Andreas Plückthun

Genzentrum der Universität München, Martinsried bei München

Geboren 1956 in Heidelberg, Studium der Chemie in Heidelberg. Nach dem Vordiplom Wechsel an die University of California at San Diego (La Jolla, USA) mit einem Fulbright Stipendium. Promotion 1982 bei Prof. Edward Dennis, gefördert von der Studienstiftung des deutschen Volkes. Graduate Research Preis der Intrascience Foundation, Los Angeles. 1982 bis 1985 Postdoctoral Fellow an der Harvard University (Cambridge, USA) bei Prof. Jeremy Knowles. Seit 1985 Leiter einer Arbeitsgruppe am Genzentrum Martinsried, Habilitation 1989. 1990 Dozenten-Stipendium des Fonds der Chemischen Industrie. Forschungs-Interesse: Protein-Engineering.

reprinted from:
A. Plückthun, Antigen-bindende Fragmente eines Antikörpers, produziert in Escherichia coli. In: 40 Jahre Fonds der Chemischen Industrie. Wissenschaftliche Beiträge von Dozenten-Stipendiaten. (1990) pp. 187-196.

Antigen-bindende Fragmente eines Antikörpers, produziert in *Escherichia coli*

Einführung

Aufgrund ihrer hochselektiven Bindungseigenschaften sind Antikörper bedeutende Reagenzien in der Forschung, der medizinischen Diagnostik und der Therapie. Obwohl die Spezifität von Antikörpern gegen eine enorme Vielfalt von Molekülen gerichtet sein kann, sind doch alle Antikörper nach einem erstaunlich ähnlichen Bauprinzip konstruiert. Sie stellen eine Art Protein Engineering System der Natur dar. Es ist deshalb sehr verlockend, die Antikörper-Moleküle auch als Modellsystem für Protein Engineering im Labor zu benutzen.

Antikörper sind besonders geeignete Objekte, um Protein-Liganden-Wechselwirkungen zu untersuchen, da die Domänen-Struktur ziemlich unabhängig von der Bindungsspezifität ist. Es wurden bereits mehrere dreidimensionale Strukturen von F_{ab}-Fragmenten von Antikörpern bestimmt und ihre Gemeinsamkeiten beschrieben [1]. Alle Antikörperdomänen besitzen zwei Schichten von antiparallelen Faltblattstrukturen. Die variablen Domänen bestehen aus einer relativ konstanten Gerüststruktur (in β-Faltblatt-Anordnung) sowie drei hypervariablen Schleifen pro variable Domäne. Diese hypervariablen Schleifen enthalten die Reste, die mit dem Antigen in Kontakt treten.

Während einige Autoren Expressionsmethoden für gentechnologisch veränderte Antikörper in eukaryontischen Zellen entwickelt hatten [2], waren zu Anfang dieser Arbeiten keinerlei mikrobielle Systeme beschrieben, mit denen nativ gefaltete Antikörper oder Antigen-bindende Fragmente exprimiert werden konnten. Die Chancen dafür wurden sogar eher pessimistisch beurteilt. Im Folgenden sollen jedoch die Vorteile eines bakteriellen Expressionssystems (besonders von *E. coli*) erläutert werden sowie das von uns entwickelte *E. coli*-Expressionssystem genauer beschrieben werden, mit dem nun funktionale F_v- und F_{ab}-Fragmente (Abbildung 1) erhalten werden können.

