

# Die somatische Entstehung der Antikörperdiversität (Nobel-Vortrag)\*\*

Von Susumu Tonegawa\*

An einem Herbsttag des Jahres 1970 erhielt ich einen Luftpostbrief von *Renato Dulbecco*, der gerade in Europa weilte. Zu jener Zeit arbeitete ich als „postdoctoral fellow“ in seinem Labor am Salk Institute. Der Brief, der auf Briefpapier des Hotels Hassler in Rom geschrieben war, lautete:

„Dear Susumu,

I don't know what arrangements you have made for after your departure from La Jolla at the end of the year but I would like to mention to you another possibility. The Institute of Immunology in Basel, Switzerland, will start operating in a month. They already have an excellent collection of immunologists, but have not yet built an adequate background in molecular biology. I talked about you to Niels Jerne, the Director, and they are interested in having you there ... There are many immunologically interesting phenomena obtained with crude RNA preparations but they are unreliable because RNA is not characterized. In general, it seems the best system for understanding development at a molecular level and you may like to get into such a field. If you are interested, write to Niels K. Jerne, Basel Institute for Immunology, 487 Grenzacherstrasse ...“

Ich habe es diesem prophetischen Brief und den Einwanderungsgesetzen der USA - nach denen ich nicht länger in den USA bleiben konnte - zu verdanken, daß ich im Februar 1971 in dieser gemütlichen Schweizer Stadt eintraf und mich fast nur von Immunologen umgeben fand. Für jemanden, der keinerlei Erfahrungen in Immunologie besaß und noch nie in der Schweiz war, bedeutete das eine drastische Umstellung. Tatsächlich waren die ersten zwölf Monate am Baseler Institut nicht leicht.

Nach meiner Ankunft in Basel versuchte ich zunächst, mein Projekt aus *Dulbeccos* Labor fortzuführen, d.h. die Transkriptionskontrolle der Gene des Simian Virus 40 zu untersuchen. Ich begriff jedoch bald, daß dieses Projekt kein besonders großes Interesse in diesem Institut, in dem fast nur Immunologen arbeiteten, erregte und daß ich damit auch die Gelegenheit verpaßte, mit meinen zahlreichen und talentierten Kollegen zusammenzuarbeiten. Ich beschloß also, Immunologie zu lernen, indem ich mit ihnen redete, Publikationen las und Fragen stellte. Ein Immunologe, *Ita Askonas*, und ein Genetiker, *Charlie Steinberg*, wurden meine Tutoren und halfen mir dabei, mich in ein

völlig neues Gebiet einzuarbeiten. Während dieser Zeit begann ich mich für die Frage nach dem Ursprung der Diversität von Antikörpern zu interessieren.

## Das Problem

Immunologen stimmen darin überein, daß ein Wirbeltier viele Millionen strukturell verschiedener Antikörper synthetisieren kann, und das sogar noch bevor es mit einem Antigen in Kontakt getreten ist. *Gerhard Edelman* und *Rodney Porter* hatten gezeigt, daß ein typisches Antikörpermolekül aus zwei gleichen leichten Ketten und zwei gleichen schweren Ketten besteht<sup>[1,2]</sup>. Jeder dieser beiden Kettenarten wies von einem Antikörper zum anderen eine große Sequenzvariabilität in der aminoterminalen, aber nicht in der carboxyterminalen Region auf<sup>[3]</sup>. Diese zwei Regionen werden als die variable oder V-Region und als die konstante oder C-Region bezeichnet. Eine Frage jedoch spaltete Immunologen und Genetiker in zwei Schulen: Ist die genetische Diversität, die zur Synthese dieser Proteine nötig ist, im Lauf der Evolution entstanden und wird sie in der Keimbahn weitergegeben oder entsteht die Diversität während der Entwicklung eines Individuums und ist demnach in somatischen Zellen, aber nicht in Keimbahnzellen vorhanden? Eine Schule glaubte, daß die Keimbahn ein Gen für jedes Polypeptid, das letztlich als Antikörper in Erscheinung tritt, enthält<sup>[4]</sup>. Nach dieser Keimbahntheorie werden Antikörper- oder Immunglobulin-Gene genauso exprimiert wie die Gene aller anderen Proteine, ohne daß ein spezielles „Gen-Processing“ nötig wäre. Allerdings setzt dieses Modell eine enorme Zahl von vererblichen Immunglobulin-Genen voraus. Auch wenn durch die vierkettige Struktur eines Immunglobulin-Moleküls eine gewisse Diversität durch Kettenpaarung erreicht werden kann, so ist doch die Anzahl der Gene für leichte und schwere Ketten sehr groß. Ein Hauptproblem für die Keimbahntheorie war die Beobachtung, daß alle Polypeptidketten eines Antikörpertypus einen gemeinsamen genetischen Marker (Allotyp) tragen, der sich wie ein einzelnes Mendelsches Gen verhält. Wenn es viele tausend Gene für leichte und schwere Ketten gäbe, wie wäre der gleiche genetische Marker für alle diese Gene zu erklären?

Die zweite Theorie nahm an, daß die Keimbahn nur eine begrenzte Anzahl von Antikörper-Genen enthält, und daß diese Gene irgendwie im Laufe der Differenzierung der antikörperbildenden Lymphocyten aus ihren Stammzellen diversifizieren. In anderen Worten, die Diversifizierung von Gensequenzen für Antikörper findet in spezialisierten somatischen oder Körperzellen statt und wird nicht von Generation zu Generation durch die Keimzellen vererbt<sup>[5-7]</sup>. Attraktiv an dieser Theorie ist, daß für den Wirt keine Notwendigkeit besteht, eine unverhältnismäßig große Zahl vererbbarer Gene zur Codierung von Antikör-

[\*] Prof. Dr. S. Tonegawa  
Center for Cancer Research and Department of Biology  
Massachusetts Institute of Technology  
Cambridge, MA 02139 (USA)

[\*\*] Copyright © The Nobel Foundation. - Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

pern zu reservieren; diese Theorie postulierte allerdings einen unbekannten Mechanismus für die somatische Diversifizierung von ererbten Genen.

Über viele Jahre wurden mündlich und schriftlich Argumente für und gegen diese beiden gegensätzlichen Theorien vorgebracht. Alle Argumente basierten jedoch auf der Interpretation der Aminosäuresequenzen von Immunglobulin-Polypeptidketten oder auf den allgemein akzeptierten Prinzipien der Evolution und der Genetik. Ein direkter Beweis für eine der beiden Theorien konnte nicht erbracht werden, da keine Technik zur Verfügung stand, mit der eine Analyse der Feinstruktur von spezifischen Genen höherer Organismen durchgeführt werden konnte.

## Genzählung

Erst in den frühen siebziger Jahren wurden Techniken zur Reinigung einer spezifischen eukaryotischen mRNA verfügbar. Außerdem war eine Methode eingeführt worden, mit der die Kopienzahl eines bestimmten Genes durch kinetische Analyse der Nucleinsäurehybridisierung bestimmt werden konnte<sup>[8,9]</sup>. Einige Wissenschaftler – darunter auch ich – hofften, mit Hilfe dieser neuen Techniken die Anzahl der Immunglobulin-Gene im Keimbahnogen experimentell bestimmen zu können und damit Beweise für eine der beiden Theorien zu liefern. Daß diese Methode zum Ziel führen könnte, basierte zum Teil auf der Tatsache, daß die V-Region eines gegebenen Kettenotyps, obwohl von Antikörper zu Antikörper verschieden, doch einen hohen Homologiegrad in der Aminosäuresequenz aufweist. Man nahm daher an, daß eine mRNA für eine spezielle Immunglobulin-Polypeptidkette nicht nur mit ihrem eigenen Gen hybridisieren würde, sondern auch mit vielen anderen Immunglobulin-Genen, falls diese im Keimbahn-Genom existierten.

Ich nahm daher Maus-Myeloma-Zellen und versuchte, Immunglobulin-mRNA zu reinigen und Hybridisierungsversuche durchzuführen. Die ersten Experimente mit den Genen für die  $\kappa$ -leichten Ketten und schwere Ketten ergaben jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Es bestand Un gewißheit über den Reinheitsgrad der mRNA, das Ausmaß der Hybridisierung einer Probe mit verwandten, aber nicht gleichen Genen und den genauen Einfluß von Sequenzdifferenzen auf Hybridisierungskinetiken. Es stellte sich heraus, daß es nahezu unmöglich war, die Befunde dieser frühen Studien im Hinblick auf die oben geschilderte Kontroverse überzeugend zu interpretieren.

Eine Reihe von Experimenten, die ich dann mit Genen für die  $\lambda$ -leichten Ketten aus der Maus durchführte, waren jedoch vielversprechend<sup>[10]</sup>. Mit einem mRNA-Präparat, das über 95% rein war, konnte ich zeigen, daß das Gen für die  $\lambda$ -leichte Kette aus der Maus nicht häufiger vorkam als das Gen für  $\beta$ -Globin, von dem bekannt war, daß es im wesentlichen einmalig ist. Glücklicherweise hatten Weigert, Cohn et al. mindestens acht verschiedene Sequenzen für  $V_{\lambda}$ -Regionen bei Myelomas, die von BALB/c abstammten, identifiziert<sup>[11]</sup>. Da diese V-Regionen sehr homolog waren und sich nur in ein, zwei oder drei Aminosäureresten unterschieden, war die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, daß die entsprechenden Gene weitgehend kreuzhybridisieren würden, falls sie getrennt im Keim-

bahn-Genom existierten. Außerdem ließ die statistische Analyse der  $\lambda$ -leichten Ketten sekretierenden Myelomas vermuten, daß eine BALB/c-Maus viel mehr als die acht identifizierten  $V_{\lambda}$ -Regionen synthetisieren kann. Damit war die Anzahl der experimentell nachgewiesenen  $\lambda$ -Gene (nur ein paar) in der Maus wesentlich kleiner als die Anzahl der verschiedenen  $V_{\lambda}$ -Regionen (mindestens acht, wahrscheinlich viel mehr), die in Proteinen gefunden wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse war ich überzeugt davon, daß in diesem Gensystem somatische Diversifikation stattfindet.

## Umordnung

In der Zwischenzeit entdeckte ich, daß einige Immunologen spekuliert hatten, daß die Polypeptidketten von Immunglobulinen durch zwei getrennte DNA-Segmente codiert werden könnten, je eines für die V- und C-Regionen. In Analogie zum eleganten Modell von Campbell<sup>[12]</sup> über die Integration und Exzision des Genoms des Phagen  $\lambda$  hatten Dreyer und Bennett vorgeschlagen, daß eines von vielen „V-Genen“ aus seiner ursprünglichen chromosomal Position herausgeschnitten und an ein einziges „C-Gen“ in einer Immunglobulin produzierenden B-Zelle angefügt wird<sup>[13]</sup>. Dieses Modell erklärte die Beibehaltung des gemeinsamen genetischen Markers in allen Immunglobulin-Polypeptidketten eines gegebenen Typs, indem ein einziges C-Gen für diesen Kettenotyp postuliert wurde. Obwohl eine somatische Rekombination zwischen den „V-“ und „C-Genen“ ein wichtiger Aspekt dieses Modells ist, so ist es doch eine Version der Keimbahntheorie über die Antikörperfertilität, da in dem Modell angenommen wird, daß das Keimbahnogen viele „V-Gen“ enthält, eines für jede V-Region, die ein Organismus synthetisieren kann.

Nachdem das Modell von Dreyer und Bennett im Jahre 1965 publiziert worden war, wurde es nicht allgemein von Biologen akzeptiert. Das ist verständlich, da das Modell auf zwei Hypothesen basierte, von denen beide die gelgenden Dogmen der Biologie verletzten. Dabei handelt es sich um das Prinzip, daß ein Gen eine Polypeptidkette codiert und daß das Genom während der Ontogenese und Zelldifferenzierung konstant bleibt. Auch ich reagierte skeptisch, als ich das Modell in den frühen siebziger Jahren kennlerte. Gleichzeitig dachte ich jedoch, daß das Modell mit Hilfe von Restriktionsenzymen getestet werden könnte. Noch in Dulbeccos Labor hatte ich von Daniel Nathans Durchbruch bei der Analyse des SV40-Genoms unter Anwendung der gerade entdeckten Restriktionsenzyme gehört<sup>[14]</sup>. Da ich zu denjenigen gehörte, die versucht hatten, die Transkriptionseinheiten dieses DNA-Virus zu definieren, war mir die Bedeutung dieser Enzyme für die Analyse von DNA-Strukturen sehr bewußt. Verglichen mit der Analyse eines viralen Genoms mit nur  $5 \times 10^3$  Basenpaaren benötigte man für das Genom eines so komplexen eukaryotischen Organismus wie der Maus mit  $2 \times 10^9$  Basenpaaren noch ein paar zusätzliche Tricks, um spezifische DNA-Fragmente unter den vielen irrelevanten Bruchstücken zu erkennen. Die beste Lösung für dieses Problem schien in der kombinierten Anwendung der elektrophoretischen Trennung von enzymverdauter DNA und der empfindlichen Technik der Nucleinsäurehybridisierung zu liegen.

