H. Koprowski, Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus proteins, *J. Gen. Virol.* 48 (1980) 97.
- [5] G. Mitchell, K. M. Cruise, E. G. Garcia, R. F. Anders, Hybridoma derived antibody with immunodiagnostic potential for schistosomiasis japonica, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 3165.
- [6] F. D. Howard, J. A. Ledbetter, J. Wong, C. Bieber, E. B. Stinson, L. A. Herzenberg, Human T lymphocyte differentiation marker defined by monoclonal antibodies that block E-rosette formation, *J. Immunol.* 126 (1981) 2117.

- [7] F. M. Brodsky, P. Parham, C. J. Barnstable, M. J. Crumpton, W. F. Bodmer, Monoclonal antibodies for analysis of the HLA system, *Immunol. Rev.* 47 (1979) 3.
- [8] H. Koprowski, Z. Steplewski, D. Herlyn, M. Herlyn, Production of monoclonal antibody against human melanoma by somatic cell hybrids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 3405.
- [9] D. S. Secher, D. C. Burke, A monoclonal antibody for large-scale purification of human leucocyte interferon, *Nature (London)* 285 (1980) 446.
- [10] W. R. McMaster, A. F. Williams, Monoclonal antibodies to  $\lambda$  antigens from rat thymus: Crossreactions with mouse and human and use in purification of rat  $\lambda$  glycoproteins, *Immunol. Rev.* 47 (1979) 117.
- [11] V. Migliano, C. Stähli, P. Häring, J. Schmidt, M. Le Dain, B. Glatthaar, T. Stachelin, Monoclonal antibodies to three tumor markers: human chorionic gonadotropin, prostatic acid phosphatase and carcinoembryonic antigen, in H. Peeters (Hrsg.): *Protides of the Biological Fluids*, Pergamon Press, Oxford 1980, S. 501–504.
- [12] M. Leptin, M. J. Potash, R. Grützmann, C. Heusser, M. Shulman, G. Köhler, F. Melchers, Monoclonal antibodies specific for murine IgM. I. Characterization of antigenic determinants on the four constant domains of the  $\mu$  chain, *Eur. J. Immunol.* 14 (1984) 554.
- [13] N. Yoshida, R. S. Nussenzweig, P. Potocnjak, V. Nussenzweig, M. Aikawa, Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite, *Science* 207 (1980) 71.
- [14] M. Mudgett-Hunter, M. N. Margolies, T. W. Smith, J. Nowotny, E. Haber, Monoclonal antibodies to the cardiac glycoside digoxin, in G. Hämmerling, J. Kearney (Hrsg.): *Monoclonal Antibodies and T cell Hybridomas*, Elsevier, Amsterdam 1980, S. 367–374.
- [15] N. Hollander, E. Pillemot, I. L. Weissman, Blocking effect of Lyt-2 antibodies on T-cell functions, *J. Exp. Med.* 152 (1980) 674.
- [16] S. Koskimies, Human lymphoblastoid cell line producing specific antibody against Rh-antigen D, *Soc. Eur. J. Immunol.* 11 (1980) 73.
- [17] M. Reth, G. Kelsoe, K. Rajewsky, Idiotypic regulation by isologous monoclonal anti-idiotypic antibodies, *Nature (London)* 290 (1981) 257.
- [18] B. Holtkamp, M. Cramer, H. Lemke, K. Rajewsky, Isolation of a cloned cell line expressing variant H2<sup>a</sup> using the fluorescence activated cell sorter, *Nature (London)* 289 (1981) 66.
- [19] W. Gerhard, R. G. Webster, Antigenic drift in influenza A virus. I. Selection and characterization of antigenic variants of A/PR/8/34 (HONI) influenza virus with monoclonal antibodies, *J. Exp. Med.* 148 (1978) 383.
- [20] B. Zipser, R. McKay, Monoclonal antibodies distinguish identifiable neurones in the leech, *Nature (London)* 289 (1981) 549.
- [21] J. P. Mach, F. Buchegger, M. Forni, J. Rritchard, C. Berche, J.-D. Lumbruso, M. Schrejer, C. Girardet, R. S. Accolla, S. Carrel, Use of radiolabelled monoclonal anti-CEA antibodies for the detection of human carcinomas by external photoscanning and tomoscintigraphy, *Immunol. Today* 2 (1981) 239.