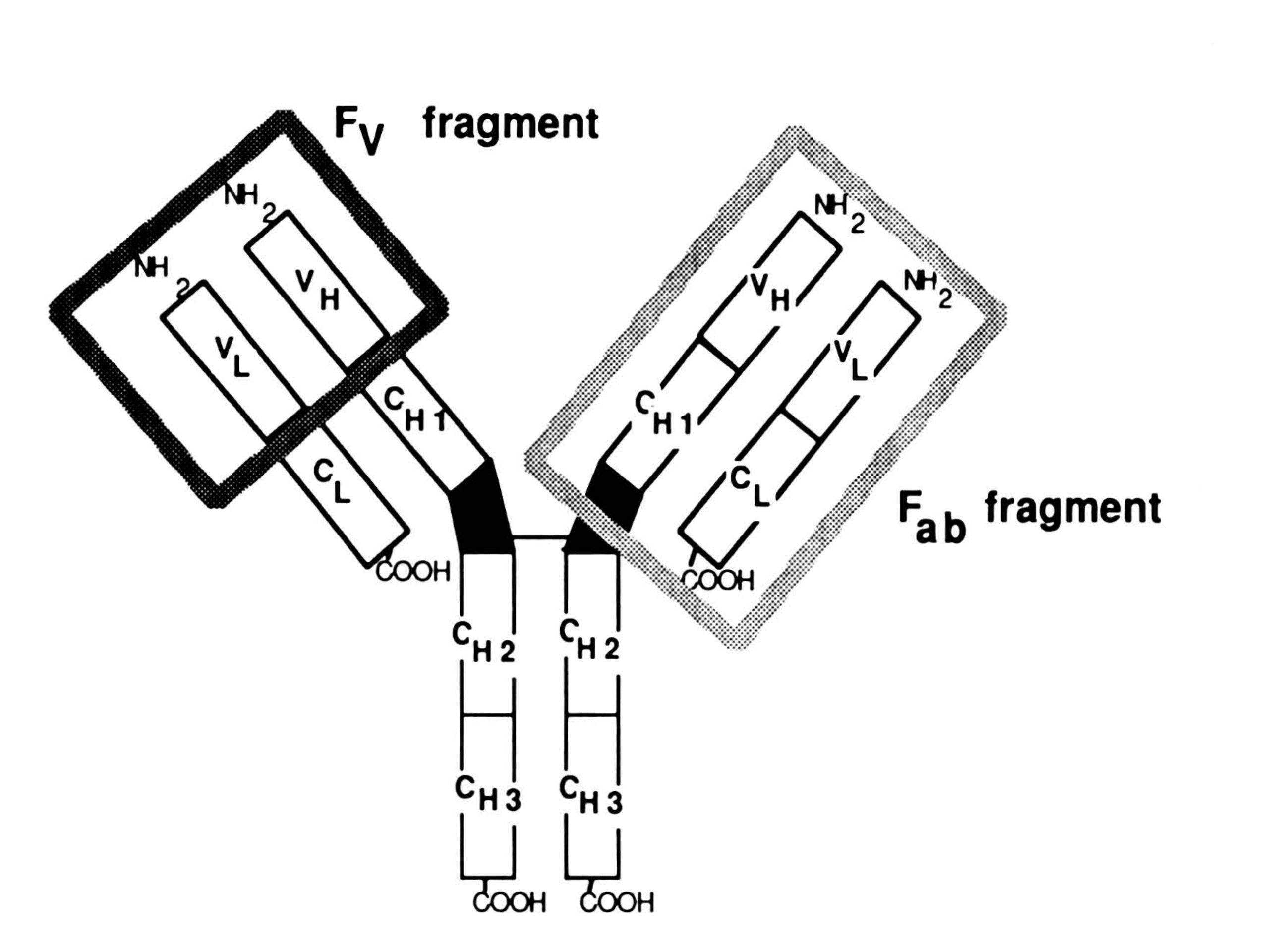


Abbildung 1: Das F_V- und F_{ab}-Fragment eines Antikörpers.

Das Expressionssystem: Engpaß für viele Anwendungen gentechnologisch veränderter Antikörper

Die Anwendungen, die gentechnologisch veränderte Antikörper-Moleküle haben könnten, sind sehr vielfältig. Für einige Problemstellungen in Forschung und Diagnostik könnte es günstig sein, verbesserte Antikörper gegen wenig immunogene oder schlecht bindende Antigene zu entwickeln. Ebenso könnte es notwendig sein, die Bindung bestimmter Substanzen an Antikörper zu *verschlechtern*, zum Beispiel solcher, die in bestimmten Assays ein Hintergrundproblem darstellen. Weitere Möglichkeiten ergeben sich durch Veränderung des Gerüsts (*framework*) der Antikörperdomänen und der nicht an der Bindung beteiligten konstanten Domänen: Durch die Verwendung menschlicher Domänen könnten zum Beispiel Antikörper von geringer Antigenizität zur Therapie eingesetzt werden und durch die Verwendung bestimmter Antikörperklassen könnten definierte Effektorfunktionen erzielt werden. Ebenso könnten völlig neue Hybridmoleküle konstruiert werden, die nicht in der Natur vorkommen. Beispielsweise könnten die konstanten Domänen durch Marker-Enzyme, Metallionen bindende Domänen (als immundiagnostische Reagentien) oder durch Toxine ersetzt werden. Schließlich könnten mit den Methoden der Gentechnologie direkt Fragmente des Antikörpers hergestellt werden, und die Notwendigkeit einer Proteolyse wäre umgangen.
Die Entwicklung all dieser Varianten für die verschiedenen Anwendungsbereiche erfordert ein leicht handhabbares Expressionssystem. Mehr noch, die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Bindungsspezifität und Struktur, die ja die Voraussetzung für all diese Anwendungen ist, steht selbst völlig am Anfang und bedarf selbst eines praktikablen, einfach

anzuwendenden Expressionssystems. Von uns wurde eine Methode zur Sekretion der Antikörper-Fragmente in das Periplasma von *E. coli* entwickelt [3], mit der erstmals die Vorteile der nativen Expression von Antikörperfragmenten mit denen der leichten Handhabbarkeit von Bakterien kombiniert werden konnten. Dieses Verfahren wurde weiter verbessert (Skerra und Plückthun, in Vorbereitung) und hat sich nun als praktikable präparative Methode zur Herstellung von F_v und F_{ab}-Fragmenten bewährt.

Das Modellsystem McPC603

Als Modellsystem wurde das ungewöhnlich gut charakterisierte Maus-Immunglobulin A McPC603, ein Myelom-Protein, ausgewählt. Dieser Antikörper bindet Phosphorylcholin. In früheren Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen (zusammengefaßt in [4]) waren bereits die Proteinsequenz, die Bindungskonstanten von Haptenen, die Bindungskinetik und, Voraussetzung für alle unsere Arbeiten, die dreidimensionale Struktur des F_{ab}-Fragments [5, 6] bestimmt worden (Abbildung 2).

Abbildung 2: Das F_{ab}-Fragment von McPC603. Das α-Kohlenstoff-Gerüst der leichten Kette (links) ist grau (für V_L, oben) und dunkelgrau (für C_L, unten), das der schweren Kette (rechts) ist weiß (für V_H, oben) und hellgrau (für C_H, unten). Die Schwefelatome der Disulfidbindungen sind schraffiert. Das Hapten Phosphorylcholin ist nach Atomtypen gekennzeichnet mit O in schwarz, P in hellgrau, C in weiß und N in dunkelgrau.

Zunächst wurden die Gene, die für V_H und V_L kodieren, nach der bekannten Proteinsequenz synthetisiert [7]. Die Gene, die für die Kappa C_L-Domäne beziehungsweise die C_H1-Domäne von Maus-IgA1 kodieren, wurden von einem genomischen Klon beziehungsweise einem cDNA Klon eines anderen Maus-IgA1 Antikörpers erhalten und in einer Reihe von Schritten mit den variablen Domänen so verbunden, daß die exakte Sequenz beider Ketten des F_{ab}-Fragments entstand, das in der Kristallstruktur definiert ist [7].

Expressionsstrategien für *E. coli*

In systematischer Weise war von uns das Problem der Expression von F_V- und F_{ab}-Fragmenten dieses Antikörpers in *E. coli* untersucht worden [7, 8]: die direkte Expression im Cytoplasma, die Expression als cytoplasmatisches Fusionsprotein, die Expression als sekretiertes Fusionsprotein und der Transport ins Periplasma.

Der Transport beider Ketten ins Periplasma hat sich als präparative Methode bewährt. Die dieser Strategie zugrunde liegende Hypothese war, daß der Proteintransport ins Periplasma dem Transport ins Lumen des endoplasmatischen Reticulums (ER) funktional äquivalent ist. In der eukaryontischen Zelle werden beide Ketten des Antikörpers getrennt als Vorstufenmoleküle mit je einer N-terminalen Signalsequenz exprimiert, in das Lumen des ER transportiert, und die beiden Signalsequenzen werden dort abgespalten. Im Lumen des ER findet die Faltung, Ausbildung der Disulfidbrücken und Zusammenlagerung zum vollständigen Antikörpermolekül statt. Dort und im Golgi-Apparat findet auch eine Glycosylierung der schweren Kette statt. Inwieweit diese Glycosylierung für die effiziente Faltung bestimmter Antikörper-Klassen notwendig sein könnte, ist noch unklar. Aus diesen Überlegungen heraus wurde ein Coexpressions- und Cosekretions-System entwickelt, mit dem beide Ketten des Antikörperfragments in das Periplasma derselben *E. coli*-Zelle sekretiert werden (Abbildung 3).