Ich diskutierte mit *Charlie Steinberg* die Notwendigkeit, eine Methode zu entwickeln, mit der in situ eine spezifische DNA-Sequenz unter den elektrophoretisch fraktionsierten DNA-Fragmenten detektiert werden kann, aber wir fanden einfach keinen guten Ansatz. Wie wir alle wissen, wurde eine sehr einfache und elegante Methode später von *Edward Southern* entwickelt<sup>[15]</sup>.

Es vergingen einige Wochen, bevor ich in einem der Kühlräume des Instituts zufällig einen großen Behälter aus Plexiglas sah, in dem jemand Serumproteine durch Stärke-Gelelektrophorese trennte. Ich dachte, daß es möglich sein müßte, hinreichende Mengen von verdauter DNA in einem Gel von diesen Ausmaßen zu fraktionieren, so daß die aus den Gelstücken eluierte DNA für Flüssigphasenhybridisierung benutzt werden könnte. Eine schnelle Über schlagsrechnung zeigte, daß dieses Experiment möglich war. *Nobumichi Hozumi*, ein „postdoc“ in meinem Labor, und ich versuchten es also, obwohl uns bewußt war, wie viel Arbeit dieses Experiment machen würde. Als Hybridisierungsproben verwendeten wir die gereinigte mRNA von  $\kappa$ - oder  $\lambda$ -leichten Ketten (V- + C-Probe) und das entsprechende 3'-Halbfragment (C-Probe), das vorher mit radioaktivem Iod zu einer hohen spezifischen Aktivität markiert worden war. Dem Experiment lag folgender Gedanke zugrunde: Wenn eine Immunglobulin-Polypeptidkette durch zwei „V-“ und „C-Gene“ im Keimbahn-Genom codiert wird, ist es sehr wahrscheinlich, daß die Behandlung mit einem Restriktionsenzym diese DNA-Sequenzen in Fragmente bestimmter Größe spalten wird und so deren elektrophoretische Trennung ermöglicht. Falls die „V-“ und „C-Gene“ durch somatische Rekombination zusammengefügt werden, so besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, daß die Myeloma-DNA, die mit demselben Restriktionsenzym verdaut wurde, ein DNA-Fragment enthalten wird, das beide „V-“ und „C-Gene“ trägt.

Unsere Ergebnisse waren eindeutig. Zu unserer angenehmen Überraschung waren die Hybridisierungsmuster von embryonaler DNA (als Ersatz für die Keimbahn-DNA) und die von einer  $\kappa$ -Myeloma-DNA nicht nur sehr unterschiedlich, sondern bestätigten auch das Vorhandensein von getrennten „V-“ und „C-Genen“ im ersten Fall sowie von einem zusammengefügten V- plus C-Gen im zweiten<sup>[16]</sup>. Wir wußten natürlich, daß die Ergebnisse auch anders interpretiert werden konnten, etwa als zufällige Modifizierung der Schnittstellen in einer der zwei DNA-Typen. Wir hielten diese anderen Erklärungen aber für unwahrscheinlich, weil sie alle mehrere zufällige Ereignisse voraussetzten. Unser Vertrauen wurde weiter gestärkt, nachdem wir mit Hilfe der bald danach entwickelten Southern-Blot-Technik weitergehende Analysen mit einer Vielzahl von Restriktionsenzymen und Myelomzellen durchführen konnten.

## Das Zusammenfügen von Gensegmenten

Obwohl die Experimente mit Restriktionsenzymen recht informativ waren, so konnten jedoch detaillierte Informationen über Umordnungen mit diesem Ansatz nicht gewonnen werden. Glücklicherweise wurden die DNA-Rekombinationstechniken gerade entwickelt, für unsere Zwecke die ideale Methode. Diskussionen um die möglichen Gefahren dieser Techniken flammten zuerst in den

Vereinigten Staaten und etwas später in Europa auf. Um sicher zu gehen, daß unsere Forschung nicht auch Gegenstand dieser Kontroverse werden würde, beschlossen *Charlie* und ich, uns mit *Werner Arber* von der Universität Basel zu beraten, der die DNA-Rekombinations-Forschung in der Schweiz koordinierte. Eine kleine informelle Gruppe von Forschern, die an diesen Techniken interessiert waren, wurde zusammengestellt. Man war sich in dieser Gruppe, die von der Mehrheit der Schweizer Forscher unterstützt wurde, einig, alle in den Vereinigten Staaten eingeführte Praktiken und Richtlinien zu adaptieren. Wir trafen uns einmal monatlich und tauschten Informationen über ethische und praktische Aspekte der Gentechnik aus.

Aufgrund unserer früheren Versuche, Immunglobulin-Gene zu zählen, hielt ich es für wichtig, mit dem System der  $\lambda$ -leichten Ketten aus der Maus zu beginnen, da dies der einfachste aller untersuchten Kettentypen war. Unser Ziel war,  $V_{\lambda}$ - und  $C_{\lambda}$ -„Gene“ aus der Keimbahn von Embryozellen zu klonieren, sowie die umgeordneten V- plus C-„Gene“ aus einem  $\lambda$ -Myelom und diese genomischen DNA-Klone durch Elektronenmikroskopie und DNA-Sequenzierung zu vergleichen. Bis zu diesem Zeitpunkt waren noch keine „bestimmten“ eukaryotischen Gene kloniert worden. Wir mußten uns also ein paar Tricks ausdenken, um die ersten Immunglobulin-Gene zu klonieren. Zum Beispiel war die uns damals zur Verfügung stehende Probe eine zu etwa 95% reine mRNA und kein cDNA-Klon. Diese Situation machte das Screening einer großen Zahl von DNA-Klonen wegen des „hohen Hintergrundes“ recht schwierig. Um dieses Problem zu umgehen, reinigten wir das  $\lambda$ -Gen enthaltende genomische DNA-Fragment so weit wie möglich durch präparative R-Schleifenbildung vor<sup>[17, 18]</sup>, so daß die spätere DNA-Bibliothek den interessanten Klon in hoher Zahl enthalten würde.

Mit der embryonalen DNA beginnend, konnten wir einen Klon isolieren, der spezifisch mit der  $\lambda$ -mRNA hybridisierte<sup>[18]</sup>. Als die Elektronenmikroskopikerin *Christine Brack*, die vom Biozentrum der Universität Basel zu uns gekommen war, die Mischung aus diesem Klon und der  $\lambda$ -mRNA untersuchte, fand sie eine wunderschöne R-Schleife, von der etwa die Hälfte des mRNA-Strangs abstammt. Diese und weitere Analysen überzeugten uns, daß wir ein  $V_{\lambda}$ -„Gen“ geklont hatten, an das kein C-„Gen“ angefügt war. Auf der Ebene der DNA-Klone konnten wir somit zeigen, daß die V- und C-„Gene“ tatsächlich getrennt im Keimbahn-Genom vorkommen. Eine nachfolgende Untersuchung der DNA-Sequenz, die in Zusammenarbeit mit *Allan Maxam* und *Walter Gilbert* von der Harvard Universität durchgeführt wurde, ergab, daß dieser DNA-Klon vom V-„Gen“ für den  $\lambda_2$ -Subtyp herührte<sup>[19]</sup>.

In der Zwischenzeit gelang es *Minoru Hirama*, einem anderen postdoc,  $\lambda$ - und  $\kappa$ -cDNA-Klone herzustellen. Diese Proben erleichterten die Isolierung von genetischen Klonen enorm. Meine Assistentin *Rita Schuller* und ich isolierten einige genomische DNA-Klone von  $\lambda$ - und  $\kappa$ -Ketten synthetisierenden Myelomata und von Embryos<sup>[20, 21]</sup>. Die Analyse dieser cDNA-Klone durch Elektronenmikroskopie, Restriktionsenzymkartierung und DNA-Sequenzierung bestätigte nicht nur die somatische Umordnung von Immunglobulin-Genen, sondern zeigte auch besondere Charakteristiken ihrer An- und Umordnung auf (Abb. 1). Diese können so zusammengefaßt werden:

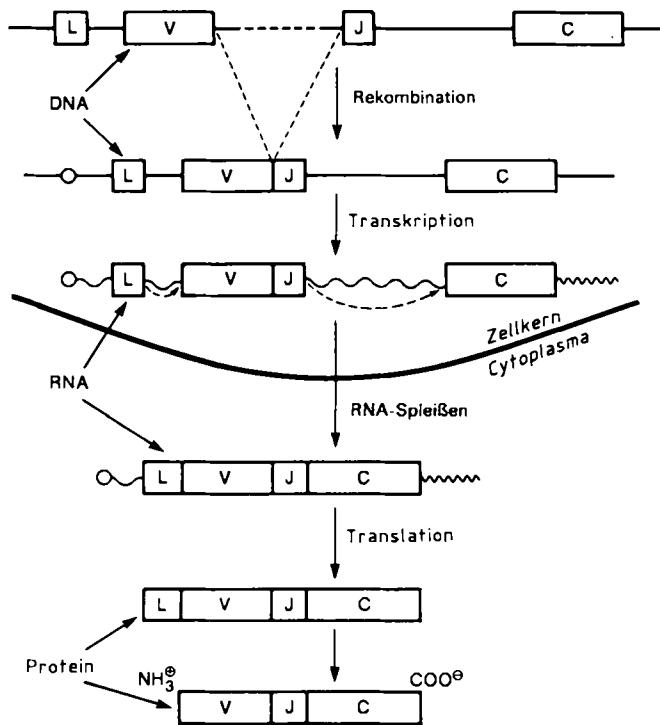


Abb. 1. Das Prinzip der Umordnung und Expression eines Genes für die leichte Kette von Immunglobulinen. Der oberste Teil zeigt die Anordnung der Gensegmente in einem Keimbahn-Genom. Durch somatische Umordnung werden *V*- und *J*-Gensegmente verknüpft und ein komplettes Gen für die leichte Kette gebildet (zweite „Zeile“). Das ganze Gen mit „leader“-Exon (L), *V*-Region-Exon (V und J), *C*-Region-Exon (C) und den dazwischen liegenden Introns werden zu prä-mRNA im Kern der B-Zelle transkribiert. Die prä-mRNA wird während des Transports vom Kern ins Cytoplasma gespleißt. Die resultierende mRNA – jetzt ohne Introns – wird im endoplasmatischen Reticulum in eine nascente Polypeptidkette translatiert, aus der nach Entfernung des Signalpeptides eine reife  $\lambda$ -leichte Kette entsteht.

- Obwohl die *V*- und *C*-„Gene“ umgeordnet werden und in Myelomazellen viel näher beieinander liegen als in Embryozellen, so gehen sie doch nicht ineinander über, sondern sind durch eine DNA-Sequenz von einigen Kilobasen getrennt, die keinen Anteil an der Codierung der Polypeptidkette hat. Diese nicht translatierte DNA-Sequenz, die innerhalb des umgeordneten, kompletten Immunglobulin-Genes liegt, war unerwartet und zudem eine der ersten Demonstrationen eines Introns in eukaryotischen Genen<sup>[22]</sup>.
- Das im Keimbahn-Genom gefundene *V*-„Gen“ ist etwa 23 Codons kürzer als die gewöhnliche *V*-Region. Die fehlenden Codons wurden in einem kurzen DNA-Stück gefunden, das als *J*- (oder joining-)Gensegment bezeichnet wird, viele Kilobasen vom unvollständigen *V*-„Gen“ (bezeichnet als ein *V*-Gensegment) entfernt liegt und einige Kilobasen „upstream“ vom *C*-„Gen“ (auch bezeichnet als ein *C*-Gensegment). In Myelomazellen wird durch Umordnung das *J*-Gensegment mit dem *V*-Gensegment verknüpft, wodurch ein komplettes *V*-Region-Gen entsteht<sup>[20, 23]</sup>.
- Das Signalpeptid wird durch ein anderes DNA-Segment – als *L*- (oder leader-)Exon bezeichnet – codiert und ist vom *V*-Gensegment durch ein kurzes Intron getrennt<sup>[19, 23]</sup>.

