

Technische Universität Braunschweig

Fakultät für Lebenswissenschaften



Identifizierung funktioneller Intrabodies für die  
Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen  
in SCA2

Bachelorarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades

Bachelor of Science

Angefertigt am Max Planck Institut für molekulare Genetik



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

von

Susanne Weber

Mai 2009

Hauptreferent: Prof. Dr. Stefan Dübel

Korreferent: Prof. Dr. Hans Lehrach

Betreuer: Dr. Zoltán Konthur, Dr. Sylvia Krobitsch

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	V
1. Einleitung .....	1
1.1 Spinozerebellare Ataxie Typ 2 .....	1
1.2 Ataxin-2 .....	2
1.3 Antikörper-Phagen-Display .....	3
1.4 Antikörper, Antikörperfragmente und “Intrabodies” .....	5
1.5 “Yeast two-Hybrid” und “Intrabody” Screen .....	7
1.6 Tomlinson Bibliothek I .....	8
1.7 Zielsetzung .....	9
2. Material und Methoden .....	11
2.1 Material .....	11
2.1.1 Laborgeräte und Zubehör .....	11
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	12
2.1.3 Lösungen, Puffer und Chemikalien .....	13
2.1.4 Medien und Zusätze .....	16
2.1.5 Mikroorganismen und Säugetierzelllinien .....	18
2.1.6 Plasmide und Phagmide .....	19
2.1.7 Primer .....	19
2.1.8 Enzyme .....	20
2.1.9 Antikörper und Nachweisreagentien .....	20
2.1.10 DNA- und Proteinstandards .....	20
2.1.11 Kitsysteme .....	21
2.1.12 Software und Webtools .....	21
2.1.13 Sonstiges .....	21
2.2 Mikrobiologische Methoden .....	22
2.2.1 Herstellung von Medien für die <i>E. coli</i> Kultivierung .....	22
2.2.2 Kultivierung von Hefezellen ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....	22
2.2.3 Bestimmung der Zelldichte von Bakterien- und Hefekulturen .....	22
2.2.4 Lagerung und Reaktivierung von Bakterien- und Hefekulturen .....	22
2.2.5 Infektion von <i>E. coli</i> mit scFv-Antikörperfragment tragenden Phagen .....	22
2.2.6 Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation .....	23
2.2.7 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> und “Intrabody” Screen .....	23

2.2.8	Proteinexpression.....	25
2.2.8.1	scFv-Expression in Mikrotiterplatten.....	25
2.2.8.2	Antigenexpression.....	25
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	25
2.3.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	25
2.3.2	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	26
2.3.3	Plasmidpräparation.....	26
2.3.4	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	26
2.3.5	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	26
2.3.6	Ligation von DNA-Fragmenten.....	27
2.3.7	Ethanolpräzipitation.....	28
2.3.8	Sequenzierung.....	28
2.3.9	Polymerase Ketten Reaktion.....	28
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	29
2.4.1	Aufreinigung von Proteinen (Antigenen) mit His6-“Tag”.....	29
2.4.2	Bestimmung der Antigenkonzentrationen.....	30
2.4.3	scFv-Präparation in Mikrotiterplatten.....	30
2.4.4	“Enzyme-linked Immunosorbent Assay” mit scFv-Fragmenten.....	30
2.4.5	SDS-PAGE.....	31
2.4.6	Coomassie-Färbung und Entfärbung.....	31
2.4.7	Western Immunoblot.....	31
2.4.8	Färbung mit Streptavidin-HRP.....	32
2.4.9	Bestimmung der Proteinestabilität.....	32
2.5	Zellbiologische Methoden.....	33
2.5.1	Kultivierung von Säugetierzellen.....	33
2.5.2	Transfektion von Säugetierzellen.....	33
2.5.3	Induktion von oxidativem Stress in Säugetierzellen.....	33
2.5.4	Immunfluoreszenzfärbung und -mikroskopie.....	33
3.	Ergebnisse.....	35
3.1	<i>in vivo</i> Identifikation von inhibitorischen scFv-Antikörperfragmenten mittels “Intrabody” Screen.....	35
3.1.1	Subklonierung einzelner Selektionsrunden in einen Hefeexpressionsvektor.....	35
3.1.2	“Intrabody” Screen.....	37
3.2	<i>in vitro</i> Identifizierung monoklonaler Binder (scFv-Fragmente).....	42