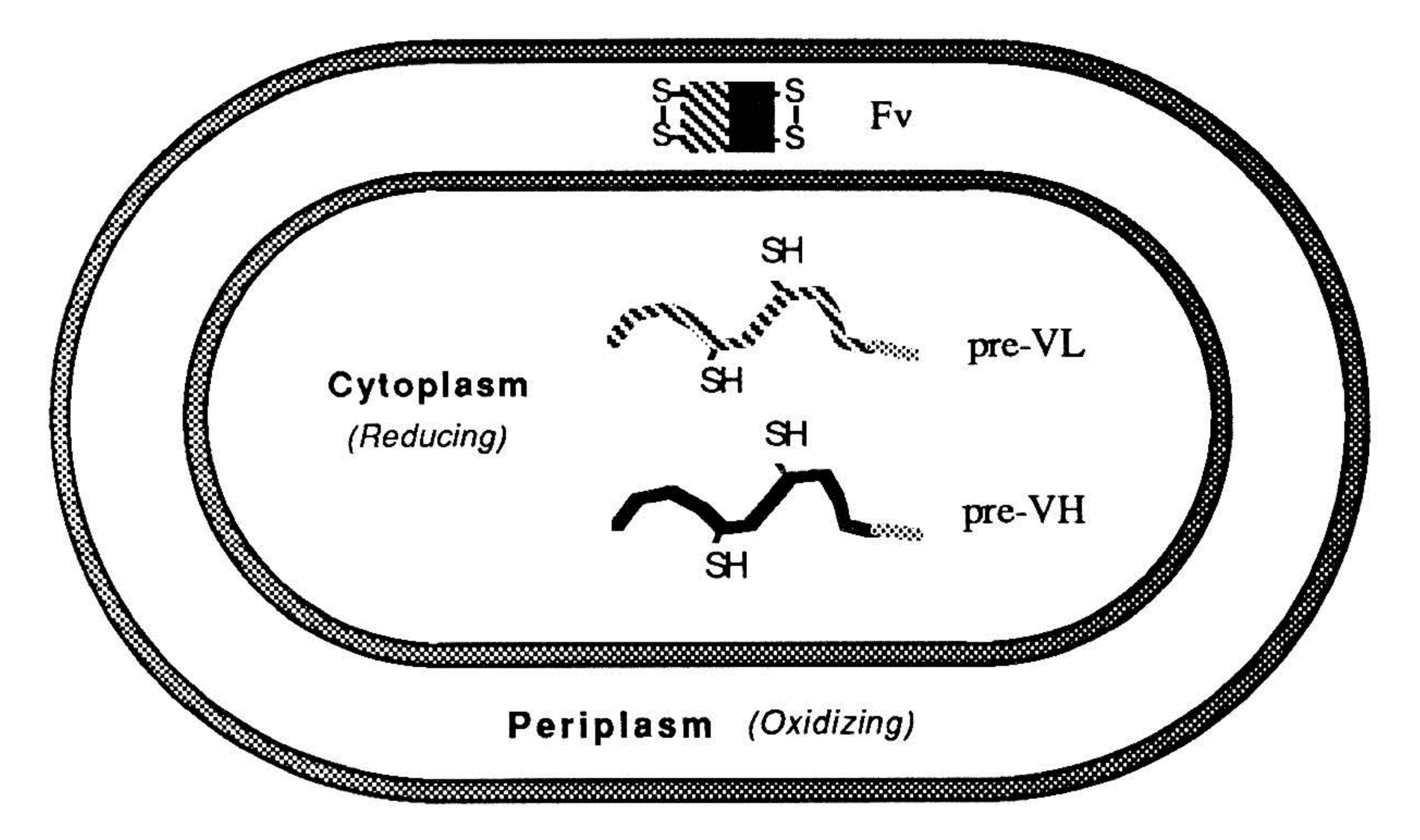


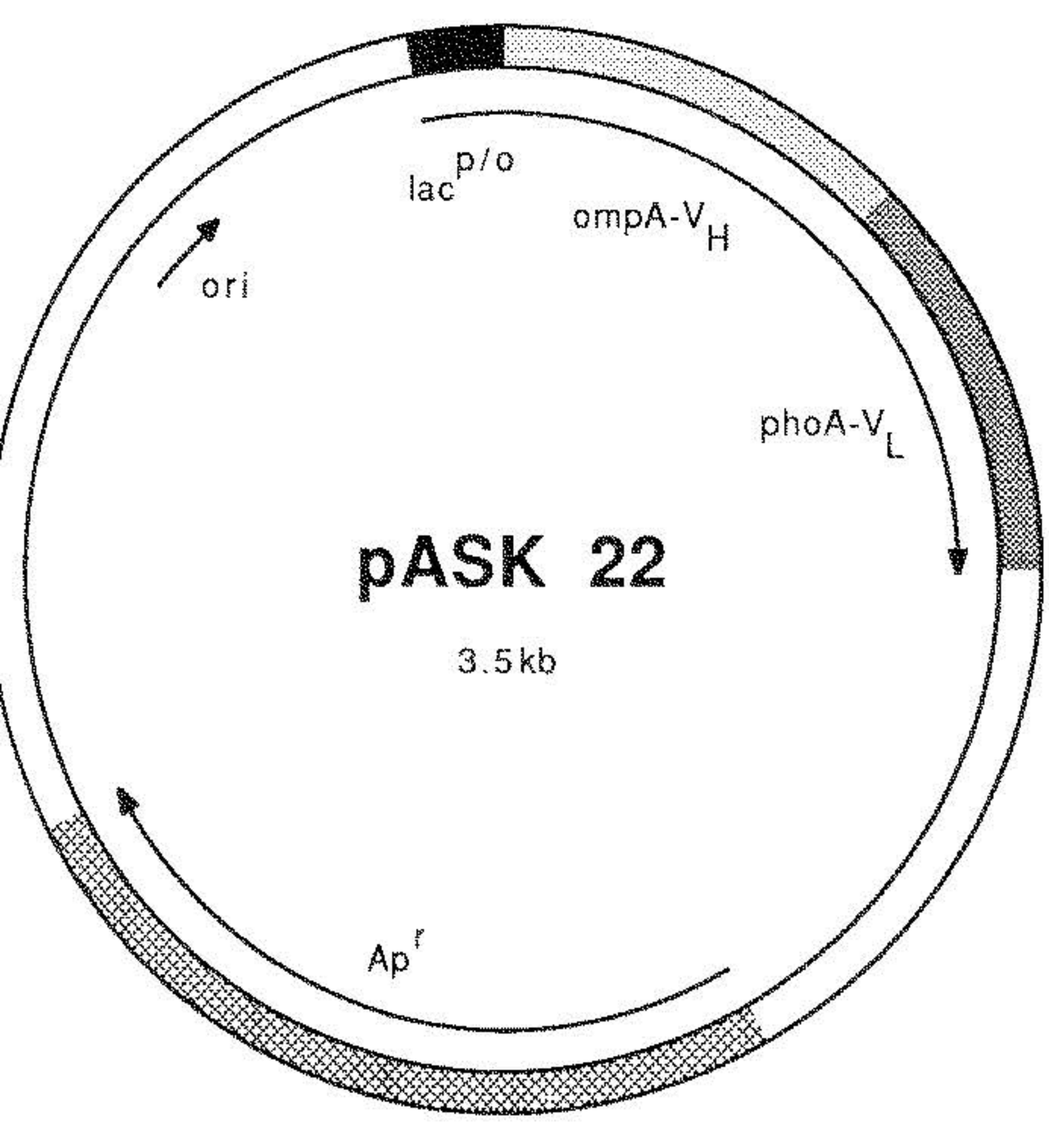
Abbildung 3: Schema des *E. coli*- Sekretionssystems. Im Cytoplasma werden die Vorstufen von V_H und V_L (jede mit einer bakteriellen Signalsequenz) in reduzierter Form synthetisiert. Nach der Translokation ins Periplasma werden die Signalsequenzen abgespalten, die Disulfidbrücken bilden sich aus, die Domänen falten sich und assoziieren.

Das vorliegende Beispiel war der erste Fall, in dem neben Transport und Faltung eines rekombinanten Proteins auch die Zusammenlagerung zweier Ketten notwendig war. Die periplasmatische Lokalisierung bringt eine Reihe von Vorteilen mit sich: Nur im oxidierenden Milieu des Periplasmas ist eine Ausbildung der Disulfidbrücken möglich. Im Periplasma sind

nicht nur weniger Proteasen, sondern auch insgesamt weniger andere Proteine vorhanden, so daß sowohl eine höhere Stabilität (durch die weitgehende Abwesenheit von proteolytischem Abbau) als auch eine einfachere Reinigung gewährleistet sind. Weiterhin erlaubt die Expression im nativ gefalteten Zustand eine Reinigung direkt mit einer Affinitätssäule, die das Antigen als Liganden trägt.

Für eine korrekte Assoziation des F_V- oder F_{ab}-Fragments mußten die folgenden Bedingungen erfüllt werden: (i) Ungefähr stöchiometrische Mengen beider Ketten müssen synthetisiert werden. Dies wurde durch die Planung eines künstlichen Operons erreicht, in dem beide Gene unter der Kontrolle desselben Promotors stehen, aber beide Gene eine eigene Ribosom-Bindungsstelle haben. (ii) Beide Polypeptide müssen ins Periplasma transportiert werden. Dazu