

Vorstellungsberichte der neuen Mitglieder

JÜRGEN WIENANDS

Von der Seitenkette zur Molekularbiologie immunologischer Rezeptoren

Antikörper: Eine Allzweck-Waffe im Kampf gegen das Universum der Pathogene

Im Laufe der Evolution haben alle Lebewesen vielfältige Strategien zur Abwehr einer Infektion oder Besiedelung durch Pathogene entwickelt. Die Gegenmaßnahmen der Eindringlinge folgten meist umgehend. Das Ergebnis dieses stetigen Kampfes zwischen Krankheitserreger und Wirt sind hochkomplexe und häufig sehr individuelle Mechanismen der Abwehr und Gegenabwehr auf der Ebene von Molekülen und Zellen. Der molekulare Zwist hat jedoch ein fast universell einsetzbares Abwehr-Element hervorgebracht. Es handelt sich hierbei um Eiweiß-Moleküle (Proteine), die als Antikörper oder Immun-



Jürgen Wienands, Professor für Zelluläre und Molekulare Immunologie an der Georg-August-Universität Göttingen, O. Mitglied der Göttinger Akademie seit 2011

globuline bezeichnet werden. Antikörper sind aus insgesamt vier Polypeptid-Ketten, zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten, aufgebaut, die eine Y-artige Gesamtstruktur einnehmen¹. In der Evolution tauchen Antikörper erstmalig vor rund 400 Millionen Jahren bei den *Placodermi*, den ältesten Vorfahren der heutigen Kieferfische, auf. In Bezug zu ihrer Funktion als Abwehrwaffe sind zwei Aspekte der Antikörper besonders hervorzuheben. Zum einen können sie gegen alle biologischen Strukturen wie Proteine, Kohlenhydrate oder Nukleinsäuren gebildet werden, so dass alle Formen von Lebewesen inklusive der

Viren sowie deren Produkte (z.B. Toxine) durch Antikörper individuell erkannt und bekämpft werden können. Zum anderen ist das antigene Repertoire der Antikörper, also die Fähigkeit, unterschiedliche Strukturen zu erkennen, nahezu unbegrenzt. Dies hat zur Folge, dass unser Immunsystem bereits jetzt auf mögliche Veränderungen der Pathogene vorbereitet ist. Sollte also ein Krankheitserreger als Gegenmaßnahme zu seiner immunologischen Bekämpfung neue Struktur-Elemente entwickeln, so können sich die Antikörper-produzierenden Zellen, die sogenannten B-Lymphozyten, schnell anpassen und neue Versionen der Antikörper mit maßgeschneiderter Spezifität herstellen. Idealerweise ist unser Immunsystem so gut vorbereitet, dass im Wiederholungsfall einer Infektion mit demselben Erreger-Typ keine Krankheitssymptome auftreten, weil durch sogenannte neutralisierende Antikörper der Erreger in seiner Vermehrung und Ausbreitung unmittelbar gestoppt wird. Dieser Effekt ist den Forschern schon lange bekannt und wird als immunologisches Gedächtnis bezeichnet. Mit großem Erfolg nutzen wir das immunologische Gedächtnis, um uns und unsere Kinder sowohl vor den harmlosen Erregern (wie die jährlich wiederkehrenden Erkältungsviren) als auch den lebensbedrohlichen Infektionserkrankungen (wie Pocken oder Kinderlähmung) zu schützen. Nahezu alle Impfungen gegen Viren oder Bakterien funktionieren über die Induktion von langlebigen Gedächtnis-B-Zellen, die neutralisierende Antikörper produzieren! Diese Umstände bringen das immunologische Gedächtnis immer wieder in die aktuellen Schlagzeilen der allgemeinen Presse. Jüngstes Beispiel ist das Aufspüren eines besonders wirksamen Antikörpers gegen Grippe-Viren. Dieser Befund wurde mit großem Enthusiasmus z.B. in der Juli-Ausgabe 2011 des *Spiegels* und in der BBC in England gefeiert, da er Hoffungen auf die Entwicklung eines Universal-Impfstoffes gegen Grippe weckt. Ob dies gelingt, bleibt dahingestellt. Die Entwicklung neuer und potenter Impfstoffe beruht in weiten Teilen nach wie vor auf empirischen Forschungsansätzen. Erst in jüngster Zeit werden – Dank eines besseren Verständnisses unseres Immunsystems – Versuche unternommen, Impfstoffe am molekularen Reißbrett mit dem Slogan des ‚Designer-Impfstoffes‘ zu entwickeln. Vor diesem Hintergrund ist es naheliegend, dass die universitäre wie pharmazeutische Forschung seit Jahrzehnten enorme (auch finanziell groß angelegte) Anstrengungen unternimmt, um das immunologische Gedächtnis in seinen Einzelheiten zu entschlüsseln. Dies ist jedoch bislang nur fragmentarisch gelungen.