3.2.1 Antigengewinnung für ELISA und Western Immunoblot.....	42
3.2.2 Gewinnung von monoklonalen scFv-Fragmenten für ELISA und Western Immunoblot.....	44
3.2.3 ELISA zur Identifizierung monoklonaler Binder .....	44
3.2.4 Western Immunoblot ausgewählter monoklonaler Binder .....	47
3.2.5 DNA-Sequenzierung ausgewählter monoklonaler Binder.....	48
3.3 <i>in vivo</i> Expressionsstudien ausgewählter scFv-Fragmente in Säugetierzellen.....	50
3.3.1 Subklonierung von Antikörperfragmenten in einen Expressionsvektor für Säugetierzellen .....	50
3.3.2 Expression von “Intrabodies” in Säugerzellen .....	53
4. Diskussion .....	58
4.1 <i>in vivo</i> Selektion von scFv-Fragmenten .....	58
4.2 <i>in vivo</i> Identifikation inhibitorischer scFv-Antikörperfragmente.....	59
4.3 <i>in vitro</i> Identifizierung von monoklonalen antigenbindenden scFv-Fragmenten .....	62
4.4 <i>in vivo</i> Expressionsstudien ausgewählter scFv-Fragmente in Säugerzellen.....	64
4.5 Fazit .....	65
5. Zusammenfassung.....	66
6. Literaturverzeichnis.....	67
Eidesstattliche Erklärung	
Danksagung	

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ABTS	2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diammonium Salz
AD	Aktivierungsdomäne (eines Transkriptionsfaktors)
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
ATXN2	Ataxin-2
As	Aminosäure
A2BP1	“Ataxin-2 binding protein 1”
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare (“base pairs”)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
CDR	Komplementaritätsbestimmende Regionen (“complementarity determining regions”)
C <sub>L</sub>	Konstante Domäne der leichten Kette
C <sub>H</sub>	Konstante Domäne der schweren Kette
CN/DAB	4-Chloro-1-naphtol/3,3'-Diamminobenzidin
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DBD	DNA-Bindedomäne (eines Transkriptionsfaktors)
DMEM	“Dulbecco`s Modified Eagle Medium”
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (“Ethylenediaminetetraacetic acid”)
eGFP	“enhanced Green Fluorescent Protein”
ELISA	“Emzyme-linked Immunosorbent Assay”
Fab	“Fragment antigen binding”
Fc	“Fragment crystallizable”
Fv	“Fragment variable”
g	Gramm

Glu	Glucose
h	Stunde
HMFM	“Hogeness Modified Freezing Medium”
HRP	Meerrettichperoxidase (“Horseradish Peroxidase”)
IACT	“Intracellular Antibody Capture Technology”
Ig	Immunglobulin
IMAC	“Immobilized Metal Affinity Chromatography”
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
Lsm	“Like Sm domain”
LsmAD	“Lsm-associated domain”
M	Molar
mA	Milliampère
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure (“nickel-nitrilotriacetic acid”)
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x Nanometern
PABC	C-terminale Domäne des Poly-(A)-Bindeproteins
PABP	Poly-(A)-Bindeprotein
PAM2	“PABP-interacting motif 2”
PBS	“Phosphate buffered saline”
PBS-T	“Phosphate buffered saline”+ Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (“Polymerase chain reaction”)
PEG	Polyethylenglycol

PE-Puffer	Periplasma-Extraktionspuffer
PTM	“Phosphate buffered saline” + Tween 20 + Milchpulver
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	“Rounds per minute”
RT	Raumtemperatur
SBM1	“SH3 domain binding motif 1”
SBM2	“SH3 domain binding motif 2”
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
scFv	“single chain fragment variable”
SD-Medium	“Synthetic defined”-Medium
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
SG	“Stress Granule”
SH3	“Src-homology-3 domain”
SH3GL2	“SH3-containing GRB2-like protein 2”
SH3GL3	“SH3-containing GRB2-like protein 3”
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween® 20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
U	“Unit”
ü. N.	Über Nacht
V <sub>K</sub>	Variable Domäne der leichten Kette Typ Kappa
V <sub>H</sub>	Variable Domäne der schweren Kette
V <sub>L</sub>	Variable Domäne der leichten Kette
w/v	“weight per volume”
YPD-Medium	“Yeast extract-peptone-dextrose”
Y2H	“Yeast two-Hybrid”
2xYT-Medium	2x Hefeextrakt-Trypton-Medium (“2x yeast extract tryptone-medium”)