wurden präzise Fusionen mit zwei verschiedenen Signalsequenzen aus *E. coli* (vom äußeren Membranprotein A (OmpA) und von der alkalischen Phosphatase (PhoA)) konstruiert. Durch die unterschiedlichen Signalsequenzen wird jede Möglichkeit einer homologen Rekombination innerhalb des Vektors eliminiert, und durch die Verwendung von Signalsequenzen aus *E. coli* wird die Translokation und korrekte Spaltung wahrscheinlich gemacht. (iii) Beide Signalsequenzen müssen korrekt abgespalten werden, um die identischen N-Termini wie im Antikörper der Maus zu ergeben. Die präzise Fusion der Signalsequenzen und die Verwendung bakterieller Sequenzen ist die Voraussetzung, aber keine Gewährleistung dafür. Deshalb wurde die korrekte Spaltung durch Sequenzierung der N-Termini beider Ketten experimentell verifiziert [3]. (iv) Die Faltung muß zu globulären und löslichen Domänen führen. (v) Die intramolekularen Disulfidbrücken müssen sich ausbilden. (vi) Die beiden Ketten müssen zum korrekten Heterodimer assoziieren.

Zur Gewährleistung der letzten drei Punkte muß die Expressionsrate ungefähr mit der Transportrate und der Faltungsrate übereinstimmen. Anderenfalls wird (wie zwar bei der präparativen Herstellung der Prä-β-Lactamase [9] gewünscht, nicht jedoch hier) hauptsächlich der Precursor und/oder Einschlußkörper des Proteins produziert. Deswegen ist ein allzu starker Promotor nicht unbedingt vorteilhaft. Nach diesen Überlegungen konstruierte Plasmide sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt [3, 8]. Sie wurden in der Zwischenzeit weiter verbessert (Skerra und Plückthun, in Vorbereitung).