Der Befund, daß das  $V_{\lambda}$ -„Gen“ in die zwei Gensegmente  $V_{\lambda}$  und  $J_{\lambda}$  im Keimbahn-Genom unterteilt ist, war völlig

unerwartet. Aber sobald diese Entdeckung gemacht war, lagen die Implikationen für die somatische Entstehung der Antikörperdiversität klar auf der Hand. Wenn das Keimbahn-Genom multiple Kopien von verschiedenen *V*- und *J*-Gensegmenten trägt, dann würde die Zahl der kompletten *V*-„Gene“, die durch Zufall aus diesen zwei Typen von Gensegmenten entstehen können, viel größer als die gesamte Anzahl der ererbten Gensegmente sein. Anders als beim ursprünglichen Konzept von Dreyer und Bennett kann die Umordnung von DNA daher eine der Hauptursachen für die somatische Diversifizierung von Antikörper-Molekülen sein. Die gefundenen Aminosäuresequenzen der  $\kappa$ -leichten und schweren Ketten stimmten mit diesem Konzept überein<sup>[24, 25]</sup>. Tatsächlich bestätigte die Analyse der Nucleotidsequenzen des Genkomplexes der  $\kappa$ -Ketten aus der Maus, die in meinem und in Phillip Leders Labor an den United States National Institutes of Health durchgeführt wurden, daß ein Keimbahn-Genom multiple *V*- und *J*-Gensegmente enthält und daß diese Gensegmente in jeder Myelomazelle zu unterschiedlichen Kombinationen zusammengefügt werden<sup>[20, 26]</sup>. Vier verschiedene *J* $_{\kappa}$ -Gensegmente wurden einige Kilobasen „upstream“ vom *C* $_{\kappa}$ -Gensegment gefunden. Die genaue Zahl der *V* $_{\kappa}$ -Gensegmente ist auch heute noch unbekannt, wird aber auf zwei- bis dreihundert geschätzt<sup>[27]</sup>.

## Gene für schwere Ketten

Da eine schwere Kette von Immunglobulinen auch aus *V*- und *C*-Region zusammengesetzt ist, nahmen wir an, daß die entsprechenden Gene auch jene Art von DNA-Umordnung durchlaufen, die für die Gene der leichten Ketten beschrieben wurde. Diese Annahme wurde von Leroy Hood et al. am California Institute of Technology und von uns bestätigt (Abb. 2)<sup>[28, 29]</sup>. Wie bei  $\kappa$ -Genen, so wurden auch vier *J*-Gensegmente mehrere Kilobasen „upstream“ von den *C*-Gensegmenten gefunden, die die *C*-Region der Klasse  $\mu$  von schweren Ketten codieren.

Obwohl Gene für schwere Ketten grundsätzlich ähnlich organisiert sind wie Gene für leichte Ketten, so wurde doch eine Beobachtung während dieser Untersuchung gemacht, die vermuten ließ, daß die somatische Umordnung von Gensegmenten eine noch wichtigere Rolle für die Diversifizierung von schweren Ketten spielt als für die von leichten. Es wurde gefunden, daß ein oder zwei bis zu einem Dutzend Aminosäurecodons, die in der *V*-*J*-Verbindungsregion des zusammengefügten Gens vorhanden sind, nicht in den entsprechenden *V*- oder *J*-Gensegmenten im Keimbahn-Genom vorkommen<sup>[30, 31]</sup>. Das ließ vermuten, daß ein dritter Typ von Gensegment – *D*- oder Diversitäts-Gensegment – am somatischen Zusammenbau von Genen für schwere Ketten beteiligt ist. Tatsächlich entdeckten Hitoshi Sakano und Yoshi Kurosawa, zwei postdocs in meinem Labor, bald etwa ein Dutzend *D*-Gensegmente<sup>[32, 33]</sup>, die in der Region „upstream“ vom *J*-Cluster im Keimbahn-Genom kartiert wurden<sup>[34, 35]</sup>. Für die Konstruktion eines vollständigen *V*-„Gens“ für eine schwere Kette sind also zwei DNA-Rekombinationsereignisse notwendig, eines zur Verknüpfung eines *V*- mit einem *D*-Gensegment und das andere zur Verbindung desselben *D*- mit einem *J*-Gensegment.

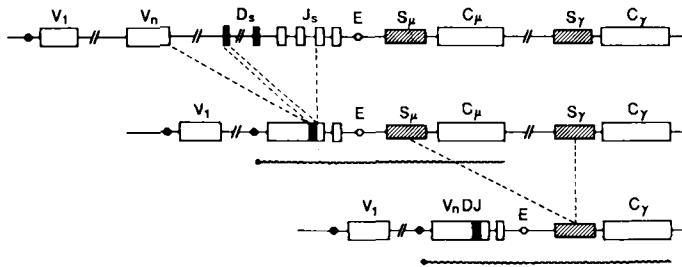


Abb. 2. Die Organisation der Genfamilie, die die schweren Ketten der Immunglobuline codiert. Oberer, mittlerer und unterer Teil zeigen die Organisation im Keimbahn-Genom, im Genom einer B-Zelle, die die eine schwere Kette der  $\mu$ -Klasse synthetisiert, bzw. ein Genom einer Plasmazelle, die eine schwere Kette der  $\gamma$ -Klasse herstellt. Ein haploides Maus-Genom enthält mehrere hundert unterschiedliche  $V$ -Gensegmente, etwa ein Dutzend  $D$ -Gensegmente und ein  $C$ -Gensegment für jede der acht Klassen oder Unterklassen von schweren Immunglobulinketten. In einer ungeprägten B-Zelle wird je eine Kopie der  $V$ -,  $D$ - und  $J$ -Gensegmente zu einer  $VDJ$ -DNA-Sequenz zusammengesetzt und mit dem  $C_{\mu}$ -Gensegment in eine prä-mRNA transkribiert. In verschiedenen B-Zellen desselben Organismus werden verschiedene  $V$ -,  $D$ - und  $J$ -Gensegmente zusammengefügt und exprimiert. Sobald die ungeprägte B-Zelle zu einer Plasmazelle oder einer Gedächtnis-B-Zelle differenziert (siehe Abb. 5), findet oft ein zweiter Typ von somatischer Rekombination zwischen der Region ( $S_{\mu}$ ) „upstream“ vom  $C_{\mu}$ -Gensegment und einer anderen Region ( $S_{\gamma}$ ) „upstream“ vom  $C_{\gamma}$ -Gensegment statt. Wie in der Abbildung unten gezeigt ist, wird durch die „switch“-Rekombination das  $C_{\mu}$ -Gensegment durch das  $C_{\gamma}$ -Gensegment ersetzt, ohne das  $VDJ$ -Exon zu verändern. Gefüllte Kreise stehen für Transkriptionspromotoren, die in Richtung „upstream“ eines jeden  $V$ -Gensegments liegen. Offene Kreise bedeuten Transkriptionsverstärker [102, 103], die zusammen mit den Promotoren die umgeordneten Gene für die schweren Ketten zu erhöhter Expression aktivieren.

## Die Rekombinationsregeln

Das Zusammenfügen von  $V$ - $J$  oder  $V$ - $D$ - $J$  setzt eine ortspezifische Rekombination voraus. Man kann demnach erwarten, daß diese Gensegmente bestimmte Sequenzen in

der Nähe der späteren Verbindungsstellen aufweisen, die von einer hypothetischen ortsspezifischen Rekombinase erkannt werden. Solche Erkennungssequenzen dürften allen Gensegmenten eines gegebenen Typs gemeinsam sein (zum Beispiel allen  $V_{\kappa}$ ), da sie alle an einen bestimmten Gensegmenttyp angefügt werden können (zum Beispiel an alle  $J_{\kappa}$ ). Es gibt tatsächlich ein Heptamer und ein Nonamer, die „downstream“ direkt neben jedem  $V_{\kappa}$ -Gensegment konserviert sind (Abb. 3)<sup>[36, 37]</sup>. Sequenzen, die dem  $V_{\kappa}$ -Heptamer und -Nonamer komplementär sind, wurden „upstream“ direkt neben jedem der vier  $J_{\kappa}$ -Gensegmenten gefunden<sup>[36]</sup>. Als später die  $V$ - und  $J$ -Gensegmente für die schweren Ketten analysiert wurden, konnten auch dort die allen gemeinsamen konservierten Sequenzen festgestellt werden<sup>[30, 31]</sup>. Des weiteren tragen  $D$ -Gensegmente die Heptamer- und Nonamersequenzen sowohl „upstream“ als auch „downstream“<sup>[32, 33]</sup>. Eine weitere interessante Eigenschaft dieser Erkennungssequenzen ist die Länge des „Spacers“ zwischen Heptamer und Nonamer, der immer aus 12 oder 23 Basenpaaren besteht<sup>[30, 31]</sup>. Ein Gensegment, das eine Erkennungssequenz mit einem der beiden Spacer-Typen enthält, kann nur an ein Gensegment, das den anderen Spacer-Typ trägt, angefügt werden. Diese 12/23-Basenpaarregel für Spacer scheint strikt befolgt zu werden. Bisher weiß man wenig über die Rekombinase, aber in den Extraktten von prä-B-Zelllinien, die durch den Abelson-Virus transformiert worden waren, wurden Proteine gefunden, die eine Affinität zum Heptamer oder Nonamer haben; in diesem Zelltyp kommt eine Umordnung in vitro relativ häufig vor<sup>[38, 39]</sup>.

## Diversität, die an den Verbindungsstellen entsteht

Beim Vergleich der deduzierten Aminosäuresequenz eines  $J_{\kappa}$ -Gensegmentes aus der Keimbahn mit der experimentell bestimmten Aminosäuresequenz jener  $\kappa$ -Ketten, die teilweise von diesem  $J_{\kappa}$ -Gensegment codiert werden, wurde festgestellt, daß das 5'-Ende des  $J_{\kappa}$ -Gensegmentes nicht festgelegt ist, sondern im Verlauf jeder Umordnung einige Basenpaare weiter „upstream“ oder „downstream“ liegen kann<sup>[36, 37]</sup>. Diese Flexibilität bei der Wahl der Verbindungsstelle ist, wie später gefunden wurde, charakteristisch für die Verbindungsstellen auch anderer Gensegmente<sup>[31]</sup>. Dies trifft auch dann zu, wenn das gleiche Gensegmentpaar in verschiedenen B-Zellvorläufern zusammengefügt wird, so daß die vollständigen  $V$ -„Gene“ höchstwahrscheinlich leicht unterschiedliche Codons in der Verbindungsstelle tragen.

Die  $V$ - $D$ - und die  $D$ - $J$ -Verbindungsstellen weisen noch eine andere Art von Diversität auf. Wir fanden, daß bis zu einem Dutzend Basenpaare mit zufälliger Sequenz während des Bruchs und der Neuverknüpfung von rekombinierenden Gensegmenten ohne Matrize in diese Verbindungsstellen inseriert werden<sup>[32, 33]</sup>. Der genaue Mechanismus ist noch unbekannt, es wird aber angenommen, daß die terminale Desoxynucleotid-Transferase – die in Kernen früher B-Lymphocyten vorkommt – oder ein anderes Enzym mit ähnlichen Charakteristiken eine Rolle dabei spielt<sup>[40]</sup>.