# 1. Einleitung

## 1.1 Spinozerebellare Ataxie Typ 2

Die Spinozerebellare Ataxie Typ 2 (SCA2) ist eine neurodegenerative Erkrankung, welche autosomal dominant vererbt wird und zur Familie der Polyglutaminerkrankungen gehört. Zu den Polyglutaminerkrankungen zählen ferner die Huntington-Krankheit (HD), die Spinobulbäre Muskelatrophie (SBMA), die Dentatorubrale- pallidolysiane Atrophie (DRPLA) und die Spinozerebellaren Ataxien SCA1, 3, 6, 7 und 17 (Reddy & Housman 1997, Ralser *et al.* 2005b). SCA2 gehört neben SCA1, SCA3 und SCA6 zu den am häufigsten auftretenden Typen der Spinozerebellaren Ataxien (Lastres-Becker *et al.* 2008, Klockgether 2007).

Allen Polyglutaminerkrankungen gemeinsam ist eine Expansion von CAG-Wiederholungen in den entsprechenden krankheitsauslösenden Genen; Das Triplet CAG codiert für die Aminosäure Glutamin, die namensgebend für diese Erkrankungen ist. Bis auf den expandierten Polyglutaminbereich zeigen die einzelnen Genprodukte keinerlei Übereinstimmungen oder evolutionäre Beziehungen (Michalik & Van Broeckhoven 2003).

Das SCA2 auslösende Gen liegt auf dem Chromosom 12q24.1. Es kodiert für das Protein Ataxin-2 (ATXN2) und besteht aus 25 Exons (ca. 130 kb genomische DNA) (Pulst *et al.* 1996, Sahba *et al.* 1998). Die Anzahl der CAG-Wiederholungen im SCA2-Gen liegt normalerweise zwischen 14-32, welche von zwei CAA Codons unterbrochen sind, wobei 22 Wiederholungen in den untersuchten Populationen am häufigsten auftreten. Ein so genannter Graubereich besteht bei 32-34 CAG-Wiederholungen, in dem es zur Auslösung von SCA2 kommen kann; 34-77 CAG-Wiederholungen sind krankheitsauslösend (Schöls *et al.* 2000). Es sind aber auch Expansionen mit mehr als 200 Wiederholungen möglich (Lastres-Becker *et al.* 2008). Die expandierten CAG-Wiederholungen werden meist nicht mehr von CAA-Codons unterbrochen (Pulst *et al.* 1996). Je stärker die CAG-Wiederholungen expandiert sind, desto früher bricht die Krankheit aus und desto stärker sind die Symptome (Netravathi *et al.* 2009). Im Durchschnitt tritt die SCA2 ab einem Alter von 32 Jahren auf, kann aber auch schon im Kindesalter oder erst ab 65 Jahren auftreten

Die Krankheit selbst ist u. a. gekennzeichnet durch unkoordinierte Bewegungen (Ataxie), langsame Blicksakkaden, Dysarthrie (Sprachstörungen), Taumeln, Demenz und selten auch Parkinsonismus. Ursache für diese Symptome sind neurodegenerative Vorgänge. Es kommt zum starken Verlust von Purkinje-Zellen, Zellen des zerebellaren Cortex, Neuronen der Substantia nigra und der Olivae inferiores, sowie weiterer Hirnareale (Schöls *et al.* 2000).

## 1.2 Ataxin-2

Ataxin-2 (ATXN2) ist ein aus 1312 Aminosäuren bestehendes Protein mit einer molekularen Masse von 140 kDa. Es wird sowohl in neuronalem als auch in nicht neuronalem Gewebe, hier vor allem in Herz, Leber, Skelettmuskeln, Pankreas und Plazenta, exprimiert (Albrecht *et al.* 2004, Uniprot 2009a). Im Gehirn wird Ataxin-2 hauptsächlich im Hippocampus, in den Basalganglien, im Mittelhirn, in der Substantia nigra und im Cerebellum (dort hauptsächlich in den Purkinje-Zellen) exprimiert. Generell ist Ataxin-2 zytoplasmatisch lokalisiert (Lastres-Becker *et al.* 2008). Im Gegensatz zu den meisten Proteinen, die Polyglutaminerkrankungen auslösen, bildet Ataxin-2 nur sehr selten Aggregate (Huynh *et al.* 2000). Auffällig ist aber eine erhöhte Ataxin-2-Konzentration in den Gehirnen von SCA2 Patienten verglichen mit den Gehirnen gesunder Individuen (Koyano *et al.* 1999). Seine biologische Funktion, sowie die molekularen Pathomechanismen konnten bisher noch nicht aufgeklärt werden.