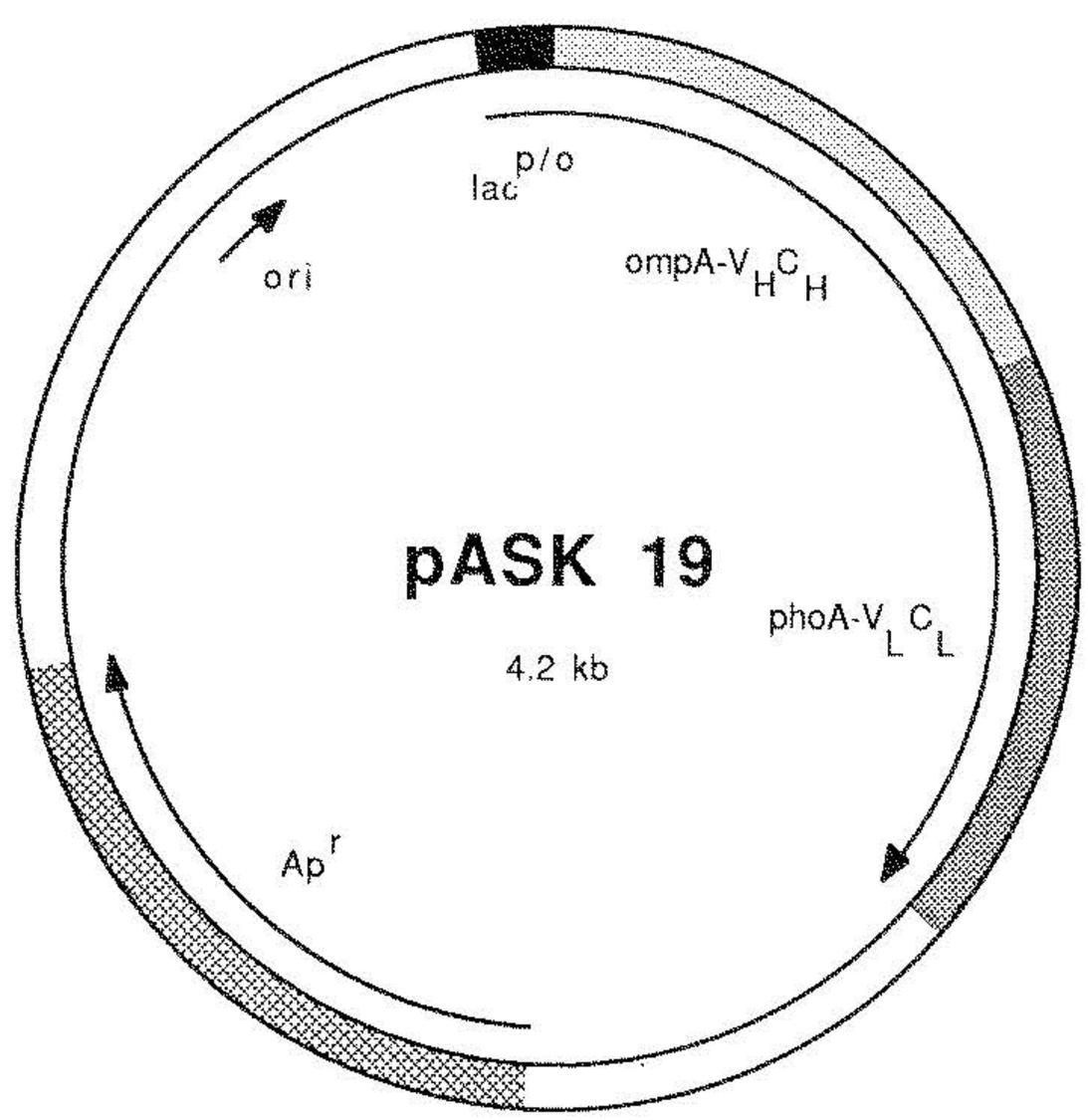


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Expressionsvektoren zur Gewinnung von nativem F_V (pASK22) beziehungsweise F_{ab}-Fragment (pASK19). Für Details siehe [3] und [8].

Eigenschaften des aus *E. coli* gewonnenen F_V-Fragments

Die Funktionalität und damit die native Struktur des rekombinanten F_V-Fragments wurde durch Gleichgewichtsdialyse mit radioaktivem Phosphorylcholin sowie durch Fluoreszenzmessungen nachgewiesen [3, 10]. Die quantitative Ausbildung der Disulfidbrücken wurde durch Aminosäureanalyse demonstriert (Glockshuber und Plückthun, in Vorbereitung). Es konnte gezeigt werden, daß das rekombinante F_V-Fragment (innerhalb der Meßgenauigkeit) fast die gleiche Assoziationskonstante zum Hapten aufweist, wie der gesamte aus der Maus erhaltene Antikörper. Genauere Untersuchungen durch Fluoreszenzmessungen und quantitatives Crosslinking hatten allerdings gezeigt, daß das F_V-Fragment bei größeren Verdünnungen in V_H und V_L dissoziiert [10]. Dieses Phänomen führt zu einer Abhängigkeit der scheinbaren Hapten-Affinität von der Protein-Konzentration. Durch präparatives Crosslinking konnte gezeigt werden, daß die Dissoziationskonstante des vernetzten F_V-Fragments exakt gleich der des ganzen Antikörpers aus der Maus, des proteolytisch erzeugten F_{ab}-Fragments sowie des rekombinanten F_{ab}-Fragments ist (Skerra, Glockshuber und Plückthun, in Vorbereitung). Damit wurde bewiesen, daß dieses vernetzte F_V-Fragment als Modell des gesamten Antikörpers für die Messung der Antigenbindung geeignet ist.

F_V-Fragmente konnten bisher nur durch eine technisch schwierige (und offenbar nicht in allen Fällen erfolgreiche) partielle Proteolyse gewonnen werden. Deshalb gab es bisher keinerlei quantitative Daten über deren Stabilität und Assoziationsverhalten. F_V-Fragmente könnten aber eine Reihe von wichtigen Vorteilen bieten: Durch ihre geringe Größe könnten sie eine geringere Antigenizität besitzen sowie schneller aus dem Blutstrom entfernt werden – ein für die Tumordiagnose und Antikörpertherapie wichtiger Gesichtspunkt. Aus dem gleichen Grund könnten sie Kristallstrukturen mit höherer Auflösung liefern und sie könnten die Bestimmung der Antikörperstruktur in Lösung mit NMR erstmals ermöglichen. Die letzteren beiden Aspekte sind Gegenstand unserer gegenwärtigen Untersuchungen.

Die Dissoziation des F_V-Fragments stellt bei hoher Verdünnung ein Problem für die praktische Verwendung dar. Deshalb wurden F_V-Fragmente konstruiert, in denen beide Ketten kovalent durch eine intermolekulare Disulfidbrücke oder durch einen Peptidlinker (als sogenannter single-chain antibody) verbunden sind (Abbildung 5) [10]. Diese Fragmente werden funktional in *E. coli* exprimiert und zeigen beinahe identische Hapten-Affinitäten. Außerdem ist die thermische Stabilität in diesen Mutanten dramatisch erhöht [10].