Die Geschichte der Antikörperforschung kommt auch nach Göttingen

Die wissenschaftliche Historie der Antikörper-Forschung und die Beschreibung bzw. Anwendung des Impfeffektes ist lang und mit berühmten Persönlichkeiten vergesellschaftet; genauer gesagt waren es die Antikörper, die diesen Forschern zu Ruhm, Ehre und mitunter großem wirtschaftlichen Wohlstand verholfen haben. Für keine einzelne wissenschaftliche Fragestellung wurden mehr Nobelpreise verliehen als für die Erforschung der Antikörper. Erstmals wurden Antikörper als sogenannte Antitoxine durch Emil von Behring und seinem Kollegen Shibasaburo Kitasato im Jahre 1890 beschrieben. Es war in Deutschland die Zeit großer Epidemien wie Cholera, Diphtherie oder Tetanus. Die beiden Forscher entdeckten, dass sich nach Injektion von Diphtherie- oder Tetanus-Toxinen in Kaninchen das Blutserum der Tiere verändert. Es enthält jetzt Substanzen – die Antitoxine – die, auf noch unbehandelte Tiere übertragen, eine schützende oder gar heilende Wirkung ausüben.² Emil von Behring nutzte diesen Befund für eine erste biotechnologische Firmengründung und entwickelte in Marburg seine Serumtherapie, bei der Blutseren von Toxin-immunisierten Pferden zur Heilung von infizierten Personen eingesetzt wurden. Von Behring wurde nicht nur wohlhabend, sondern erhielt 1901 auch den ersten Nobelpreis für Medizin.

Unmittelbar nach der Entdeckung der Antitoxine begann das Rätselraten um deren stoffliche Natur und vor allem, wer oder was im Organismus produziert diese Stoffe? Es war der bei Breslau geborene Paul Ehrlich, der schon wenige Jahre nach der Erstbeschreibung der Antitoxine – also noch lange vor einem allgemeinen Verständnis von Molekülen und Zellen im Organismus – eine Hypothese aufstellte, die auch über 120 Jahre später in ihren wesentlichen Aspekten noch Bestand hat. In seiner ‚Seitenketten-Theorie‘ schlägt Paul Ehrlich vor, dass Antitoxine zunächst auf der Oberfläche von Zellen als Erkennungs-Sensoren verankert sind und das extrazelluläre Milieu nach Toxinen abtasten.³ Trifft das Antitoxin auf sein spezifisches Toxin (heute allgemein als cognates Antigen bezeichnet), so löst diese Interaktion intrazelluläre Signale aus, die im Endergebnis dazu führen, dass sich die Zelle vermehrt und differenziert. Die ursprünglich membranständigen Antitoxine werden nun in großer Anzahl ins Serum als lösliche Abwehrstoffe abgegeben. Damit hatte Paul Ehrlich nicht nur die so wichtige Antikörper-Bildung in ihren Grundzügen skizziert, sondern er hat auch gleichzeitig ein fundamentales Prinzip der Biologie aufgezeigt; nämlich, dass Zellen über Rezeptoren auf der Zelloberfläche mit ihrer Umgebung in Kontakt treten und sich ggf. verändern können, d.h.