Das Protein selbst ist bis auf eine saure Region im Bereich der Aminosäuren (As) 254-475 stark basisch. Die saure Region besteht aus zwei globulären Domänen: der Lsm-Domäne (“Like Sm domain”; As 254-345) und der LsmAD-Domäne (“Lsm-associated domain”; As 353-475). Die LsmAD-Domäne enthält ein Clathrin-vermitteltes trans-Golgi-Signal (As 414-416), sowie ein Endoplasmatisches Retikulum-Ausgangs-Signal (As 426-428). Im C-terminalen Bereich des Proteins befindet sich ein PAM2-Motiv (As 908-925), das die Assoziation mit dem Poly(A)-Bindepotein PABP, speziell der C-terminal gelegenen PABC-Domäne ermöglicht. (Albrecht *et al.* 2004, Ralser *et al.* 2004) Der Polyglutamin-Bereich ist N-terminal im Protein gelegen (As 166-187) (van de Loo *et al.* 2009, Uniprot 2009a; siehe Abbildung 1).

Die einzelnen Domänen und Motive von Ataxin-2 weisen darauf hin, dass das Protein Funktionen im RNA-Metabolismus besitzt. Ein weiterer Hinweis dafür ist die Interaktion von Ataxin-2 mit A2BP1 (“Ataxin-2 binding protein 1”), welches ein RNA-Erkennungsmotiv enthält (Shibata *et al.* 2000). Außerdem bindet Ataxin-2 über die Lsm-Domäne, LsmAD-Domäne und das PAM2-Motiv an Polyribosomen (Satterfield & Pallanck 2006). Ataxin-2 ist auch eine Komponente so genannter “Stress Granules” (SG). SGs sind zytoplasmatische Bereiche, in denen unter Stressbedingungen untranslatierte mRNA eingelagert wird (Kedersha & Anderson 2002, Ralser *et al.* 2004).

Neben den genannten Proteinen interagiert Ataxin-2 noch mit einer Reihe weiterer Proteine. Zu diesen gehören Endophilin-A1 (SH3GL2; “SH3-containing GRB2-like protein 2”) und Endophilin-A3 (SH3GL3; “SH3-containing GRB2-like protein 3”); Ralser *et al.* 2005b,

UniProt 2009b; c). Endophilin-Proteine spielen wichtige Rollen bei der Bildung von endozytotischen Vesikeln und Aktin-Filamenten. Sie sind aus einer N-terminalen BAR-Domäne und einer C-terminalen SH3-Domäne (“Src-homology-3 domain”) aufgebaut. Die SH3-Domäne bindet prolinreiche Regionen in Proteinen, die auch in Ataxin-2 zu finden sind. Diese Motive werden im Ataxin-2-Protein SBM1 (As 117-126) und SBM2 (As 587-596; “SH3 domain binding motifs”) genannt (Abbildung 1; Cestra *et al.* 1999, Ralser *et al.* 2005b). Endophilin-A1 wird hauptsächlich im Gehirn und Endophilin-A3 hauptsächlich im Gehirn und in den Hoden exprimiert (Giachino *et al.* 1997). Neben den Interaktionen mit anderen Proteinen kann Ataxin-2 auch Homodimere bilden (UniProt 2009a).