Auch der Faltungsweg *in vitro* wurde untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, daß die intramolekularen Disulfidbindungen für die Stabilität essentiell sind (Glockshuber und Plückthun, in Vorbereitung). Sowohl bei der Faltung als auch bei der Entfaltung scheint die Bildung beziehungsweise Spaltung der Disulfidbindung der entscheidende Schritt zu sein. Diese Befunde stimmen mit Mutagenese-Experimenten überein, in denen die Disulfidbindungen entfernt wurden: Kein funktionales Protein wurde erhalten.

Die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur der Bindungstasche erlaubt auch die gezielte Veränderung des Proteins sowie des Haptens, um energetische Beiträge zur Bindung besser zu analysieren. Dazu wurde eine Serie von Mutanten hergestellt und die Bindungsenergien für verschiedene Haptene bestimmt (Stadlmüller, Glockshuber und Plückthun, in Vorbereitung). Interessanterweise wurde gefunden, daß Teile des Proteins, die gar nicht mit dem Hapten in Kontakt stehen, einen großen Einfluß auf die Spezifität für verschiedene Haptene haben.

Die beiden Ketten des F_V-Fragments konnten präparativ getrennt werden. Kürzlich gelang auch die Lösung der Struktur der in *E. coli* exprimierten V_L-Domäne von McPC603 [11]. Die Auflösung beträgt etwa 2,0 Å, und eine Verfeinerung bis zu einem R-Faktor von etwa 14 Pro-

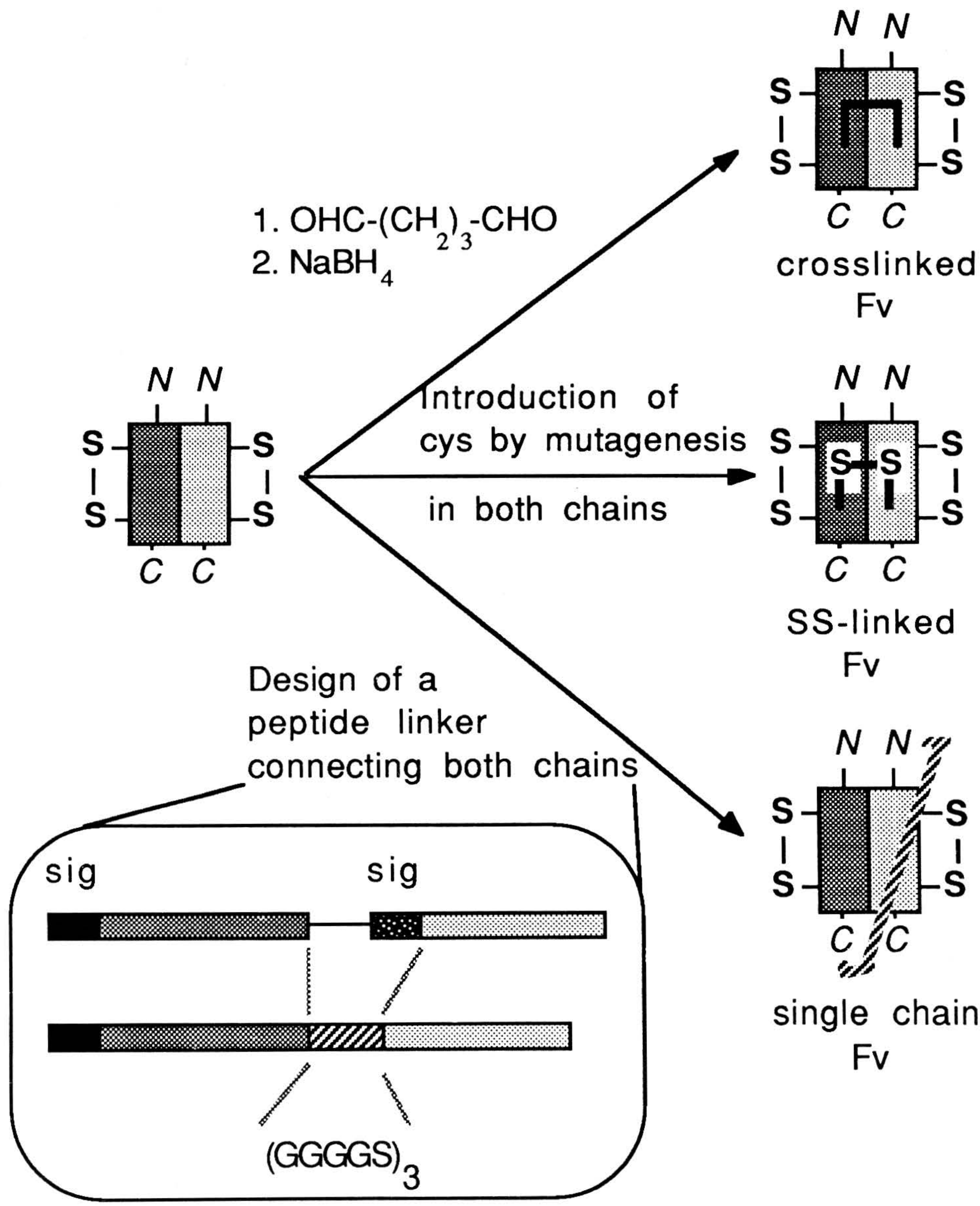


Abbildung 5: Stabilisierung des F_V-Fragments von McPC603 gegen Dissoziation durch kovalente Verbindung beider Ketten. Der obere Pfeil beschreibt die chemische Verknüpfung. Der mittlere Pfeil beschreibt die Einführung je eines zusätzlichen Cystein-Restes in jeder Domäne. Der untere Pfeil beschreibt die Verbindung beider Ketten durch einen genetisch codierten Peptid-Linker zur Herstellung eines sekretierten »single-chain«-Antikörpers. Für Details siehe [10].

zent konnte durchgeführt werden (Steipe *et al.,* in Vorbereitung). Es konnte gezeigt werden, daß eine Mutante, in der eine ganze Schleife ausgewechselt worden war (Stadlmüller und Plückthun, in Vorbereitung), isomorph kristallisiert, und die Struktur konnte extrem rasch durch Patterson-Suche gelöst werden. Diese Mutante ist wahrscheinlich exemplarisch für

weitere Varianten, und damit ist nun die realistische Möglichkeit gegeben, strukturelle Untersuchungen über Schleifen in Antikörpern und anderen Proteinen an diesem Modellsystem durchzuführen.