ein biologisches Antwortverhalten zeigen, wenn die Schalterfunktion des Rezeptors durch seinen Liganden ausgelöst wird. Ein weiteres, allgemein bekanntes Beispiel für diese nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip funktionierende Zell-Kommunikation ist die Wirkung von Hormonen, die als lösliche Botenstoffe im Körper Informationen über die Bindung an ihre spezifischen Hormon-Rezeptoren transportieren. Paul Ehrlich erhielt für seine bahnbrechende Theorie im Jahre 1908 den Nobelpreis für Medizin. Zu dieser Zeit war Ehrlich Direktor des Königlichen Instituts für experimentelle Therapie in Frankfurt am Main. Seit 1904 war Paul Ehrlich Mitglied der Akademie der Wissenschaften zu Göttingen und ordentlicher Honorarprofessor der Georgia Augusta (bis 1914).

Geradezu fieberhaft wurden die Antikörper von Biologen, Chemikern und Medizinerinnen befochten. Man erkannte Anfang der zwanziger Jahre des letzten Jahrhunderts, dass Antikörper gegen nahezu alle Substanzen der belebten wie der unbelebten Natur und sogar gegen chemisch-synthetisierte Strukturen gebildet werden können. In den 1930er Jahren gelang der Nachweis, dass Antikörper Proteine sind, die man in den 50er und 60er Jahren auf der Oberfläche von Zellen der Lymphe fand, den B-Lymphozyten, von denen die Antikörper auch gebildet werden. Zu dieser Zeit streifte die Geschichte der Antikörper-Forschung die Stadt Göttingen ein zweites Mal. Norbert Hilschmann, ehemaliger Direktor am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, gelang es als Erstem, einzelne Aminosäure-Bausteine genau jener Antikörper-Bereiche zu entschlüsseln, die für die Erkennung und Bindung der Antigene verantwortlich sind¹. Diese Pionierleistung war ein Meilenstein zum Verständnis der Funktionsweise von Antikörpern und gab auch erste Hinweise, wie genau diese von den B-Lymphozyten gebildet werden könnten. Der genaue Syntheseweg der Antikörper wurde aber erst mit Hilfe der Gentechnik in den 70er und 80er Jahren aufgeklärt. Offen blieb jedoch zunächst die Frage nach der Funktionsweise der Antikörper als membranständiger Kommunikationsschalter, so wie es Paul Ehrlich postuliert hatte und wie es mittlerweile für Hormon-Rezeptoren schon gezeigt werden konnte. Die vielfach fehlgeschlagenen Experimente zur Beantwortung dieser Fragestellung ließen einige Immunologen sogar so weit gehen, dass sie eine Signalfunktion membranständiger Antikörper gänzlich verneinten und die Tatsache, dass sie existieren, einem „evolutiven Irrtum“ zuschrieben. Paul Ehrlich wusste es besser. Denn zu Beginn der 1990er Jahre fand man zwei Partner-Proteine der membranständigen Antikörper, die als Ig- α und Ig- β bezeichnet werden

¹ Prof. Dr. Norbert Hilschmann verstarb am 3.12.2012.

und intrazelluläre Signalkaskaden auslösen können. Zu dieser Entdeckung konnten auch wir maßgeblich beitragen. Damit war die Grundstruktur der Seitenkette von Paul Ehrlich entschlüsselt. Man sprach fortan vom B-Zell-Antigen-Rezeptorkomplex (BZR), der aus einem membranständigen Antikörpermolekül zur Antigen-Erkennung und den Ig- $\alpha\beta$ -Proteinen zur zellulären Aktivierung besteht⁴. Es gibt im BZR also eine Arbeitsteilung für die Sensorfunktion und die Signalauslösung (Abbildung 1).