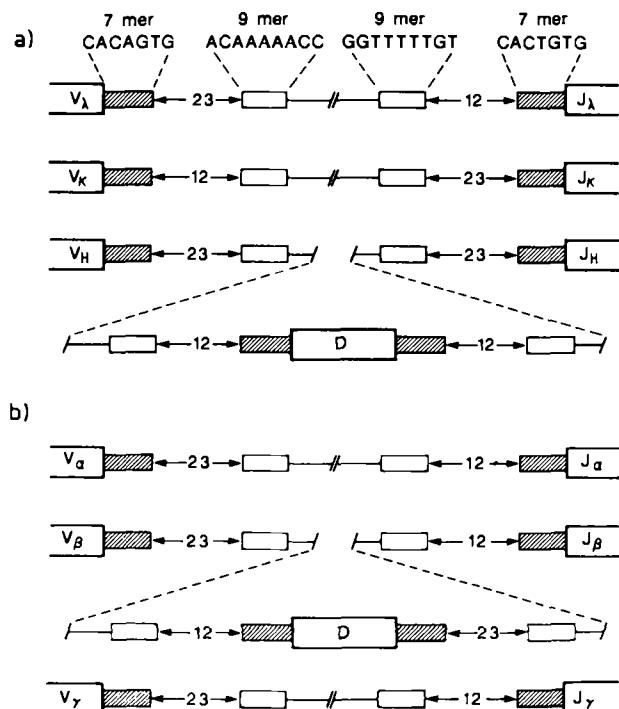


Abb. 3. Hypothetische Erkennungssequenzen für die Umordnung von Immunglobulin- und T-Zellrezeptor-Genen. Die konservierten Heptamer- und Nonamersequenzen und die Länge des zwischen diesen Sequenzen liegenden Spacers sind für die Immunglobulin- (a) und die T-Zellrezeptor-Genfamilien (b) wiedergegeben. Ganz oben sind explizit Konsens-Sequenzen angegeben. Individuelle Sequenzen können von diesen abweichen.

Nur ein Teil der V-Region ist von den beiden erwähnten Mechanismen betroffen. Das heißt aber nicht, daß sie keine wichtige Rolle für die Bestimmung der Antikörperspezifität spielen. Im Gegenteil, die Verbindungsstellen codieren die variabelsten zwei der sechs Polypeptidschleifen, die die Antigenbindungsregion des Antikörper-Moleküls bilden (Abb. 4). Des weiteren sind einige Fälle bekannt, in denen die Affinität eines Antikörpers für ein definiertes Antigen recht drastisch durch leichte Änderungen der Verbindungsstellensequenz beeinflußt wurde<sup>[41]</sup>. Die Variation der Verbindungsstellen trägt also auch zur somatischen Entstehung der Antikörperdiversität bei.

Aminosäureresten. Sie schlugen vor, daß BALB/c-Mäuse nur ein  $V_{\lambda 1}$ -„Gen“ in der Keimbahn besitzen, das die Hauptsequenz codiert, und daß alle anderen beobachteten  $V_{\lambda 1}$ -Regionen durch somatische Mutation dieses einen  $V_{\lambda 1}$ -„Gens“ während der B-Zellentwicklung entstehen. Wie im Abschnitt über Genzählung erwähnt, ließen die Ergebnisse unseres Versuchs der Zählung von Genen durch Hybridisierungskinetiken vermuten, daß das Keimbahn-Genom von BALB/c nur einige wenige  $V_{\lambda 1}$ -„Gene“ enthält. Nach der verlässlichen Southern-Blot-Methode mußten wir diese Zahl schließlich auf eins reduzieren<sup>[20]</sup>. Der letzte Beweis für die somatische Mutation von  $V_{\lambda 1}$  wurde erbracht, als

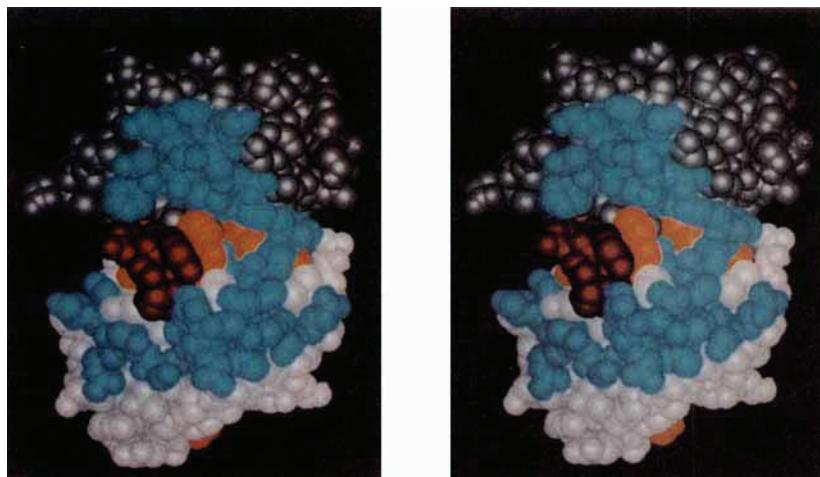


Abb. 4. Stereobild einer Antigenbindungsstelle eines Antikörpers. Das Modell stellt das Immunglobulin MOPC 603 [104] der Maus dar. Die variable Domäne der schweren Kette ist dunkelgrau, die der leichten Kette hellgrau dargestellt. Die hypervariablen Regionen (außer der VH dritten hypervariablen Region) sind blau, das Segment der schweren Kette, das vom D-Gen codiert wird, ist rot und die Segmente der schweren und leichten Kette, die von den J-Genen codiert werden, sind orange. Das D-Segment entspricht fast genau der dritten hypervariablen Region der schweren Kette; hypervariable Regionen wurden nach Novotny et al. [105] definiert; eine Ausnahme ist die zweite hypervariablen Region der schweren Kette, die nach der Definition von Kabat et al. [25] bezeichnet wurde. Das Antigen dieses speziellen Immunglobulins, Phosphorylcholin, bindet in der Kaverne in der Mitte des Bildes zwischen VH- und VL-Domäne und tritt in Wechselwirkung mit Aminosäureresten der VH- und J-Segmente der schweren Ketten sowie des VL-Segments der leichten Kette. Die Bedeutung des D-Segments wird in den zwei kristallographisch bestimmten Strukturen der Antikörper, die an das Proteinantigen Lysozym binden, gut illustriert [106, 107]. Dort beträgt der Kontaktbereich, der von D-Segmenten zugesteuert wird, bis zu 50% (bzw. 24%) des gesamten Kontaktbereichs der schweren Kette. Dieses Computerbild wurde von Jiri Novotny mit dem Programm SPHERE von Robert Brucoleri erzeugt.

### Somatische Mutation

Als F. Mcfarlane Burnet die klonale Selektionstheorie vorschlug, erkannte er die Notwendigkeit von zufälligen genetischen Vorgängen für die Bildung von Antikörpern gegen eine Vielzahl von Antigenen<sup>[42]</sup>. Er hielt somatische Mutationen für eine plausible Erklärung. Seine Idee wurde später von vielen übernommen, auch von Joshua Lederberg, Niels Kaj Jerne und Melvin Cohn<sup>[5-7]</sup>.

Die von Martin Weigert in Melvin Cohns Labor am Salk Institute zusammengetragenen Aminosäuresequenzen eröffneten die Möglichkeit, die Bedeutung von somatischen Mutationen für die Antikörperdiversität direkt zu untersuchen<sup>[7, 11]</sup>. Sie hatten die  $\lambda_1$ -leichten Ketten aus 18 Myelomas analysiert. Die Mäuse stammten aus einem InzuchtbALB/c-Stamm und hätten genetisch alle gleich sein müssen. Sie fanden, daß zwölf  $V_{\lambda 1}$ -Regionen gleich waren, aber sechs unterschieden sich von der Hauptsequenz und auch untereinander variierten diese in ein, zwei oder drei

wir das einzige Keimbahn- $V_{\lambda 1}$ -Gensegment und die umgeordneten  $\lambda_1$ -Gene eines Myeloms klonierten und sequenzierten<sup>[23]</sup>. Wie schon Weigert und Cohn angenommen hatten, entsprach die Nucleotidsequenz des Keimbahn- $V_{\lambda 1}$ -Gensegmentes der Hauptaminosäuresequenz, wohingegen das  $\lambda_1$ -Gen des Myeloms durch einen einzigen Basenaustausch verändert war.

Seit dieser Zeit sind einige Untergruppen von  $\kappa$ -leichten und schweren Ketten und deren V-Gensegmente in der Keimbahn durch Klonierung und Sequenzierung analysiert worden<sup>[43-46]</sup>. Alle Ergebnisse bestätigten, daß die im Keimbahn-Genom codierte Diversität durch somatische Mutationen weiter amplifiziert wird. Besonders aufschlußreich war die Analyse der Bindung von Phosphorylcholin (PC) an V<sub>H</sub>-Regionen durch Patricia J. Gearhart, Leroy Hood et al. Sie zeigten, daß ein einziger Basenaustausch, der ausschließlich in den VDJ-Verbindungssequenzen und in den direkt benachbarten Regionen stattfinden kann, erhebliche Auswirkungen hat<sup>[47, 48]</sup>.

## Kontrolle der Umordnung und Hypermutation während der Entwicklung

Warum haben sich im Immunsystem zwei ungewöhnliche somatisch-genetische Mechanismen, die Rekombination und die Hypermutation, entwickelt, um eine einzige Aufgabe zu erfüllen, nämlich die Diversifizierung von Antikörpern?

Ich glaube, die Antwort liegt in den unterschiedlichen Aufgaben dieser zwei genetischen Mechanismen. Dank den Anstrengungen einiger Gruppen von Zell- und Molekularimmunologen formt sich langsam ein Gesamtbild, das die Beziehung zwischen den einzelnen Stadien der B-Zellentwicklung und dem Vorkommen von somatischer Rekombination oder Mutation beschreibt (Abb. 5)<sup>[49-55]</sup>. Die somatischen Rekombinationen, die zur Diversität beitragen, beginnen zuerst bei der schweren Kette, dann folgt – während der Differenzierung von Vorläuferzellen – die leichte Kette. Die somatische Rekombination ist mit dem Auftreten von ungeprägten B-Zellen abgeschlossen<sup>[56-58]</sup>. Diese B-Zellen bilden Klone, von denen jeder aus Zellen besteht, die homogene Immunglobulin-Moleküle als Oberflächenrezeptoren tragen. Die somatische Rekombination ist also vor jeder Wechselwirkung einer B-Zelle mit Antigenen beendet.

Dringt ein Antigen zum ersten Mal in das lymphatische System ein, wird es von diesen ungeprägten B-Zellen abgetastet. Ein paar von diesen B-Zellen, die genügend Affinität für die antigene Determinante aufweisen, werden reagieren und einen der zwei folgenden Wege einschlagen: sie werden die primäre Antikörperantwort liefern oder zur Bildung von Gedächtniszellen beitragen. Beim ersten Weg werden die B-Zellen proliferieren und zu antikörpersekretierenden Plasmazellen differenzieren. Während dieses Prozesses kann die C-Region der schweren Kette von  $\mu$  zu einer anderen Klasse wechseln, Mutationen in der V-

Region sind aber sowohl in der schweren als auch in der leichten Kette selten. Demzufolge haben die durch Plasmazellen als Primärantwort sekretierten Antikörper meist die gleichen V-Regionen wie die Immunglobulin-Rezeptoren auf den ungeprägten B-Zellen, von denen sie stammen.

Im Gegensatz dazu bleiben – wenn der alternative Weg von den antigenaktivierten, ungeprägten B-Zellen eingeschlagen wird – die Immunglobuline in der Zelloberflächen-Rezeptorform und Gedächtniszellen werden gebildet. Während dieses Vorgangs scheint der Hypermutationsapparat ausgesprochen aktiv zu sein, und die Mutationsrate erreicht  $10^3$  Basensubstitutionen pro Zelle und Generation. Das Antigen selektiert schrittweise besser und besser passende Mutanten, so daß die Immunglobuline auf der Oberfläche der Gedächtniszellen eine wesentlich höhere Affinität haben als die Immunglobuline auf den ursprünglichen ungeprägten B-Zellen. „Switch“-Rekombination kommt während dieses Vorgangs ebenfalls häufig vor. Wenn das gleiche Antigen, das die Primärantwort hervorgerufen hat, nochmals in den Körper eindringt, so werden die Gedächtniszellen selektiv vermehrt und differenzieren zu Plasmazellen. Dieses ist die sogenannte Sekundärantwort, welche demnach aus Hochaffinitätsantikörpern des „reifen“ Isotyps besteht; diese Antikörper weisen erhebliche somatische Mutationen in ihren V-Regionen auf. Keine somatischen Mutationen treten mehr auf, sobald Gedächtniszellen gebildet worden sind und nur wenig oder keine weiteren Mutationen finden während der Sekundärantwort statt.