Eigenschaften des aus *E. coli* und des durch Proteolyse gewonnenen F_{ab}-Fragments

In gleicher Weise, wie für das F_V-Fragment beschrieben, konnte auch das F_{ab}-Fragment von McPC603 exprimiert und gereinigt werden [8]. Interessanterweise ist die Ausbeute an korrekt gefaltetem Protein, das über die Affinitätssäule gereinigt werden kann, reproduzierbar kleiner als die für das F_V-Fragment (Skerra und Plückthun, in Vorbereitung). Es handelt sich offensichtlich um eine geringere Ausbeute bei der Faltung *in vivo,* da die *Gesamtmenge* an insgesamt exprimiertem Antikörperprotein ähnlich wie beim F_V-Fragment zu sein scheint. Wir haben deshalb ein äußerst interessantes Modellsystem zur Untersuchung von Faktoren, die für die Faltung *in vivo* relevant sein könnten. Eine geringere Ausbeute an nativ gefaltetem Protein könnte beispielsweise ihre Ursache in einem langsamen Schritt der Proteinfaltung im Periplasma haben, so daß die bimolekulare Aggregation eines Intermediats gegenüber der monomolekularen Faltung begünstigt wird. Solch langsame Schritte könnten beispielsweise eine Isomerisierung der Disulfide oder eine Peptid-*cis-trans*-Isomerisierung darstellen.

Erste Vermutungen, daß die ungewöhnliche Disulfidbrückenstruktur der C_H1-Domänen der IgA-Klasse [8] an der schlechteren Ausbeute schuld sein könnte, haben sich nicht bestätigt, da nach Veränderung der Cystein-Reste H198 und H222 in Alanin-Reste die Ausbeute an gefaltetem Protein nicht erhöht wurde. Ebensowenig half der Austausch einer Schleife in C_H1 von McPC603, in der sich eine *cis*-Peptidbindung N-terminal zu Prolin befindet. Ein Austausch von acht konsekutiven Aminosäuren (Reste H136 bis H143 in McPC603) dieser Schleife gegen die entsprechende Sequenz des menschlichen IgA, das an dieser Stelle kein *cis*-Prolin enthält, brachte ebenfalls keine Veränderung der Menge an nativ gefaltetem F_{ab}-Fragment (Skerra und Plückthun, in Vorbereitung). Diese Frage wird nun weiterhin durch die Co-Expression von Faltungsmodulatoren untersucht.

Ein genauer Vergleich der elektrophoretischen Mobilität des rekombinanten F_{ab}-Fragments mit der des aus dem Maus-Antikörper proteolytisch gewonnenen F_{ab}-Fragments zeigte eindeutig eine Glycosylierung in der C_H1-Domäne (Skerra, Glockshuber und Plückthun, in Vorbereitung). In Analogie zu einem ähnlichen Antikörper kann man die Glycosylierung in Position H160 vermuten. Außerdem wurde festgestellt, daß die Länge der durch Proteolyse gewonnenen schweren Kette größer ist als der in der Struktur sichtbare (geordnete) Bereich. Einen Einfluß auf die Antigenbindung haben diese Unterschiede zwischen rekombinantem und proteolytisch erzeugtem F_{ab}-Fragment aber nicht (Skerra, Glockshuber und Plückthun, in Vorbereitung).

Katalyse durch einen Antikörper

Der Antikörper McPC603 wurde nicht zuletzt deshalb ausgewählt, weil er als Modellsystem zur Untersuchung von enzymatischer Katalyse dienen kann [7]. Eine wesentliche Komponente der Enzymkatalyse ist ja, daß der Übergangszustand der Reaktion durch das Enzym besser stabilisiert wird als Produkte und Edukte. Bereits 1969 hat Jencks vorgeschlagen, Antikörper gegen Übergangszustands-Analoga (oder Intermediat-Analoga) herzustellen und zu untersuchen, ob damit chemische Katalyse möglich ist. Seit dieser Zeit wurde das mehrfach versucht und hat in den letzten Jahren zu ersten Erfolgen geführt (zusammengefaßt zum Beispiel in [12]).