Die lymphoide Erfolgsgeschichte der Aminosäure Tyrosin

Der komplexe Aufbau des BZR aus mehreren Protein-Bausteinen war in gewisser Weise unerwartet. Hinzu kam, dass den Ig- $\alpha\beta$ -Proteinen keine eigene enzymatische Aktivität nachgewiesen werden konnte, wie es bei Signalgebern anderer Rezeptor-Typen der Fall ist. Lange hielt sich die Theorie, dass der BZR klassische G-Proteine zur Signalauslösung verwendet⁵. Trimere G-Proteine waren als Effektor-Moleküle für eine Vielzahl von Oberflächen-Rezeptoren ohne intrinsische Enzymaktivität beschrieben worden. Und in der Tat, ähnlich zu den Rezeptoren, die an G-Proteine koppeln, löst auch die Antigen-vermittelte Aktivierung des BZR die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen als intrazellulären Botenstoff aus. Die Suche nach dem BZR-gekoppelten G-Protein war aber erfolglos. Es existiert nicht. Der Schlüssel zur Aufklärung der BZR-Signalleitung war die Identifizierung eines Aminosäure-Motivs in den Ig- $\alpha\beta$ -Proteinen, das als zentrale Schaltkomponente die Aminosäure Tyrosin (abgekürzt als Tyr oder Y) enthielt⁶. Der Name Tyrosin leitet sich vom griechischen Wort für Käse ab, dessen Hauptkomponente das Tyrosin-haltige Protein Kasein ist. Tyrosin ist eine aromatische Aminosäure, deren Hydroxyl-Gruppe mittels Phosphorylresten modifiziert werden kann. Durch die Phosphorylierung der Tyrosin-Reste in Ig- α und Ig- β rekrutiert der BZR ein Enzym aus dem Zytosol der Zelle, das den Namen *Spleen Tyrosine Kinase* (abgekürzt Syk) trägt und das zur Klasse der Phosphotransferasen (weniger korrekt als ‚Kinasen‘ bezeichnet) zählt. Im Endergebnis besitzt daher auch der BZR eine katalytische Aktivität, wenngleich diese nicht kovalent assoziiert ist⁴.

Eine Arbeitsgruppe aus den USA und unser Labor machten sich Mitte der 1990er Jahre auf die Suche nach dem Substrat-Protein des Syk-Enzyms. Die Erwartung war, dass wir wie bei anderen Rezeptor-Systemen auf weitere Enzyme stoßen, die Signale amplifizieren und prozessieren. Aber auch dieses Mal nahm der BZR eine gewisse biochemische Sonderstellung ein. Das Syk-Substrat war ein Gerüst-Protein ohne enzymatische Funktion.