**Abbildung 1: Darstellung des strukturellen Aufbaus von Ataxin-2.** Ataxin-2 besteht aus 1312 Aminosäuren. In grün sind die beiden SH3-Bindemotive SBM1 und SBM2 dargestellt. Die Polyglutaminwiederholungen (PolyQ) sind in rot hervorgehoben. Die Lsm- und die LsmAD-Domäne sind in blau dargestellt, ebenso wie das C-terminal gelegene PAPB-Bindemotiv PAM2. (modifiziert nach Ralser *et al.* 2005b)

Wie bereits erwähnt sind die biologische Funktion von Ataxin-2 und die molekularen Mechanismen, die zur SCA2 führen noch nicht geklärt. Es bedarf weiterer Analysen des Proteins selbst und der Interaktionen mit anderen Proteinen. Zur Untersuchung dieser Interaktionen können Antikörper bzw. Antikörperfragmente (so genannte “Intrabodies”; siehe Abschnitt 1.4) eingesetzt werden. Diese binden spezifisch an die jeweiligen Proteine und können auch je nach Lage des Epitops Interaktionen zwischen Proteinen unterbinden. Durch die Unterbindung der Interaktionen zwischen Proteinen können Veränderungen im zellulären Phänotyp auftreten, die es ermöglichen, die Funktion eines Proteins in zellulären Stoffwechselwegen und Signalkaskaden zu bestimmen. Auf diesem Weg können auch molekulare Erkrankungsmechanismen geklärt werden. Inhibitorische Antikörper oder Antikörperfragmente stellen ferner potentielle Therapeutika gegen Erkrankungen, wie SCA2 dar.

### 1.3 Antikörper-Phagen-Display

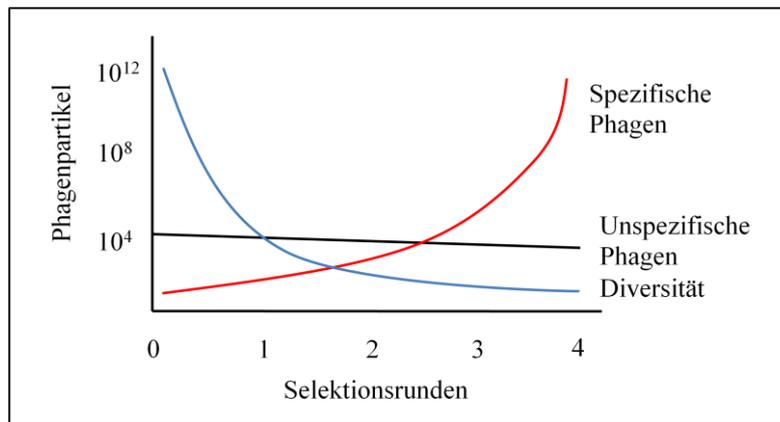
Das Antikörper-Phagen-Display ist eine Methode, mit der spezifisch bindende Antikörper *in vitro* gewonnen und identifiziert werden können. Für den Phagen-Display wird meist der filamentöse Phage M13 verwendet. Das grundlegende Prinzip des Phagen-Displays ist dabei die Verbindung des Genotyps mit dem Phänotyp. Den Ausgangspunkt stellt ein großes

Repertoire an Antikörpergenen dar. Diese Gene werden entweder direkt im Genom des Phagen oder auf einem Phagmid mit dem Gen für das M13-Phagenhüllprotein pIII fusioniert (McCafferty *et al.* 1990, Hoogenboom *et al.* 1991). Der Vorteil des Phagmids besteht darin, dass die Replikation und Antikörperproduktion unabhängig vom Phagengenom geschieht. Die Phagen exprimieren das Antikörper-pIII Fusionsprotein und präsentieren so auf ihrer Oberfläche die Antikörper (Hust *et al.* 2005). Die Antikörper sind dabei mit dem N-Terminus des Hüllproteins pIII fusioniert (Hoogenboom *et al.* 1991). Für die Herstellung der Antikörper-tragenden Phagen werden *E. coli*-Zellen verwendet. Die Antikörper können im Periplasma der Zellen korrekt gefaltet werden und auch die Phagen assemblieren im Periplasma (Hust *et al.* 2007). Durch die Grenzen des Faltungsapparats von *E. coli* können für das Phagen-Display keine vollständigen Antikörper genutzt werden. Deshalb werden kleinere Antikörperfragmente, wie das Fab- und das scFv-Fragment verwendet (nähere Erläuterungen zu den Fragmenten: siehe Abschnitt 1.4; Hust *et al.* 2005).