Dieses Schema der B-Zell-Differenzierung kann wie folgt zusammengefaßt werden. Ein Organismus ist auf eine Infektion mit Pathogenen, die so gut wie jedes Antigen tragen können, durch eine Vielzahl ruhender B-Zellen vorbereitet. Diese B-Zellen tragen in ihrer Art einmalige Immunglobulin-Rezeptoren, die durch je eine Kopie von vollständigen Genen für die leichten und schweren Ketten codiert werden, die zufällig oder fast zufällig aus den ererbten Gensegmenten zusammengesetzt worden sind. Da diese Zuordnung unabhängig von Antigenen vor sich geht, und da die ererbten Gensegmente gewöhnlich nicht auf eine perfekte Paßform für ein spezielles Antigen hin während der Evolution selektiert worden sind, so stammen die von Plasmazellen sekretierten Antikörper während der Primärantwort direkt von ausgewählten ruhenden ungeprägten B-Zellen und haben eine relativ geringe Affinität. Im Gegensatz dazu beliefern die dann gebildeten Gedächtniszellen durch häufig vorkommenden Austausch nur einer Base den Organismus mit einer Vielzahl von leicht geänderten Immunglobulin-Rezeptoren, von denen nur die mit der besten Paßform für das Antigen selektiert werden. Da die während der Sekundärantwort gebildeten Plasmazellen direkte Abkömmlinge dieser Gedächtniszellen sind und keine weiteren Veränderungen erfahren haben, so weisen diese Antikörper gewöhnlich eine viel höhere Affinität für das Antigen auf, als die primären Antikörper. Das erklärt das schon lange bekannte Phänomen der Antikörperreifung im Verlauf wiederholter Immunisierungen<sup>[59]</sup>.

Die somatische Entstehung von Antikörper-Genen kann demnach als ein Zweistufen-Prozeß beschrieben werden. Im ersten Schritt werden unabhängig vom Antigen Gensegment-Blöcke zu Genen zusammengefügt, die Antikör-

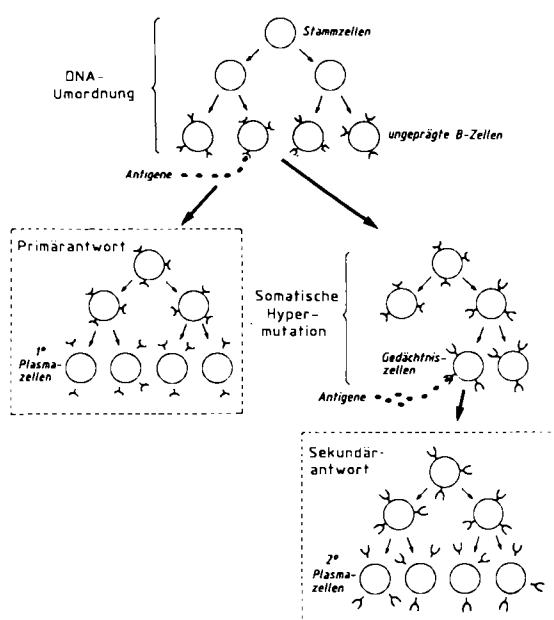


Abb. 5. Die Differenzierung von B-Zellen. Man beachte, daß die Rezeptoren der Gedächtniszellen und die Antikörper-Moleküle, die von den Plasmazellen während der Sekundärantwort sekretiert werden, besser zum Antigen passen als die Rezeptoren der ungeprägten Vorläufer-B-Zellen oder die Antikörper, die während der Primärantwort von den Plasmazellen sekretiert werden. Siehe auch Text.

per mit hoher Diversität, aber niedriger Affinität codieren. Im zweiten Schritt, sobald das Antigen definiert ist, durchlaufen eine geringe Zahl selektierter B-Zellen, die Antikörper niedriger Affinität als Zelloberflächenrezeptoren tragen, somatische Mutationen. Nur ein kleiner Teil entwickelt eine höhere Affinität für das Antigen und wird für die Weitervermehrung selektiert. Dieser Vorgang ermöglicht dem Immunsystem, auch auf geringe Konzentrationen eines Antigens zu reagieren. Was passiert mit jenen Zellen, deren Mutation zu keiner erhöhten Affinität führte? In einer jüngeren Untersuchung wird vorgeschlagen, daß einige dieser Zellen für die Selektion durch andere Antigene bereitgehalten werden<sup>[54]</sup>. Die somatische Mutation kann also auch zum Repertoire von Rezeptoren für solche Antigene, mit denen das Immunsystem noch nicht in Kontakt war, beitragen.

## T-Zellrezeptoren

Nachdem das Geheimnis des genetischen Ursprungs der Antikörperdiversität zumindest in Umrissen gelüftet war, wollten wir unsere Forschung auf die „zweite Hälfte“ des lymphatischen Systems, die T-Zellen, richten. Obwohl wir in den späten siebziger Jahren – ich war noch in Basel – häufig über das Projekt gesprochen hatten, die Antigenerkennung durch T-Zellen zu untersuchen, so begann die richtige Arbeit erst in den frühen achtziger Jahren in meinem Labor am MIT. Obwohl bekannt war, daß T-Zellen genauso präzise wie B-Zellen Antigene erkennen und unterscheiden können, so wußte man doch noch nichts über die Biochemie der verantwortlichen Moleküle, der T-Zellrezeptoren (TCR). Dieser Informationsmangel bildete einen starken Kontrast zu den reichen Kenntnissen, die man über Antikörper besaß. Unter Zellimmunologen wurden viele Diskussionen über die Natur dieser Moleküle geführt. Einige meinten, daß T-Zellrezeptoren nur eine andere Klasse von Immunglobulinen wären. Andere dachten, daß sich T-Zellrezeptoren sehr von Immunglobulinen unterscheiden. Tatsächlich hatten Experimente in den späten siebziger Jahren gezeigt, daß eine T-Zelle ein Antigen auf andere Weise erkennt als eine B-Zelle: Die T-Zelle reagiert auf Antigene auf der Zelloberfläche, und der T-Zellrezeptor erkennt gleichzeitig ein Antigen und die Determinante eines Glycoproteins, das durch ein Gen des „major histocompatibility“-Komplexes (MHC) codiert wird<sup>[60–62]</sup>. Diese Entdeckung löste eine weitere Diskussion aus: Erkennt eine T-Zelle zwei Determinanten mit einem Rezeptor oder hat sie zwei Rezeptoren, einen für das Antigen und den anderen für ein MHC-Produkt?

Das Rezeptorprotein wurde 1983 von drei Gruppen unabhängig entdeckt, die von James P. Allison, Ellis L. Reinherz sowie Phillipa Marrack und John Kappler geleitet wurden<sup>[63–65]</sup>. Sie stellten Antikörper her, die an ein Protein auf der T-Zelloberfläche banden: Da diese Proteine ähnlich waren, aber klonbedingte Strukturdiversität aufwiesen, wurden sie für gute Rezeptorkandidaten gehalten. Zusätzlich waren die von ihnen hergestellten Antikörper T-Zellklon-spezifisch; sie konnten zeigen, daß diese Antikörper die Aktivierung des T-Zellklons klonspezifisch blockierten. Der durch diese Experimente identifizierte Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$ , die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Diese Untersuchun-

gen waren entscheidend, weil der Rezeptor endlich identifiziert und seine Struktur aufgeklärt worden war und seine strukturelle Variabilität bestätigt werden konnte. Da sich jedoch nur kleine Mengen des Proteins auf der T-Zelloberfläche befanden und der Rezeptor nicht sekretiert wurde, war es schwierig, weitere Informationen über die Struktur dieses Moleküls, besonders über seine Aminosäuresequenz, zu erhalten.

## Die $\alpha$ - und $\beta$ -Gene

In der Zwischenzeit hatten Molekularbiologen versucht, die den T-Zellrezeptor codierenden Gene zu identifizieren. Doch dies war viel schwieriger als das Klonieren von Immunglobulin-Genen. Obwohl T-Zelllinien durch Hybridomas, die einen homogenen Rezeptor exprimieren, erhältlich waren, so war es doch viel schwieriger, diese Zellen in Kultur zu erhalten, als Myelomas. Außerdem produzierten sie um zwei Größenordnungen weniger Rezeptoren, als Myelomas Immunglobuline synthetisierten. 1984 gelang Mark Davis et al. an der Stanford Universität und Tak Mak et al. an der Universität von Toronto unabhängig voneinander ein Durchbruch<sup>[66–68]</sup>. Ihre Strategie basierte auf zwei Annahmen: Erstens, daß mRNAs, die die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Polypeptidketten codieren, in T-Zellhybridomas oder T-Zelltumoren vorhanden waren, nicht aber in B-Zelltumoren. Zweitens, daß die Gene der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette in T-Zellen in ähnlicher Weise umgeordnet werden wie die Immunglobulin-Gene in B-Zellen. Sie stellten also eine Bibliothek der Fraktionen von T-Zell-cDNA, die nicht mit B-Zell-mRNA hybridisierte, her und testeten jeden T-zellspezifischen cDNA-Klon auf Umordnung der korrespondierenden Gene in T-Zellen.

Als Quelle für T-Zellen benutzten Davis et al. eine Hybridomalinie, die durch Fusion einer Maus-T-Helferzelle, die das Antigen plus Klasse-II-MHC-Moleküle erkannte, mit einem T-Zelltumor erhalten worden war. Mak's Gruppe benutzte einen T-Zelltumor des Menschen. Beide Gruppen erhielten cDNA-Klone, die die oben genannten Kriterien erfüllten. Die Nucleotidsequenz zeigte, daß die entsprechende Polypeptidkette mit den Immunglobulinketten signifikant homolog war (30–35%). Außerdem enthielten die cDNA-Klone Sequenzen, die mit den V- und C-Regionen in der korrekten Richtung homolog waren. Es schien daher klar, daß das Gen, welches durch diese cDNA-Klone repräsentiert wurde, eine der zwei Untereinheiten des T-Zellrezeptors codiert. Daß es sich dabei um die  $\beta$ -Untereinheit handelte, wurde bald durch die teilweise Bestimmung der Aminosäuresequenz der menschlichen  $\beta$ -Kette bestätigt<sup>[69]</sup>.

In meinem Labor am MIT arbeiteten Haruo Seito und ich mit David Kranz und Herman Eisen zusammen an der Isolierung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -cDNA-Klone aus einer anderen Sorte von T-Zellen, nämlich einem cytotoxischen T-Zellklon, der spezifisch für die Klasse I der MHC-Moleküle war. 1984 identifizierten wir mit Hilfe einer modifizierten subtraktiven cDNA-Bibliothekmethode zwei Klassen von cDNA-Klonen, die auch alle Kriterien für ein T-Zellrezeptor-Gen erfüllten<sup>[70]</sup>. Eine Klasse repräsentierte die  $\beta$ -Untereinheit. Zusammen mit den früheren Befunden von Davis et al. konnte so gezeigt werden, daß die beiden wichtigsten T-Zellklassen, T-Helferzellen und cytotoxische T-Zel-

len, den gleichen Gensatz für die  $\beta$ -Untereinheiten enthalten. Wie wenig später klar wurde, traf das gleiche auch für die  $\alpha$ -Untereinheit zu. Dieser Punkt ist wichtig, da die beiden T-Zelltypen spezifisch für zwei Unterklassen von MHC-Genprodukten sind. Das bedeutet, daß die gleichen T-Zellrezeptor-Gene die Erkennung der Klasse I und II des MHC vermitteln.