- [22] P. Cofino, M. D. Scharff, Rate of somatic mutation in immunoglobulin production by mouse myeloma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (1971) 219.
- [23] S. L. Morrison, Murine heavy chain disease, *Eur. J. Immunol.* 8 (1978) 194.
- [24] S. L. Morrison, Sequentially derived mutants of the constant region of the heavy chain of murine immunoglobulins, *J. Immunol.* 123 (1979) 793.
- [25] T. R. Mosmann, A. R. Williamson, Structural mutations in a mouse immunoglobulin light chain resulting in failure to be secreted, *Cell (Cambridge, Mass.)* 20 (1980) 283.
- [26] G. E. Wu, N. Hozumi, H. Muriando, Secretion of a  $\lambda_2$  immunoglobulin chain is prevented by a single amino acid substitution in its variable region, *Cell (Cambridge, Mass.)* 33 (1983) 77.
- [27] C. Milstein, K. Adetugbo, N. J. Cowan, G. Köhler, D. S. Secher, C. D. Wilde, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 41 (1977) 793.
- [28] M. S. Neuberger, K. Rajewsky, Switch from hapten specific immunoglobulin M to immunoglobulin D secretion in a hybrid mouse cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 1138.
- [29] A. Radbruch, B. Liesegang, K. Rajewsky, Isolation of variants of mouse myeloma X63 that express changed immunoglobulin class, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 2909.
- [30] F. Sablitzky, A. Radbruch, K. Rajewsky, Spontaneous immunoglobulin class switching in myeloma and hybridoma cell lines differs from physiological class switching, *Immunol. Rev.* 67 (1982) 59.
- [31] V. Krawinkel, G. Zeebelein, M. Brüggemann, A. Radbruch, K. Rajewsky, Recombination between antibody heavy chain variable-region genes: evidence for gene conversion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 4997.
- [32] W. D. Cook, M. D. Scharff, Antigen-binding mutants of mouse myeloma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5687.
- [33] S. Rudikoff, A. M. Giusti, W. D. Cook, M. D. Scharff, Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 1979.
- [34] G. Köhler, M. Schulman, Immunoglobulin M mutants, *Eur. J. Immunol.* 10 (1980) 467.
- [35] G. Köhler, M. J. Potash, H. Lehrach, M. Schulman, Deletions in immunoglobulin mu chains, *EMBO J.* 1 (1982) 555.

- [36] R. G. Hawley, M. J. Shulman, H. Murielado, D. M. Gibson, N. Hozumi, Mutant immunoglobulin genes have repetitive DNA elements inserted into their intervening sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 7425.
- [37] J. Sharon, M. L. Gefter, T. Mauser, S. L. Morrison, V. T. Oi, M. Ptashne, Expression of a  $V_{H}$ - $C_{k}$  chimaeric protein in mouse myeloma cells, *Nature (London)* 309 (1984) 364.
- [38] G. Köhler, B. Baumann, A. Iglesias, J. McCubrey, M. J. Potash, A. Traunecker, D. Zhu, Different ways to modify monoclonal antibodies, *Med. Oncol. Tumor Pharmacother. I* (1984) 227.
- [39] G. L. Boulian, N. Hozumi, M. Shulman, Production of functional chimaeric mouse/human antibody, *Nature (London)* 312 (1984) 643.
- [40] S. L. Morrison, M. J. Johnson, L. A. Herzenberg, V. Oi, Chimeric human antibody molecules: Mouse antigen binding domains with human constant region domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851.
- [41] M. S. Neuberger, G. T. Williams, R. O. Fox, Recombinant antibodies possessing novel effector functions, *Nature (London)* 312 (1984) 604.
- [41a] S. P. Cobbold, H. Waldmann, Therapeutic potential of monovalent antibodies, *Nature (London)* 308 (1984) 460.
- [41b] C. Milstein, A. C. Cuello, Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry, *Nature (London)* 305 (1983) 537.
- [42] G. Köhler, Immunoglobulin chain loss in hybridoma lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 2197.
- [43] R. Baumal, B. K. Birnstein, P. Coffino, M. D. Scharff, Mutations in immunoglobulin-producing mouse myeloma cells, *Science* 182 (1973) 164.