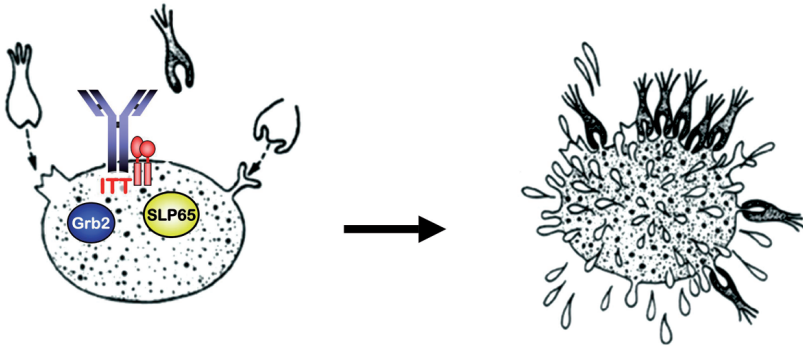


Abbildung 1: Die von Paul Ehrlich postulierte Seitenkette zur Erkennung von Pathogenen¹ ist ein multimerer Antigen-Rezeptor-Komplex (BZR) auf der Zelloberfläche von B-Lymphozyten (links), die nach Aktivierung in Antikörper-sezernierende Plasmazellen differenzieren (rechts). Der BZR besteht aus einem membranständigen Antikörper (grau) und den signalleitenden Untereinheiten Ig- α und Ig- β (rot). Alle BZR-Klassen übertragen Aktivierungssignale über das Effektor-Protein SLP65 (gelb). Der IgG-BZR auf Antigen-erfahrenen B-Zellen besitzt ein zusätzliches Signalmotiv (genannt *ITT*, siehe Text), das über Grb2 (blau) die Signale verstärkt und so zu einem ausreichenden Impfschutz nach erneutem Pathogen-Kontakt beiträgt. In der Abbildung wurde das ursprüngliche Schema aus der Seitenketten-Theorie¹ verwendet und mit den farbigen Elementen des BZR und seiner Signal-Moleküle ergänzt.

Wir taufte dieses Adapter-Protein SLP65⁷ (Abbildung 1). Unsere amerikanischen Kollegen nannten es BLNK. Vielfältige biochemische und genetische Studien in nationalen und internationalen Instituten zeigten, dass die Tyrosin-Phosphorylierung von SLP65 durch das Syk-Enzym zum Aufbau großer Protein-Komplexe führt, die ein ganzes Netzwerk intrazellulärer Signalkaskaden steuern. Das Tyrosin-phosphorylierte SLP65 stellt im Prinzip eine Art Verschiebebahnhof für Signale dar, die am BZR initiiert wurden und nun präzise ins Zellinnere weitergeleitet werden müssen, um die Aktivierung der B-Lymphozyten zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen zu koordinieren. Der genaue Aufbau und die Verschaltung des SLP65-gesteuerten Signalrelais⁷ sind noch nicht abschließend entschlüsselt. Wir wissen jedoch, dass selbst kleine Erbfehler in diesem Tyrosin-basierten Netzwerk zu teils schweren Immun-Defekten beim Menschen führen können.

Die Bedeutung von Tyrosin für das Erinnerungsvermögen der B-Zellen

Mit jeder Impfung greifen wir auf das immunologische Gedächtnis zurück, ohne genau zu verstehen, wie sich das Immunsystem an eine erste Konfrontation mit einem Erreger erinnert, um beim erneuten Aufeinandertreffen in der Lage zu sein, die B-Zell-Aktivierung derart zu forcieren, dass eine Ausbreitung des Pathogens durch neutralisierende Antikörper verhindert wird. Die Frage nach dem Ort des Abspeicherns der Impfinformation wird unter Immunologen nach wie vor kontrovers diskutiert. Es lag nahe, den B-Zellen selbst diese Fähigkeit zuzubilligen. Jedoch wurde in den vergangenen zwei Jahrzehnten vielfach einer anderen Art der Lymphozyten, den im Thymus reifenden T-Zellen, die zentrale Erinnerungsfunktion zugeschrieben⁸. Zwar gab und gibt es gute Hinweise, dass T-Zellen ein Gedächtnis haben, aber man ignorierte Experimente aus der Anfangszeit der zellulären Immunologie in den 1970er Jahren, die gezeigt hatten, dass isolierte B-Lymphozyten aus einer immunisierten Maus in der Lage sind, nach Transfer in eine zweite, noch nicht immunisierte Maus, eine sekundäre Antikörper-Antwort auch ohne T-Zellen auszulösen⁹. Für uns B-Zell-Forscher sah es lange so aus, als ob auch das kennzeichnende Kernkriterium einer Zweitantwort, die Produktion neuer BZR-Klassen, nicht weiterhalf, den B-Lymphozyten aus ihrer zugeschriebenen Vergesslichkeit heraus zu helfen oder – anders formuliert – ihnen einen eigenständigen Beitrag zur erhöhten Sensitivität nach Zweitkontakt mit einem Pathogen zuzuschreiben. Im Gegenteil, ein schwerwiegendes Gegenargument leitete sich aus der schon beschriebenen BZR-Signalleitung ab. Gemäß der immunologischen Lehrbücher, greifen alle BZR-Klassen auf die Tyrosin-basierte Signalleitung durch Ig- $\alpha\beta$ zurück, so dass sowohl die IgM-Klasse auf neu-gebildeten B-Zellen als auch die IgG-Klasse auf Antigen-erfahrenen B-Zellen identische Signale aussenden. Ergo schien die Debatte bezüglich des Leistungsvermögens der verschiedenen BZR zum immunologischen Gedächtnis entschieden; der BZR aktiviert die B-Zelle immer nach dem gleichen biochemischen Muster, unabhängig davon, welcher Antikörper-Typ, IgM oder IgG, als Antigen-Sensor mit Ig- $\alpha\beta$ assoziiert ist. Jüngere Experimente in unserem Labor ergaben jedoch ein anderes Bild. Zunächst fanden wir, dass der BZR der Klasse IgG, der nur von Antigen-erfahrenen B-Lymphozyten ausgeprägt wird, zusätzlich zu SLP65 mit einem weiteren Signal-Protein, dem Adapter-Molekül Grb2 kommuniziert¹⁰ (Abbildung 1). Diese Befunde waren für uns sehr bedeutsam, denn Grb2 ist für Signal-Forscher kein Unbekannter. Grb2 ist ein in der Fachliteratur vielfach beschriebenes und zentrales Effektor-Element bei der Signal-Übertragung von Hormon-