Die Polypeptidketten, die von der anderen Klasse von T-Zell-spezifischen cDNAs codiert wurden und von mir und Saito isoliert worden waren, wiesen auch 30–35% Homologie zu Immunglobulinketten auf. Diese cDNA-Klone unterschieden sich jedoch deutlich von den  $\beta$ -cDNA-Klonen, da die Polypeptidketten – codiert durch die zwei cDNA-Sätze – nicht nur in den V-Regionen, sondern auch in den C-Regionen 30–35% homolog waren. Da nur zwei Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$ , vom T-Zellrezeptor bekannt waren, schlugen wir anfänglich vor, daß diese zweite cDNA-Klasse das  $\alpha$ -Gen repräsentiert<sup>[70]</sup>. Noch bevor diese Arbeit publiziert wurde, erhob sich die Frage, ob dieses Gen wirklich die  $\alpha$ -Kette codiert. Die in Frage kommenden  $\alpha$ -cDNAs trugen keine Codons für N-Glycosylierungsstellen. Die unveröffentlichten Untersuchungen in Charlie Janeways Labor an der Yale Universität und die von Jim Allison in Berkeley zeigten jedoch, daß sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -Untereinheiten einiger T-Zellen N-verknüpfte Kohlenhydrate enthielten. Auch wenn dieser Unterschied in der Glycosylierung noch durch unterschiedliche T-Zelltypen oder Mausstämme hätte erklärt werden können, so erhielten wir doch nach mehrwöchigem „Screening“ unserer subtrahierten cDNA-Bibliothek eine dritte Klonklasse, deren Gene ebenfalls spezifisch in T-Zellen umgeordnet wurden<sup>[71]</sup>. Dieses Gen war nicht nur im gleichen Ausmaß mit den Immunglobulin-Genen homolog wie die ersten beiden Klassen von T-Zell-spezifischen Genen, sondern enthielt auch zwei Stellen für N-Glycosylierungen und waren daher bessere Kandidaten für das  $\alpha$ -Gen. Dieser Vorschlag wurde bald durch einen Vergleich der Nucleotidsequenz mit der teilweise bekannten Aminosäuresequenz der menschlichen  $\alpha$ -Untereinheit bestätigt<sup>[72]</sup>. Etwa gleichzeitig wurde das  $\alpha$ -Gen auch aus einem Helfer-Hybridoma kloniert<sup>[73]</sup>.

Als erst einmal die cDNAs, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten codieren, identifiziert waren, war es ein Leichtes, die Organisation der korrespondierenden Gene in der genomischen DNA zu bestimmen. Diese Untersuchungen zeigten, daß  $\alpha$ - und  $\beta$ -Gene im Keimbahn-Genom und in umgeordneten T-Zellen ähnlich wie die Immunglobulin-Genen organisiert sind<sup>[74–77]</sup>. Der Organismus erbt also die genetische Information für diese Polypeptidketten als  $V_{\alpha}$ - und  $J_{\alpha}$ -Gensegmente oder als  $V_{\beta}$ -,  $D_{\beta}$ - und  $J_{\beta}$ -Gensegmente, und eine zufällige Zusammenstellung dieser Gensegmente findet ausschließlich während der T-Zellentwicklung statt. Die Diversität der an der Oberfläche von reifen T-Zellen exprimierten Rezeptoren entsteht also ähnlich wie die von Immunglobulinen. Sogar die vermuteten Erkennungssequenzen für die ortsspezifische Rekombinase, die sogenannten Heptamere und Nonamere mit den Spacern aus 12 oder 23 Basenpaaren, schienen den Immunglobulinen und T-Zellrezeptoren gemeinsam zu sein (siehe Abb. 3).

Die vollständige Primärstruktur eines T-Zellrezeptors kann von den Nucleotidsequenzen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -cDNA-Klone abgeleitet werden. Ein Vergleich mit der Primär-

struktur eines Immunglobulin-Moleküls läßt vermuten, daß der äußere Teil des Rezeptors aus vier kompakten, immunglobulinartigen globulären Domänen besteht, die aus den zwei nicht-kovalent gebundenen Paaren  $V_{\alpha}$ - $V_{\beta}$  und  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$  aufgebaut sind. Eine weitere Stabilisierung der Ketten wird durch eine Disulfidbrücke erreicht, die zwischen der C-Domäne und der Transmembranregion liegt. Dieser extrazelluläre Rezeptorteil ist in der Lipiddoppelschicht der Membran durch zwei Transmembranpeptide – je eines von den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten – verankert (Abb. 6)<sup>[70]</sup>.

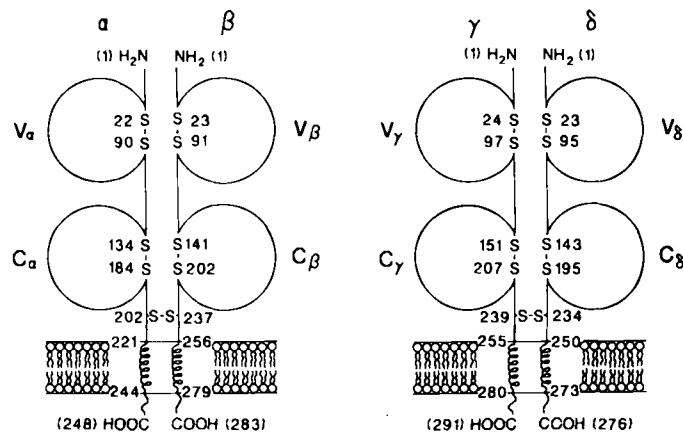


Abb. 6. Das Diagramm zeigt die Struktur der Untereinheiten des T-Zellrezeptoren  $\alpha\beta$  (links) und  $\gamma\delta$  (rechts), die von den Nucleotidsequenzen der cDNA-Klone abgeleitet wurde. Der  $\alpha\beta$ -Rezeptor stammt von dem alloreaktiven, cytotoxischen Maus-T-Zellklon 2C und der  $\gamma\delta$ -Rezeptor von dem Maus-Thymozytenhybridom KN6, der von Osami Kanagawa von den Lilly Research Laboratories in La Jolla, Kalifornien, hergestellt wurde. Intra- und Interketten-Disulfidbrücken sind eingezzeichnet. Man nimmt an, daß die Rezeptoren durch Transmembranpeptide in der Lipiddoppelschicht in der Membran verankert sind. Der unveränderliche CD3-Komplex, der mit den Heterodimeren assoziiert ist, wird nicht gezeigt.

Nachdem Struktur und Organisation der Gene, die den T-Zellrezeptor codieren, erheilt war, konnte die Diskussion über deren Verwandtschaft mit den Immunglobulinen beigelegt werden; die genetische Entstehung ihrer Diversität war geklärt. Die Befunde erklärten jedoch nicht den Mechanismus, der diesen Rezeptoren die gleichzeitige Erkennung eines Antigens und einer MHC-Determinante ermöglicht. Neuere Untersuchungen mit einer Technik, bei der T-Zellrezeptor-Gene in klonierte, funktionierende T-Zellen injiziert wurden, bestätigten, daß allein das  $\alpha\beta$ -Heterodimer diese zweifache Spezifität vermitteln kann<sup>[78]</sup>. Um zu verstehen, wie das Heterodimer zwei Determinanten zugleich erkennen kann, brauchen wir noch viel mehr Informationen über die Struktur des Rezeptors und seiner Liganden. Die Lösung dieses Problems sollte die röntgenkristallographische Analyse des Rezeptorproteins bringen.

### Der neue T-Zellrezeptor $\gamma\delta$

Die Tatsache, daß das dritte T-Zell-spezifische umgeordnete Gen die  $\alpha$ -Untereinheit codierte, machte das zweite Gen zu einem Waisenkind. Dieses Gen ist aber so eng mit den anderen beiden Genen verwandt, daß es eine Rolle bei der Erkennung durch T-Zellen spielen muß. In früheren immunchemischen Untersuchungen wurde jedoch keine Polypeptidkette gefunden, die als Genprodukt in Frage kam. Das  $\gamma$ -Gen wird auch somatisch aus  $V$ -,  $J$ - und  $C$ -Gensegmenten zusammengestellt und teilt einige

## Eigenschaften der $\alpha$ - und $\beta$ -Gene und der Immunglobulin-Gene<sup>[79, 80]</sup>.

Schon früh wurde eine Reihe von Bedeutungen der  $\gamma$ -Kette zugeschrieben. So dachte man beispielsweise, daß die  $\gamma$ -Kette eine Untereinheit eines zweiten T-Zellrezeptors sein könnte, der mit dem  $\alpha\beta$ -Heterodimer coexprimiert würde. Diese Hypothese stimmt mit dem Zwei-Rezeptoren-Modell für die Erkennung des Antigens und des MHCs durch T-Zellen überein. Als andere Möglichkeit wurde postuliert, daß ein Austausch der Untereinheiten des T-Zellrezeptors während der T-Zellentwicklung vor sich geht. Es wurde auch ein Modell vorgeschlagen, in dem T-Zellrezeptoren, die ursprünglich aus  $\gamma\beta$ -Heterodimeren bestehen, gegen  $\alpha\beta$ -Heterodimere ausgetauscht werden, sobald die T-Zelle im Thymus ausdifferenziert<sup>[81, 82]</sup>. Dieses Modell, das durch das zeitlich definierte Auftreten von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -spezifischer RNA im sich entwickelnden Thymocyt gestützt wurde, versuchte, die im Thymus stattfindende Selektion des T-Zell-Repertoires zu erklären (siehe z. B. Lit. [83]).

Spätere Untersuchungen in meinem und in einigen anderen Labors erhellten einige Charakteristika des  $\gamma$ -Gens und seiner Expression, die nicht zu diesen Hypothesen paßten: Erstens wird das  $\gamma$ -Gen in einigen T-Zell-Klonen und Hybridomas nicht umgeordnet. In T-Zellen, in denen das Gen doch umgeordnet wird, erlaubt die Verbindung von  $V$ - und  $J$ -Gensegmenten keine phasengleiche Translation der  $J$ -Region- und der  $V$ -Region-Codons<sup>[84-86]</sup>. Das  $\gamma$ -Genprodukt scheint also nicht universell in konventionellen,  $\alpha\beta$ -Rezeptor-positiven cytotoxischen und T-Helferzellen exprimiert zu werden. Zweitens, die  $\gamma$ -Polypeptidkette wird auf der Oberfläche einer kleinen (weniger als 0.5%) Population peripherer T-Zellen als Komponente eines Heterodimers,  $\gamma\delta$ , exprimiert<sup>[87-89]</sup>. Die Mehrzahl dieser T-Zellen tragen keine der CD4- oder CD8-Glycoproteine konventioneller  $\alpha\beta$ -Rezeptor-T-Zellen auf der Oberfläche, sie gehören daher zu einer ganz bestimmten Zellpopulation. Drittens ist das  $\gamma\delta$ -Heterodimer, ähnlich wie das  $\alpha\beta$ -Heterodimer, relativ fest mit dem sogenannten Glykoprotein CD3 assoziiert<sup>[87]</sup>. Der CD3-Proteinkomplex enthält eine Untereinheit, die eine zentrale Rolle bei der Übertragung des Signals vom variablen Heterodimer in die Zelle spielt<sup>[90]</sup>. Die Ähnlichkeit von  $\gamma\delta$ - und  $\alpha\beta$ -Rezeptor-Heterodimeren betrifft also sowohl ihre Struktur als auch ihre Signalübertragung durch die Membran. Viertens kommen  $\gamma\delta$ -tragende Zellen relativ häufig in der CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>-Fraktion von fötalen und adulten Thymocyten vor<sup>[91-94]</sup>. Somit sind zum Beispiel Thymocyten von 16 Tage alten fötalen Mäusen, die hauptsächlich doppelt negativ sind (z. B. CD4<sup>-</sup> und CD8<sup>-</sup>), reich an  $\gamma\delta$ -tragenden Zellen. Da doppelt negative Thymocytenpopulationen Vorläufer für reife, funktionelle  $\alpha\beta$ -tragende T-Zellen enthalten<sup>[95]</sup>, stellt sich die Frage, ob  $\gamma\delta$ -tragende Thymocyten die Vorläufer von  $\alpha\beta$ -tragenden T-Zellen sind. Fünftens sind epidermale Gewebe die Hauptexpressionsorte des  $\gamma\delta$ -Rezeptors. Vor kurzem wurde von zwei Gruppen gefunden, daß dieses Gewebe Thy-1<sup>+</sup> (ein weiterer Zelloberflächenmarker, der allen T-Zelltypen gemeinsam ist), CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup> und CD8<sup>-</sup>-Zellen enthält, die  $\gamma\delta$ -Heterodimere tragen<sup>[96, 97]</sup>. Im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen sehen diese Zellen eher wie dendritische Zellen aus und werden daher dendritische Epidermiszellen (DEC) genannt. Schließlich wird

auch das  $\delta$ -Gen umgeordnet. Die  $D$ -,  $J$ - und  $C$ -Gensegmente für die  $\delta$ -Polypeptidkette wurden vor kurzem in der  $\alpha$ -Genfamilie zwischen  $V_{\alpha}$ - und  $J_{\alpha}$ -Gensegmenten kartiert<sup>[98]</sup>. Die „Nest-Konfiguration“ der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Gensegmente ist interessant und macht neugierig, ob die Genorganisation mit der Regulation der Umordnung und Expression der zwei Gentypen möglicherweise verwandt ist. Eine weitere interessante Frage ist, in welchem Ausmaß der „Pool“ der  $V_{\alpha}$ - und  $V_{\delta}$ -Gensegmente überlappt.