- [44] Y. McHugh, M. Yagi, M. E. Koshland, The use of J and  $\mu$ -chain analysis to assign lymphoid cell lines to various stages in B cell differentiation, in N. Klinman, D. Mosier, I. Scher, E. Vitetta (Hrsg.): *B lymphocytes in the Immune Response: Functional, Developmental and Interactive Properties*, Elsevier/North Holland, New York 1981, S. 467.
- [45] D. McKearn, K. Huppi, M. Bell, L. Staudt, W. Gerhard, M. Weigert, Generation of antibody diversity in the immune response of Balb/c mice to influenza virus hemagglutinin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 3180.
- [46] F. Sablitzky, G. Wildner, K. Rajewsky, Somatic mutation and clonal expansion of B cells in an antigen-driven immune response, *EMBO J.* (1985), im Druck.
- [47] C. de Preval, M. Fougereau, Specific interaction between  $V_{H}$  and  $V_{L}$  regions of human monoclonal immunoglobulins, *J. Mol. Biol.* 102 (1976) 657.
- [48] M. Klein, C. Kostan, D. Kells, K. Dorrrington, *Biochemistry* 18 (1979) 1473.
- [49] D. Zhu, I. Lefkovits, G. Köhler, Frequency of expressed immunoglobulin light chain genes in lipopolysaccharide-stimulated Balb/c spleen cells, *J. Exp. Med.* 160 (1984) 971.
- [50] B. Baumann, M.-J. Potash, G. Köhler, Consequences of frameshift mutations at the immunoglobulin heavy chain locus of the mouse, *EMBO J.* 4 (1985) 351.
- [51] J. F. Kearney, A. Radbruch, B. Liesegang, K. Rajewsky, A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines, *J. Immunol.* 123 (1979) 1548.
- [52] M. J. Shulman, C. Heusser, C. Filkin, G. Köhler, Mutations affecting the structure and function of immunoglobulin M, *Mol. Cell. Biol.* 2 (1982) 1033.
- [53] R. Grosschedl, D. Weaver, D. Baltimore, F. Constantini, Introduction of a  $\mu$  immunoglobulin gene into the mouse germ line. Specific expression in lymphoid cells and synthesis of functional antibody, *Cell (Cambridge, Mass.)* 38 (1984) 647.
- [54] R. L. Brinster, K. A. Ritchie, R. E. Hammer, R. L. O'Brien, B. Arp, U. Storb, Expression of a microinjected immunoglobulin gene in the spleen of transgenic mice, *Nature (London)* 306 (1983) 332.
- [55] U. Storb, R. L. O'Brien, M. D. McMullen, K. A. Gollahan, R. L. Brinster, High expression of cloned immunoglobulin  $\mu$  gene in transgenic mice is restricted to B-lymphocytes, *Nature (London)* 310 (1984) 238.
- [56] K. A. Ritchie, L. R. Brinster, U. Storb, Allelic exclusion and control of endogenous immunoglobulin gene rearrangement in transgenic mice, *Nature (London)* 312 (1984) 517.
- [57] S. Rusconi, G. Köhler, A transgenic mouse line transmitting and expressing a specific pair of rearranged immunoglobulin  $\mu$  and  $\chi$  genes, *Nature (London)*, im Druck.
- [58] W. F. Alt, G. D. Yancopoulos, K. T. Blackwell, C. Wood, E. Thomas, M. Boss, R. Coffmann, N. Rosenberg, S. Tonegawa, D. Baltimore, Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments, *EMBO J.* 3 (1984) 1209.
- [59] S. Kwan, E. Max, J. Seidman, P. Leder, M. Scharff, *Cell (Cambridge, Mass.)* 26 (1981) 57.
- [60] N. Hozumi, G. Wu, H. Murielado, R. Baumal, T. Mosmann, L. Winberry, A. Marks, Arrangement of  $\lambda$  light chain genes in mutant clones of the MOPC315 mouse myeloma cells, *J. Immunol.* 129 (1982) 260.
- [61] M. Shulman, D. C. Wilde, G. Köhler, A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies, *Nature (London)* 276 (1978) 269-270.
- [62] W. Szybalski, E. H. Szybalska, G. Ragni, Genetic studies with human cell lines, *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 7 (1962) 75-89.
- [63] J. W. Littlefield, Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants, *Science* 145 (1964) 709.