Rezeptoren. Daher war unsere Arbeitshypothese, dass der IgG-BZR auf Antigen-erfahrenen B-Lymphozyten Signalwege anschalten kann, die dem IgM-BZR auf noch ruhenden B-Lymphozyten verschlossen bleiben. Dies widersprach nicht nur dem Dogma in den Lehrbüchern, sondern deutete an, dass sich je nach BZR-Klasse das Antwortverhalten der B-Zellen ändert. Sollte dies der Fall sein, so wäre der IgG-BZR, der nur von Antigen-erfahrenen B-Lymphozyten verwendet wird, ein unmittelbarer Entscheidungsträger für eine gesteigerte B-Zell-Aktivierung nach Zweitkontakt mit einem cognaten Antigen.

Um die weitreichende Hypothese einer BZR-intrinsischen Signalmodulation bei Antigen-erfahrenen B-Zellen zu überprüfen, mussten wir zunächst die Interaktion zwischen dem IgG-BZR und Grb2 molekular kartieren. Nur so war es möglich, über gentechnische Verfahren Mutanten des IgG-BZR herzustellen, die einen selektiven Defekt in der Grb2-Kommunikation aufweisen. Über den Vergleich der Mutanten zum wild-typischen IgG-BCR sollte es dann gelingen, einen Einfluss von Grb2 auf die BZR-Signalkapazität direkt abzulesen. Dieser Ansatz war aufwendig, aber in gleich mehreren Aspekten erfolgreich. Zum einen zeigte sich, dass die Interaktion zu Grb2 nicht über die klassischen BZR-Signalkomponenten Ig- α und Ig- β verläuft, sondern direkt über einen phosphorylierten Tyrosin-Rest in den zytoplasmatischen Segmenten der membranständigen IgG-Antikörper. Datenbank-Recherchen ergaben, dass dieser singuläre Tyrosin-Rest in der Evolution hoch konserviert und selbst bei den membranständigen Antikörpern der Vorfahren unserer heutigen Kieferfische zu finden ist. Dies war ein weiterer Hinweis auf eine zentrale Funktion des Tyrosins im membranständigen IgG. In der Tat, unsere Anfangshypothese wurde in allen Untersuchungen zur Signalkapazität der mutanten und wild-typischen IgG-BZR bestätigt. Die Tyrosin-vermittelte Kopplung des IgG-BZR an Grb2 amplifiziert die B-Zell-Aktivierung im Vergleich zur Signalstärke des IgM-BZR. Dabei ist hervorzuheben, dass unsere inaktivierende Mutation sehr subtil gestaltet wurde. Das entscheidende Tyrosin wurde gegen die verwandte Aminosäure Phenylalanin ausgetauscht; d.h. lediglich die Hydroxyl-Gruppe wurde entfernt, so dass die Phosphorylierung unterbunden wird, während die aromatische Ringstruktur erhalten bleibt. Da mit unseren Experimenten die Signalfunktion des Tyrosin-Restes und seiner phosphorylierungs-abhängigen Interaktion zu Grb2 bewiesen war, gaben wir diesem Signalschalter im IgG-BZR einen eigenen Namen und taufte ihn *Immunoglobulin Tail Tyrosine* (abgekürzt ITT)¹⁰.