Die Gesamtheit der Antikörper-präsentierenden Phagen stellt eine Antikörper-Phagen-Display-Bibliothek dar. Die Diversität solcher Bibliotheken liegt meist zwischen  $10^6$  und  $10^{10}$  (Konthur & Walter 2002). Es werden 4 verschiedene Typen von Bibliotheken unterschieden: Immun-, naive, semisynthetische und synthetische Bibliotheken (Hust *et al.* 2005). Immun-Bibliotheken werden aus dem Antikörperrepertoire von immunisierten Tieren hergestellt. Naive und semisynthetische Bibliotheken leiten sich von Keimbahn-Immunglobulin-Sequenzen ab oder beruhen auf einem Antikörpermolekül, dessen CDRs ("complementarity determining regions", komplementaritätsbestimmende Regionen) mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) randomisiert wurden (Konthur & Crameri 2003). Bei synthetischen Bibliotheken sind die V<sub>H</sub>- und J-Segmente kombinatorisch zusammengesetzt und leiten sich nicht von natürlich rekombinierten Antikörpersequenzen ab.

Die *in vitro* Anreicherung bzw. Selektion spezifisch bindender Antikörperfragmente geschieht mittels "Panning". Dabei wird zunächst das Antigen auf einer Festphase immobilisiert und dann mit den Antikörper-tragenden Phagen inkubiert. Im Anschluss erfolgt ein Waschschriff, bei dem alle nicht gebundenen unspezifischen Phagen gewaschen werden. Die gebundenen Phagen werden danach eluiert und durch Infektion von *E. coli* reamplifiziert. Die Bakterien werden dann mit Helferphagen (z.B. M13K07) infiziert, um eine neue Antikörper-tragende Phagenpopulation zu erhalten. Diese Phagen können für eine neue "Panning"-Runde genutzt werden (Hust *et al.* 2007). Normalerweise werden 2-4 "Panning"-Runden durchgeführt, um spezifisch bindende Antikörperfragmente anzureichern. Das Prinzip der Anreicherung der Phagen mit spezifischen Antikörperfragmenten ist in Abbildung 2

dargestellt. Die Anreicherung kann im Anschluss in einem polyklonalen ELISA (“Enzyme-linked Immunosorbent Assay”) überprüft werden. Einzelne Antikörper können im monoklonalen ELISA identifiziert und die Diversität der monoklonalen Antikörper durch DNA-Sequenzierung oder massenspektrometrische Methoden bestimmt werden.



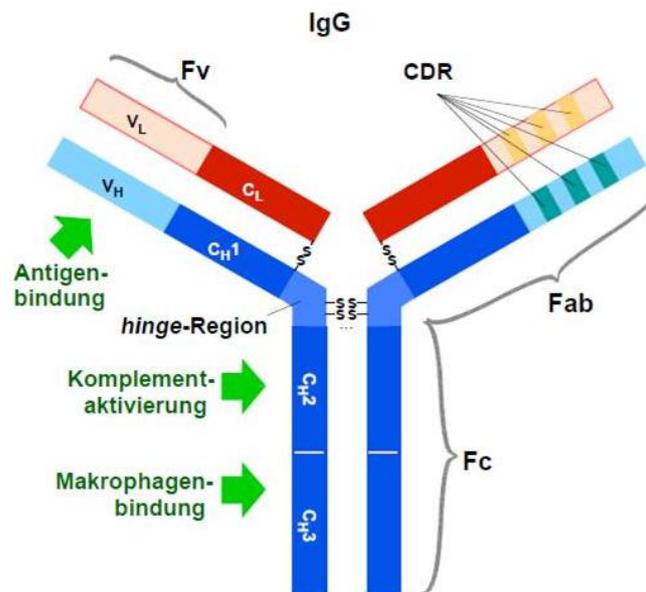
**Abbildung 2: Anreicherung der Phagen mit spezifischen Antikörperfragmenten.** Die Anzahl der Phagen mit spezifischen Antikörperfragmenten nimmt in jeder “Panning”-Runde (Selektionsrunde) zu (rote Linie). Die Diversität der Bibliothek nimmt mit jeder Selektionsrunde ab (blaue Linie). Ein Teil der unspezifisch gebundene Phagen bleibt in jeder Selektionsrunde vorhanden (schwarze Linie). (modifiziert nach Konthur & Cramer 2003)

#### 1.4 Antikörper, Antikörperfragmente und “Intrabodies”

Antikörper (sekretierte Immunglobuline) sind Bestandteil des adaptiven Immunsystems. Sie werden von differenzierten B-Zellen, den Plasmazellen, nach der Erkennung von bakteriellen, viralen o.ä. Antigenen produziert. Die Hauptaufgabe von Antikörpern ist die spezifische Bindung an Pathogene und die Rekrutierung anderer Zellen und Moleküle zur Zerstörung der gebundenen Pathogene.