Trotz des rapiden Fortschritts bei der Charakterisierung der  $\gamma$ - und  $\delta$ -Gene sowie deren Produkten ist das eigentliche Problem der physiologischen Bedeutung der  $\gamma\delta$ -Rezeptor-tragenden Zellen noch nicht gelöst. Im Augenblick kann darüber nur spekuliert werden. Der Rezeptor hat wahrscheinlich mit den Immunglobulin-B-Zell- und den  $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptoren die gleiche genetische Basis für eine somatische Diversifizierung gemein. Es ist daher wahrscheinlich, daß auch der entsprechende Ligand wenigstens teilweise durch den MHC-Komplex codiert wird<sup>[99, 100]</sup>. Die Effektorfunktion von  $\gamma\delta$ -tragenden Rezeptoren konnte bis jetzt noch nicht definiert werden, doch lassen neuere Untersuchungen mit menschlichen und Maus- $\gamma\delta$ -Zellklonen vermuten, daß viele dieser Zellen cytotoxisch sind<sup>[89, 100, 101]</sup>. Auch wurde ein neuer T-Zelltyp mit anscheinend anderen T-Zellrezeptoren in epidermalen Geweben gefunden, was der Phantasie freien Lauf läßt. Es könnte sein, daß dieser T-Zelltyp nicht nur in äußeren epithelialen Geweben vorkommt, sondern in allen epithelialen Schichten einschließlich der, die verschiedene innere Organe einkleiden (C. Janeway, persönliche Mitteilung). Falls das der Fall ist, dann könnten diese Zellen zum Schutz des Körpers, der am anfälligsten für Infektionen ist, entwickelt worden sein, das heißt zum Schutz von inneren und äußeren epithelialen Oberflächen, die in direktem Kontakt mit der Umgebung sind. Die Gegenwart von  $\gamma\delta$ -Zellen im Thymus läßt für diese Zellen zusätzlich eine Rolle innerhalb des Thymus vermuten. Es ist nicht auszuschließen, daß diese Zellen an der Selektion von geeigneten  $\alpha\beta$ -T-Zellen im Thymus beteiligt sind.

## Abschließende Bemerkungen

Restriktionsenzyme und Rekombinanten-DNA-Technologie brachten Licht in ein lang diskutiertes, zentrales Thema der Immunologie, den genetischen Ursprung der Antikörperdiversität. Es stellte sich heraus, daß ein Organismus nicht ein einziges vollständiges Gen für eine Antikörperpolypeptidkette erbt. Die genetische Information in der Keimbahn umfaßt nicht mehr als einige hundert Gensegmente. Durch eine Reihe von spezialisierten somatischen Rekombinationen, die während der Differenzierung von B-Lymphocyten stattfinden, werden diese Gensegmente zu vielen zehntausend vollständigen Genen zusammengefügt. Die somatische Hypermutation dieser Gene führt zu weiterer Diversifizierung der Antikörperpolypeptidketten, so daß B-Zellen, die besser zum Antigen passende Immunglobulin-Rezeptoren tragen, in einer späteren Phase der B-Zelldifferenzierung selektiert werden können. Im Immunsystem wurden zwei der wichtigsten Wege zur DNA-Modifikation – die Rekombination und die Mutation – ausgenutzt, um eine somatische Diversifi-

zierung der begrenzten Menge ererbter genetischer Information zu ermöglichen und so mit einer Vielzahl von Antigenen fertig zu werden.

Warum war die somatische Diversifizierung im Laufe der Evolution des Immunsystems notwendig? Mikroorganismen und von ihnen produzierte Substanzen bilden die Hauptquelle biologisch wichtiger Antigene, gegen die Vertebraten Antikörper produzieren müssen, um zu überleben. Da der Generationswechsel von Mikroorganismen um einige Zehnerpotenzen schneller ist als der von Vertebraten, können die erstgenannten auch viel schneller genetische Varianten erzeugen. Wenn also genetische Veränderungen des Keimbahn-Genoms die einzige Quelle der Antikörperfertivität bilden würden, dann könnten Vertebraten nicht mit der schnell wechselnden Antigenvielfalt fertig werden. Die somatische Diversifizierung ermöglicht dem einzelnen Organismus, eine praktisch unbegrenzte Zahl von Lymphocytenvarianten zu generieren. Vergleichbar mit einem Ökosystem unterliegen diese Lymphocyten der Selektion durch das Antigen, und die am besten angepaßten überleben. Schon Jerne und Burnet stellten fest, daß das individuelle Immunsystem daher als eine Art Mikrokosmos im Darwinschen Sinne verstanden werden kann.

Der molekularbiologische Ansatz spielte eine noch wichtigere Rolle bei der Analyse des T-Zellrezeptors, da vor der Klonierung der Rezeptor-Gene sehr wenig über dessen Struktur bekannt war. Es konnte gezeigt werden, daß die Polypeptidketten des Rezeptorproteins durch Gene codiert werden, die von denselben „Urgenen“ wie die Immunglobulin-Gene abstammen. T-Zellrezeptoren werden – ähnlich wie Immunglobuline – durch somatische Rekombination diversifiziert; sie unterscheiden sich von Immunglobulinen dadurch, daß sie keine weitere Diversifizierung durch somatische Mutation durchmachen. Der Grund dafür ist unbekannt, aber folgende Erklärung scheint möglich. Erstens wirken T-Zellrezeptoren – im Gegensatz zu Immunglobulinen – ausschließlich als Zelloberflächenrezeptoren, die auf eine Wechselwirkung mit zellgebundenen Antigenen spezialisiert sind. Ligand und Rezeptor sind – wenn T-Zellen mit Antigen-tragenden Zellen wechselwirken – zweidimensional angeordnet, und diese Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen finden bei hoher lokaler Konzentration statt, da T-Zellen über Mechanismen verfügen, sich vorübergehend an andere Zellen anzulagern. Eine Affinitätsverhöhung über die durch somatische Umordnung schon erreichte hinaus mag daher für die T-Zellerkennung nicht notwendig sein.

Zweitens besteht der Ligand zum Teil aus einer unveränderlichen Komponente, dem eigenen „self“-MHC. Da der T-Zellrezeptor während der Ontogenese und der Immunisierung für „self“-MHC-Erkennung selektiert wurde, dürfte eine Variabilität durch somatische Mutation nicht nur unnötig, sondern sogar nachteilig sein. Schließlich scheinen T-Zellen früh in der Entwicklung auf Selbsttoleranz hin, das heißt die Unfähigkeit, Selbstantigene zu erkennen, selektiert zu werden. Somatiche Mutation während der Stimulation durch Antigene – wie bei B-Lymphocyten – könnte zur Entwicklung von Autoreaktivität führen. Während autoreaktive B-Zellen von der zusätzlichen Gegenwart autoreaktiver T-Helferzellen abhängen, um Autoimmunität zu generieren, trifft das nicht auf autoreaktive T-Zellen zu, die direkt eine Erkrankung auslösen können.

Das berühmte Konzept der „Ehren-Autotoxine“ von Ehrlich, das ursprünglich für Antikörper entwickelt wurde, trifft wahrscheinlich nur auf T-Zellen zu. Es wäre interessant, autoreaktive T-Zellrezeptoren auf post-Thymus-somatische Diversifizierung hin zu untersuchen.

Zum Schluß möchte ich darauf hinweisen, daß sich während der fünfzehn Jahre, in denen ich das Immunsystem studierte, die Bedeutung der molekularen Genetik in der immunologischen Forschung radikal wandelte. Als ich begann, die Antikörperfertivität zu untersuchen, wußte man viel über Struktur und Funktion von Antikörpermolekülen und fast nichts über deren Gene. Im Gegensatz dazu war bei der neuesten Untersuchung der T-Zellerkennung kein Genprodukt bekannt, als das umgeordnete Gen γ entdeckt wurde. Allein aus der Struktur des Gens und seines Umordnungsmusters konnte abgeleitet werden, daß es sich um ein Rezeptor-Gen handelt, und diese Entdeckung hat direkt zu neuen Erkenntnissen der T-Zellentwicklung und T-Zellbiologie geführt. Diese kurze Geschichte der Forschung auf dem Gebiet der Lymphocytenrezeptoren ist ein neuerlicher Beweis für die vielen Möglichkeiten der Genetik, durch die nicht nur bekannte biologische Phänomene erklärt, sondern auch neue biologische Systeme entdeckt werden können.

*Die in diesem Beitrag beschriebene Arbeit ist nur durch die Zusammenarbeit mit vielen Kollegen, Studenten und technischen Assistenten möglich gewesen. Ich möchte jedem einzelnen meinen aufrichtigen Dank aussprechen. Ich danke auch der Firma Hoffmann LaRoche, die meine Arbeit in Basel so großzügig unterstützt hat. Mein besonderer Dank gilt Charles A. Janeway Jr., Nancy Hopkins und Yohtaroh Takagaki für viele nützliche Kommentare zum Manuskript. Jiri Novotny für die Bearbeitung der Abb. 4, und meiner Sekretärin Eleanor Lahey Basel für ihre unermüdliche Hilfe.*

Eingegangen am 24. Februar 1988 [A 684]  
Übersetzt von Dr. Christiane Koszka, Newcastle, Australien

- 
- [1] R. R. Porter, *Science* 180 (1973) 713–716.
  - [2] G. M. Edelman, *Science* 180 (1973) 830–840.
  - [3] N. Hilschmann, L. C. Craig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53 (1965) 1403–1409.
  - [4] L. Hood, D. W. Talmage, *Science* 168 (1970) 325–334.
  - [5] J. Lederberg, *Science* 129 (1959) 1649–1653.
  - [6] N. K. Jerne, *Eur. J. Immunol.* 1 (1971) 1–14.
  - [7] M. Cohn, B. Blomberg, W. Geckeler, W. Raschka, R. Riblet, M. Weigert in E. E. Sercarz, A. R. Williamson, C. F. Fox (Hrsg.): *The Immune System: Genes, Receptors, Signals*, Academic Press, New York 1974, S. 89 ff.
  - [8] A. H. Gelderman, A. V. Rake, R. J. Britten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (1971) 172–176.
  - [9] J. O. Bishop, *Biochem. J.* 126 (1971) 171–185.
  - [10] S. Tonegawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 203–207.
  - [11] M. Weigert, M. Cesari, S. J. Yonkovich, M. Cohn, *Nature (London)* 228 (1970) 1045–1047.
  - [12] A. Campbell, *Adv. Genet.* 11 (1962) 101.
  - [13] W. J. Dryer, J. Bennett, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54 (1965) 864–869.
  - [14] J. J. Danna, G. H. Sack Jr., D. Nathans, *J. Mol. Biol.* 78 (1973) 363.
  - [15] E. Southern, *J. Mol. Biol.* 98 (1975) 503.
  - [16] N. Hozumi, S. Tonegawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 3628–3632.
  - [17] M. Thomas, R. L. White, R. N. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 2294–2298.
  - [18] S. Tonegawa, C. Brack, N. Hozumi, R. Schuller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 3518–3522.
  - [19] S. Tonegawa, A. M. Maxam, R. Tizard, O. Bernard, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 1485–1489.
  - [20] C. Brack, M. Hirama, R. Lenhard-Schuller, S. Tonegawa, *Cell* 15 (1978) 1–14.
  - [21] R. Lenhard-Schuller, B. Hohn, C. Brack, M. Hirama, S. Tonegawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 4709–4713.
  - [22] C. Brack, S. Tonegawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5652–5656.