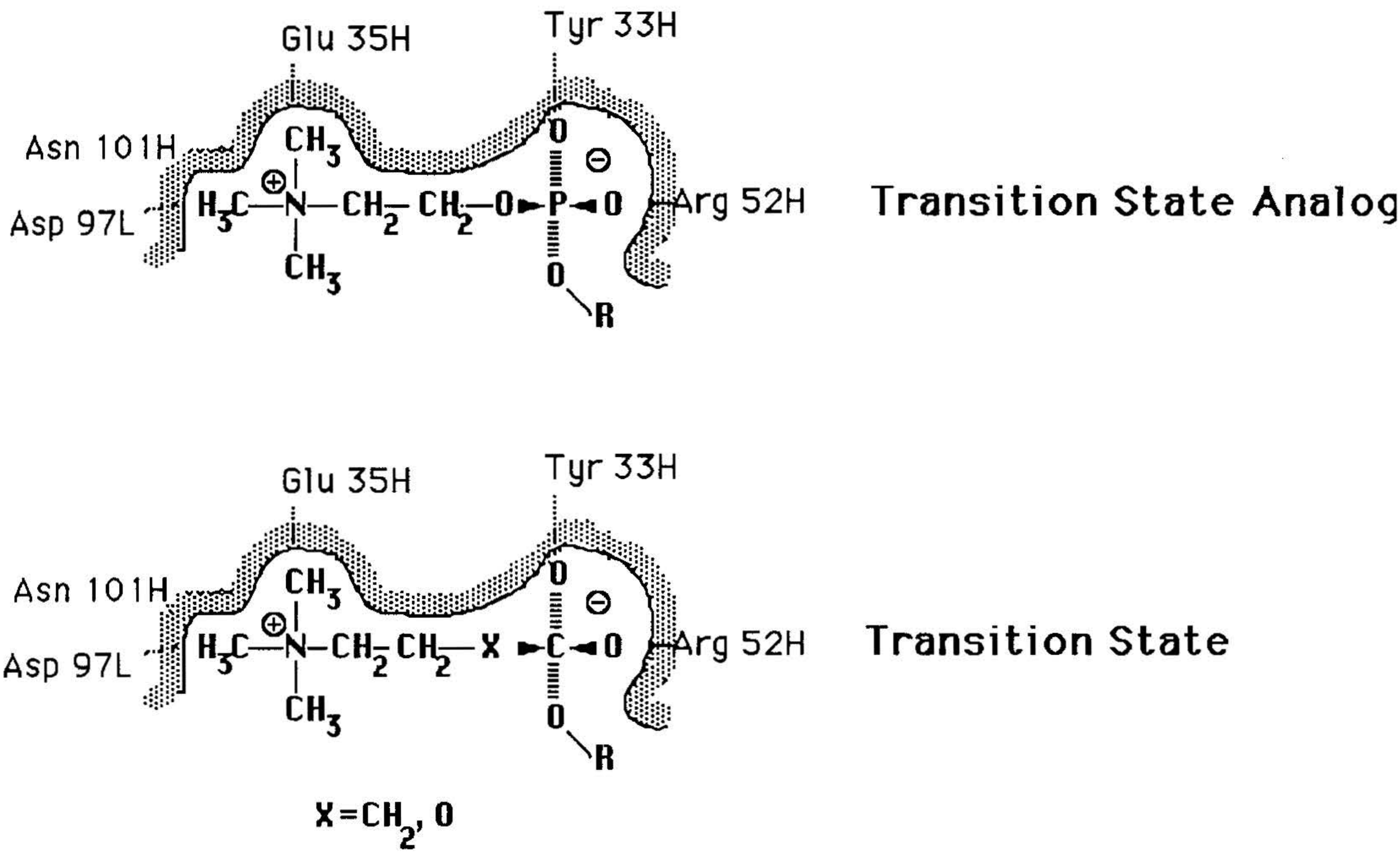


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Katalyse einer Esterhydrolyse durch den Antikörper McPC603 mit Hilfe der Stabilisierung des Übergangszustandes.

Unser Vorgehen war allerdings, von einem Antikörper mit bereits *bekannter* Struktur auszugehen und an diesem durch Veränderung des Substrats und des Proteins in voller Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des Komplexes die Erfordernisse der Katalyse zu untersuchen [7]. Ein solches System ist McPC603. Aufgrund seiner Phosphorylcholin bindenden Eigenschaften sollte dieses Protein das tetraedrische Intermediat (und damit nach Hammond auch die Übergangszustände, die dorthin führen) eines entsprechenden Esters (zum Beispiel Cholin-*p*-Nitrophenyl-Carbonat) stabilisieren und dessen Hydrolyse beschleunigen (Abbildung 6). Tatsächlich konnten mit dem Carbonat und dem aus *E. coli* erhaltenen F_V-Fragment ein K_M-Wert von etwa 1,8 mM und ein v_{max}-Wert von etwa 0,05 min^{-1} gemessen werden, sowie bestätigt werden, daß die Hydrolyse durch Phosphorylcholin inhibierbar ist (Stadlmüller und Plückthun, in Vorbereitung). Diese zwar recht räge, aber meßbare Katalyse zeigt die grundsätzliche Richtigkeit der Idee und ermöglicht damit, Mutanten mit verbesserten Eigenschaften zu *konstruieren*. Damit steht nun ein zwar noch sehr langsames, aber völlig künstliches »Enzym« zur Verfügung, das nur aus einem Protein ohne Cofaktor besteht, dessen Struktur bekannt und veränderbar ist, und an dem sich die Erfordernisse der Katalyse in besonders günstiger Weise erforschen lassen sollten.
Da sich Antikörper prinzipiell gegen jede Substanz erzeugen lassen, können möglicherweise mit einigen aus diesen Experimenten gewonnenen Erkenntnissen (theoretischer und methodischer Art) allgemein gangbare Wege zu neuen Enzymen entwickelt werden.

Danksagung
Mein Dank gilt an dieser Stelle zunächst meinen engagierten Mitarbeitern der ersten Generation (in alphabetischer Reihenfolge) Marion Cors, Christiane Ganter, Rudi Glockshuber, Axel Laminet, Peter Lindner, Mark Malia, Ilse Pfitzinger, Arne Skerra, Jörg Stadlmüller und

Boris Steipe. Weiterhin danke ich dem Bundesministerium für Forschung und Technologie für die Förderung der Projekte (seit 1985), der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung (seit 1989) sowie dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung.

Literaturangaben:

[1] P. M. Alzari, M. B. Lascombe, R. J. Poljak, Ann. Rev. Immunol. *6,* 555 (1988).
[2] S. C. Morrison, V. T. Oi, Adv. Immunol. *44*, 65 (1989).
[3] A. Skerra, A. Plückthun, Science *240*, 1038 (1988).
[4] A. Plückthun, A. Skerra, R. Glockshuber, J. Stadlmüller, 39th Mosbach Colloquium, Springer Verlag (1988), pp. 123.
[5] Y. Satow, G. H. Cohen, E. A. Padlan, D. R. Davies, J. Mol. Biol. *190*, 593 (1986).
[6] D. M. Segal, E. A. Padlan, G. H. Cohen, S. Rudikoff, M. Potter, D. R. Davies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA *71*, 4298 (1974).
[7] A. Plückthun, R. Glockshuber, I. Pfitzinger, A. Skerra, J. Stadlmüller, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. *52*, 105 (1987).
[8] A. Plückthun, A. Skerra, Meth. Enzymol. *178*, 497 (1989).
[9] A. A. Laminet, A. Plückthun, EMBO J. *8*, 1469 (1989).
[10] R. Glockshuber, M. Malia, I. Pfitzinger, A. Plückthun, Biochemistry *29*, 1362 (1990).
[11] R. Glockshuber, B. Steipe, R. Huber, A. Plückthun, J. Mol. Biol. *213,* 613 (1990).
[12] P. G. Schultz, Angew. Chem. *101*, 1336 (1989).