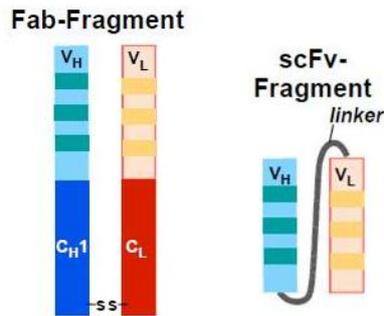
B-Zellen produzieren 5 verschiedene Klassen von Immunglobulinen (Ig): IgM, IgD, IgG, IgA, IgE. Die einzelnen Klassen der Immunglobuline werden nach der Struktur der schweren Kette und damit nach ihrer Effektorfunktion eingeteilt. IgG ist das am häufigsten auftretende Immunglobulin. Es besteht aus zwei identischen schweren und leichten Ketten. Die schweren und die leichten Ketten, sowie die schweren Ketten untereinander sind über Disulfid-Brücken miteinander verbunden. Bei den leichten Ketten werden zwei Typen unterschieden: Kappa ( $\kappa$ ) und Lambda ( $\lambda$ ), die aber keine funktionellen Unterschiede besitzen. Die schweren und leichten Ketten sind jeweils aus konstanten und variablen Domänen aufgebaut. Jede der variablen Domänen besitzt 3 hypervariable Regionen. Diese Regionen besitzen eine höhere Variabilität der Aminosäuren, als der restliche Teil der variablen Domänen. Die hypervariablen Regionen sind die Antigen-Bindestellen. Sie werden deshalb auch

komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR; “complementarity determining regions”) genannt. (Janeway *et al.* 2005; Dübel *et al.* 2004) Der Aufbau eines IgG ist in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Struktur eines IgG.**  $V_L$  und  $V_H$ : variable Domäne der leichten und der schweren Kette;  $C_L$ : konstante Domäne der leichten Kette;  $C_{H1,2,3}$ : konstante Domänen der schweren Kette; “hinge”-Region: flexibler Bereich zwischen  $C_{H1}$  und  $C_{H2}$  (erlaubt die Veränderung des Winkels zwischen den beiden Fab-Fragmenten); CDR: “complementarity determining region”; S-S: Disulfidbrücke; Fc: “fragment crystallizable” mit Effektorfunktion (Komplementaktivierung, Makrophagenbindung); Fv: “fragment variable” Bereich der Antigenbindung; Fab: “fragment antigen binding” Fragment mit Antigen-bindendem Bereich (nach Schmiedl & Dübel 2004)

Durch genetische Manipulation können unterschiedliche Antikörperfragmente hergestellt werden. Zu diesen Antikörperfragmenten zählen das Fab- (“fragment antigen binding”) und das scFv-Fragment (“single chain fragment variable”). Das Fab-Fragment besteht aus den variablen Domänen der schweren und der leichten Kette ( $V_H$ ;  $V_L$ ), der konstanten Domänen der leichten Kette ( $C_L$ ) und der ersten konstanten Domäne der schweren Kette ( $C_{H1}$ ). Das scFv-Fragment besteht aus den variablen Domänen der leichten und der schweren Kette ( $V_H$ ;  $V_L$ ), die über eine Peptidverbindung (“linker”) stabilisiert werden (Abbildung 4; Janeway *et al.* 2005; Dübel *et al.* 2004).



**Abbildung 4: Struktur eines Fab- und eines scFv-Fragments.**  $V_L$  und  $V_H$ : variable Domänen der leichten und der schweren Kette;  $C_L$ : konstante Domäne der leichten Kette;  $C_{H1}$ : konstante Domänen der schweren Kette (nach Schmiedl & Dübel 2004)