Wenngleich unsere Entdeckung des ITT von der Fachwelt äußerst positiv aufgenommen wurde, so gab es dennoch einen Schönheitsfehler in

unserem experimentellen Aufbau. Unsere genetischen Studien waren an gezüchteten B-Zell-Kulturen in der Petrischale durchgeführt worden, da nur so ausreichend Zellen für biochemische Experimente gewonnen werden konnten. Wie bedeutsam aber ist das ITT für das immunologische Antwortverhalten von B-Zellen im lebenden Organismus und trägt die ITT/Grb2-Interaktion zum Gedächtnis der B-Zellen bei? Die Klärung dieser Kernfrage bedurfte des erneuten Einsatzes modernster Methoden der Gentechnik. Embryonale Stammzellen der Maus wurden verwendet, um das ITT-Motiv in den IgG1-Genen der Maus durch den schon erwähnten Phenylalanin-Austausch zu inaktivieren. Wir konnten so ITT-Mausmutanten herstellen und deren Fähigkeit zur Antikörper-vermittelten Immunantwort in entsprechenden Impfstudien direkt messen. Die Ergebnisse waren eindeutig. Die ITT-defizienten B-Zellen unserer Mausmutante antworteten signifikant schlechter auf Antigen-Stimulation und produzierten sehr viel weniger lösliche IgG-Antikörper als ITT-positive Wildtypen. Die sekundäre Antikörper-Antwort der Mutanten erreichte nicht einmal das Niveau der primären Antikörper-Antwort in Wildtypen. Das ITT ist also tatsächlich ein BZR-intrinsischer Signalverstärker, der den IgG-positiven B-Zellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber einem bereits bekannten Antigen verleiht. Kurz gesagt, ITT-defiziente B-Zellen sind vergesslich! Die Entdeckung, dass der ITT-tragende BZR der Antigen-erfahrenen B-Zellen maßgeblich zum Erfolg einer sekundären Antikörper-Antwort beiträgt, gibt uns die Hoffnung, langfristig neue und besonders zielgerichtete Impfstrategien zu entwickeln.

Literatur:

1. Huber, R. Spatial structure of immunoglobulin molecules. *Klin Wochenschr* **58**, 1217–1231 (1980).
2. Behring, E. & Kitasato, S. Über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren *Dt Med Wochenschr* **16**, 1113–1114 (1890).
3. Ehrlich, P. On immunity with special reference to cell life. *Proc Roy Soc Lond* **66**, 424–448 (1900).
4. Reth, M. & Wienands, J. Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* **15**, 453–479 (1997).
5. DeFranco, A.L. & Gold, M.R. Signal transduction via the B cell antigen receptor: involvement of a G protein and regulation of signaling. *Adv Exp Med Biol* **254**, 101–112 (1989).
6. Reth, M. Antigen receptor tail clue. *Nature* **338**, 383–384 (1989).

7. Wienands, J. *et al.* SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation. *J Exp Med* **188**, 791–795 (1998).
8. Zinkernagel, R.M. On differences between immunity and immunological memory. *Curr Opin Immunol* **14**, 523–536 (2002).
9. Klinman, N.R. & Doughty, R.A. Hapten-specific stimulation of secondary B cells independent of T cells. *J Exp Med* **138**, 473–478 (1973).
10. Engels, N. *et al.* Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells. *Nat Immunol* **10**, 1018–1025 (2009).