- [23] O. Bernhard, N. Hozumi, S. Tonegawa, *Cell* 15 (1978) 1133-1144.
- [24] M. Weigert, L. Gattaitan, E. Loh, J. Schilling, L. Hood, *Nature (London)* 276 (1978) 785-789.
- [25] E. A. Kabat, T. T. Wu, H. Bilofsky, M. Reid-Miller, H. Perry, U. S. Dept. of Health and Human Services Publication, 1983.
- [26] J. G. Seidman, A. Leder, M. Nau, B. Norman, P. Leder, *Science* 202 (1978) 11-16.
- [27] S. Cory, B. M. Tyler, J. M. Adams, *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (1981) 103-116.
- [28] M. M. Davis, K. Calame, P. W. Early, D. L. Livant, R. Joho, I. L. Weissman, L. Hood, *Nature (London)* 283 (1980) 733-738.
- [29] R. Maki, A. Traunecker, H. Sakano, W. Roeder, S. Tonegawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 2138-2142.
- [30] P. W. Early, H. Huang, M. M. Davis, K. Calame, L. Hood, *Cell* 19 (1980) 981-992.
- [31] H. Sakano, R. Maki, Y. Kurosawa, W. Roeder, S. Tonegawa, *Nature (London)* 286 (1980) 676-683.
- [32] H. Sakano, Y. Kurosawa, M. Weigert, S. Tonegawa, *Nature (London)* 290 (1981) 562-565.
- [33] Y. Kurosawa, H. von Boehmer, W. Haas, H. Sakano, A. Traunecker, S. Tonegawa, *Nature (London)* 290 (1981) 565-570.
- [34] Y. Kurosawa, S. Tonegawa, *J. Exp. Med.* 155 (1982) 201-218.
- [35] C. Wood, S. Tonegawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 3030-3034.
- [36] H. Sakano, K. Hüppi, G. Heinrich, S. Tonegawa, *Nature (London)* 280 (1979) 288-294.
- [37] E. E. Max, J. G. Seidman, P. Leder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 3450-3454.
- [38] B. D. Halligan, S. V. Desiderio, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 7019-7023.
- [39] R. J. Aguita, S. Akira, K. Okagaki, H. Sakano, *Cell*, im Druck.
- [40] F. W. Alt, D. Baltimore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 4118-4122.
- [41] T. Azuma, V. Igras, E. B. Reilly, H. N. Eisen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6139-6143.
- [42] F. M. Burnet: *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*. Cambridge University Press, London 1959.
- [43] A. L. M. Bothwell, M. Paskind, M. Reth, T. Imanishi-Kari, K. Rawesky, D. Baltimore, *Cell* 24 (1981) 624.
- [44] S. Crews, J. Griffin, H. Huang, K. Calame, L. Hood, *Cell* 25 (1981) 59-66.
- [45] D. Givol, R. Zakut, K. Effron, G. Rechavi, D. Ram, J. B. Cohen, *Nature (London)* 292 (1981) 426-430.
- [46] E. Selsing, U. Storb, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 5725-5735.
- [47] P. J. Gearhart, N. D. Johnson, R. Douglas, L. Hood, *Nature (London)* 291 (1981) 29-33.
- [48] S. Kim, M. Davis, E. Sinn, P. Patten, L. Hood, *Cell* 27 (1981) 573-580.
- [49] B. A. Askonas, A. R. Williamson, *Eur. J. Immunol.* 2 (1972) 487-493.
- [50] C. Berek, G. M. Griffiths, C. Milstein, *Nature (London)* 316 (1985) 412-418.
- [51] D. McKean, K. Hüppi, M. Bell, L. Standt, W. Gerhard, M. Weigert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 3180-3184.
- [52] K. Okumura, M. H. Julius, T. Tsu, L. A. Herzenberg, *Eur. J. Immunol.* 6 (1976) 467-472.
- [53] M. Sablitzberg, C. Kocks, K. Rajewsky, *EMBO J.* 4 (1985) 345-350.
- [54] M. Sickevitz, C. Kocks, K. Rajewsky, R. Dildrop, *Cell* 48 (1987) 757-770.
- [55] L. J. Wysocki, T. Manser, M. L. Gefter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 1847-1851.
- [56] R. Maki, J. Kearney, C. Paige, S. Tonegawa, *Science* 209 (1980) 1366-1369.
- [57] R. P. Perry, D. E. Kelley, C. Coleclough, J. F. Kearney, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 247-251.
- [58] M. G. Reth, P. A. Ammirati, S. J. Jackson, F. W. Alt, *Nature (London)* 317 (1985) 353-354.
- [59] H. N. Eisen, G. W. Siskind, *Biochemistry* 3 (1964) 996-1000.
- [60] A. S. Rosenthal, E. M. Shevach, *J. Exp. Med.* 138 (1973) 1194-1212.
- [61] D. H. Katz, T. Hamaoka, M. E. Dorf, B. Benacerraf, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 2624-2628.
- [62] R. M. Zinkernagel, P. C. Doherty, *J. Exp. Med.* 141 (1975) 1427-1436.
- [63] J. P. Allison, B. W. McIntyre, D. Bloch, *J. Immunol.* 129 (1982) 2293-2300.
- [64] S. C. Meuer, O. Acuto, R. E. Hussey, J. C. Hodgdon, K. A. Fitzgerald, S. F. Schlossman, E. L. Reinherz, *Nature (London)* 303 (1983) 808-810.
- [65] K. Haskins, R. Kubo, J. White, M. Pigeon, J. W. Kappler, P. Marrack, *J. Exp. Med.* 157 (1983) 1149-1169.
- [66] S. M. Hedrick, D. J. Cohen, E. A. Nielsen, M. M. Davis, *Nature (London)* 308 (1984) 149-153.
- [67] S. M. Hedrick, E. A. Nielsen, J. Kavaler, D. I. Cohen, M. M. Davis, *Nature (London)* 308 (1984) 153-158.
- [68] Y. Yanagi, Y. Yoshikai, K. Leggett, S. P. Clark, I. Aleksander, T. W. Mak, *Nature (London)* 308 (1984) 145-149.
- [69] O. Acuto, M. Fabbri, J. Smart, C. B. Poole, J. Potentis, H. D. Royer, S. F. Schlossman, E. L. Reinherz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 3851-3855.
- [70] H. Saito, D. M. Kranz, Y. Takagaki, A. C. Hayday, H. N. Eisen, S. Tonegawa, *Nature (London)* 309 (1984) 757-762.
- [71] H. Saito, D. M. Kranz, Y. Takagaki, A. C. Hayday, H. N. Eisen, S. Tonegawa, *Nature (London)* 312 (1984) 36-39.
- [72] T. H. Hannum, J. W. Kappler, I. S. Trowbridge, P. Marrack, J. H. Freed, *Nature (London)* 312 (1984) 65-67.
- [73] Y.-h. Chien, D. M. Becker, T. Lindsten, M. Okamura, D. J. Cohen, M. M. Davis, *Nature (London)* 312 (1984) 31-35.
- [74] Y.-h. Chien, N. Gascoigne, J. Kavaler, N. E. Lee, M. M. Davis, *Nature (London)* 309 (1984) 322-326.
- [75] G. Siu, M. Kronenberg, E. Strauss, R. Haars, T. W. Mak, L. Hood, *Nature (London)* 311 (1984) 344-350.
- [76] A. C. Hayday, D. J. Diamond, G. Tanigawa, J. S. Heilig, V. Folsom, H. Saito, S. Tonegawa, *Nature (London)* 316 (1985) 828-832.
- [77] A. Winoto, S. Mjolsness, L. Hood, *Nature (London)* 316 (1985) 832-836.
- [78] Z. Dembić, W. Haas, S. Weiss, J. McCubray, H. Kiefer, H. von Boehmer, M. Steinmetz, *Nature (London)* 320 (1986) 232-238.
- [79] D. M. Kranz, H. Saito, M. Heller, Y. Takagaki, W. Haas, H. N. Eisen, S. Tonegawa, *Nature (London)* 313 (1985) 752-755.
- [80] A. C. Hayday, H. Saito, S. D. Gillies, D. M. Kranz, G. Tanigawa, H. N. Eisen, S. Tonegawa, *Cell* 40 (1985) 259-269.
- [81] D. H. Raulet, R. D. Garman, H. Saito, S. Tonegawa, *Nature (London)* 314 (1985) 103-107.
- [82] B. Pernis, R. Axel, *Cell* 41 (1985) 13-16.
- [83] R. Schwarz in W. Paul (Hrsg.): *Fundamental Immunology*, Raven Press, New York 1984, S. 379-438.
- [84] E. B. Reilly, D. M. Kranz, S. Tonegawa, H. N. Eisen, *Nature (London)* 321 (1986) 878-880.
- [85] F. Rupp, G. Frech, H. Hengartner, R. M. Zinkernagel, R. Joho, *Nature (London)* 321 (1986) 876-878.
- [86] J. S. Heilig, S. Tonegawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 8070-8074.
- [87] M. B. Brenner, J. McLean, D. P. Dialynas, J. L. Strominger, J. A. Smith, F. L. Owen, J. G. Seidman, S. Ip, F. Rosen, M. S. Krangel, *Nature (London)* 322 (1986) 145-149.
- [88] L. L. Lanier, N. A. Federspiel, J. J. Ruitenberg, J. H. Phillips, J. P. Allison, D. Littman, A. Weiss, *J. Exp. Med.* 165 (1987) 1076-1094.
- [89] J. Borst, R. J. Van de Griend, J. W. van Oostveen, S.-L. Ang, C. J. Melief, J. G. Seidman, R. L. H. Bolhuis, *Nature (London)* 325 (1987) 683-688.
- [90] J. P. van Wauve, J. R. de Mey, J. G. Goosens, *J. Immunol.* 124 (1980) 2708-2812.
- [91] I. Bank, R. A. DePinho, M. B. Brenner, J. Cassimeris, F. W. Alt, L. Chess, *Nature (London)* 322 (1986) 179-181.
- [92] A. M. Lew, D. M. Pardoll, W. L. Maloy, B. J. Fowlkes, A. Kruisbeck, S.-F. Cheng, R. N. Germain, J. A. Bluestone, R. H. Schwartz, J. E. Coligan, *Science* 234 (1986) 1401-1405.
- [93] N. Nakanishi, K. Maeda, K. Ito, M. Heller, S. Tonegawa, *Nature (London)* 325 (1987) 720-723.
- [94] D. M. Pardoll, B. J. Fowlkes, J. A. Bluestone, A. Kruisbeck, W. L. Maloy, J. E. Coligan, R. H. Schwartz, *Nature (London)* 326 (1987) 79-81.
- [95] B. J. Fowlkes, *Dissertation*, George Washington University Graduate School of Arts and Sciences, Washington DC 1984.
- [96] F. Koning, G. Stingl, W. M. Yokoyama, W. L. Maloy, E. Tschachler, E. M. Shevach, J. E. Coligan, *Science* 236 (1987) 834-837.
- [97] W. A. Kuziel, A. Takashima, M. Bonyhadi, P. R. Bergstresser, J. P. Allison, R. E. Tigelaar, P. W. Tucker, *Nature (London)* 328 (1987) 263-266.
- [98] Y.-h. Chien, M. Iwashima, K. B. Kaplan, J. F. Elliott, M. M. Davis, *Nature (London)* 327 (1987) 677-682.
- [99] K. Maeda, N. Nakanishi, B. L. Rogers, W. G. Haser, K. Shitara, H. Yoshida, Y. Takagaki, A. A. Augustin, S. Tonegawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 6536-6540.
- [100] L. A. Matis, R. Cron, J. A. Bluestone, *Nature (London)* 330 (1987) 262-264.
- [101] P. Moingeon, S. Jitsukawa, F. Faure, F. Troalen, F. Triebel, M. Graziani, F. Forestier, D. Bellet, C. Bohouon, T. Hercend, *Nature (London)* 325 (1987) 723-726.
- [102] S. D. Gillies, S. L. Morrison, V. T. Oi, S. Tonegawa, *Cell* 33 (1983) 717-728.
- [103] J. Banerji, L. Olson, W. Schaffner, *Cell* 33 (1983) 729-739.
- [104] Y. Satow, G. H. Cohen, E. A. Padlan, D. R. Davies, *J. Mol. Biol.* 190 (1986) 593-604.
- [105] J. Novotny, R. E. Brucolieri, J. Newell, D. Murphy, E. Haber, M. Karplus, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 14433-14437.
- [106] A. G. Amit, R. A. Mariuzza, S. E. V. Phillips, R. Poljak, *Science* 233 (1986) 747-752.
- [107] S. Sheriff, E. W. Silverton, E. A. Padlan, G. H. Cohen, S. J. Smith-Gill, B. C. Finzel, D. R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 8075-8079.