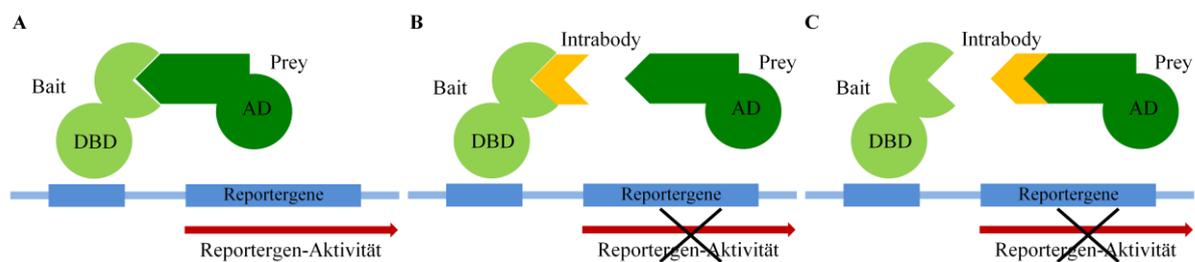
ScFv-Fragmente, die im Zellinneren exprimiert werden, werden intrazelluläre Antikörper oder “Intrabodies” genannt. Vor allem bei der cytoplasmatischen Expression treten häufig Faltungsprobleme bei Antikörperfragmenten auf. Die reduzierenden Bedingungen im Zytoplasma behindern die Ausbildung der intramolekularen Disulfid-Brücken. Trotzdem können einige scFv-Fragmente zytoplasmatisch exprimiert werden (Visintin *et al.* 2002). Diese “Intrabodies” binden intrazelluläre Proteine, modifizieren oder neutralisieren deren Funktion oder Lokalisation und verändern so den zellulären Phänotyp (Visintin *et al.* 2008). Daher können sie genutzt werden, um die Funktion von Proteinen und Protein-Protein-Interaktionen aufzuklären, für die intrazelluläre Diagnostik und Bildgebung, sowie zur Behandlung von Erkrankungen und Entwicklung von Medikamenten (Visintin *et al.* 2002; Stocks 2005).

### 1.5 “Yeast two-Hybrid” und “Intrabody” Screen

Das “Yeast two-Hybrid” System (Y2H) ist eine Methode, um Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* zu identifizieren und zu untersuchen. Die Grundlage bilden Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Gal4 von *Saccharomyces cerevisiae*, die in eine DNA-Bindedomäne (DBD) und eine Polymerase-II-Aktivierungsdomäne (AD) geteilt werden können (Fields & Song 1989). Beide Domänen werden mit Proteinen fusioniert, deren Interaktionen untersucht werden sollen. Das Fusionsprodukt aus DBD und Protein wird “Bait” und das Fusionsprodukt aus AD und Protein wird “Prey” genannt. Die Gene der Fusionsprodukte werden mit Hilfe von Expressionsvektoren in Hefezellen eingebracht und exprimiert. Wenn beide Proteine miteinander interagieren, werden die funktionellen Domänen des Transkriptionsfaktors in räumliche Nähe gebracht. Dadurch entsteht ein funktioneller Transkriptionsfaktor, der die Transkription von Reportergenen initiiert (Young 1998, Ralser *et al.* 2005a). Die verwendeten Reportergene sind meist *HIS3*, *LEU2* und *LacZ*. Dabei handelt es sich um Gene, die für Enzyme kodieren, die für die Biosynthese von Aminosäuren (Auxothrophiemarker) oder den

Abbau von Substraten benötigt werden (Abbildung 5A; Serebriiskii & Golemis 2000, McAllister-Henn *et al.*1999).

Ein “Intrabody” Screen dient der Suche nach Antikörperfragmenten, die die Interaktion von “Bait” und “Prey” unterbinden. Bindet ein Antikörperfragment an eines der beiden fusionierten Proteine, sodass die Interaktion beider verhindert wird, wird auch die Transkription der Reportergene unterbunden, da die Untereinheiten des Transkriptionsfaktors nicht interagieren und die Transkription aktivieren können (Abbildung 5B und C). Die im “Intrabody” Screen identifizierten Antikörper können zur genaueren Analyse von Protein-Protein-Interaktionen und zur Aufklärung der biologischen Funktion von Proteinen genutzt werden.



**Abbildung 5: Funktionsweise des Y2H-Systems und Prinzip der Inhibition der Interaktion von “Bait” und “Prey” durch “Intrabodies”.** A: Die Interaktion der “Bait”- und “Prey”-Proteine führt zur Aktivierung der Transkription der Reportergene; B und C: Die Bindung eines inhibitorischen “Intrabodys” an “Bait” (B) oder “Prey” (C) verhindert die Interaktion beider und unterbindet dadurch die Aktivierung der Reportergene.

## 1.6 Tomlinson Bibliothek I

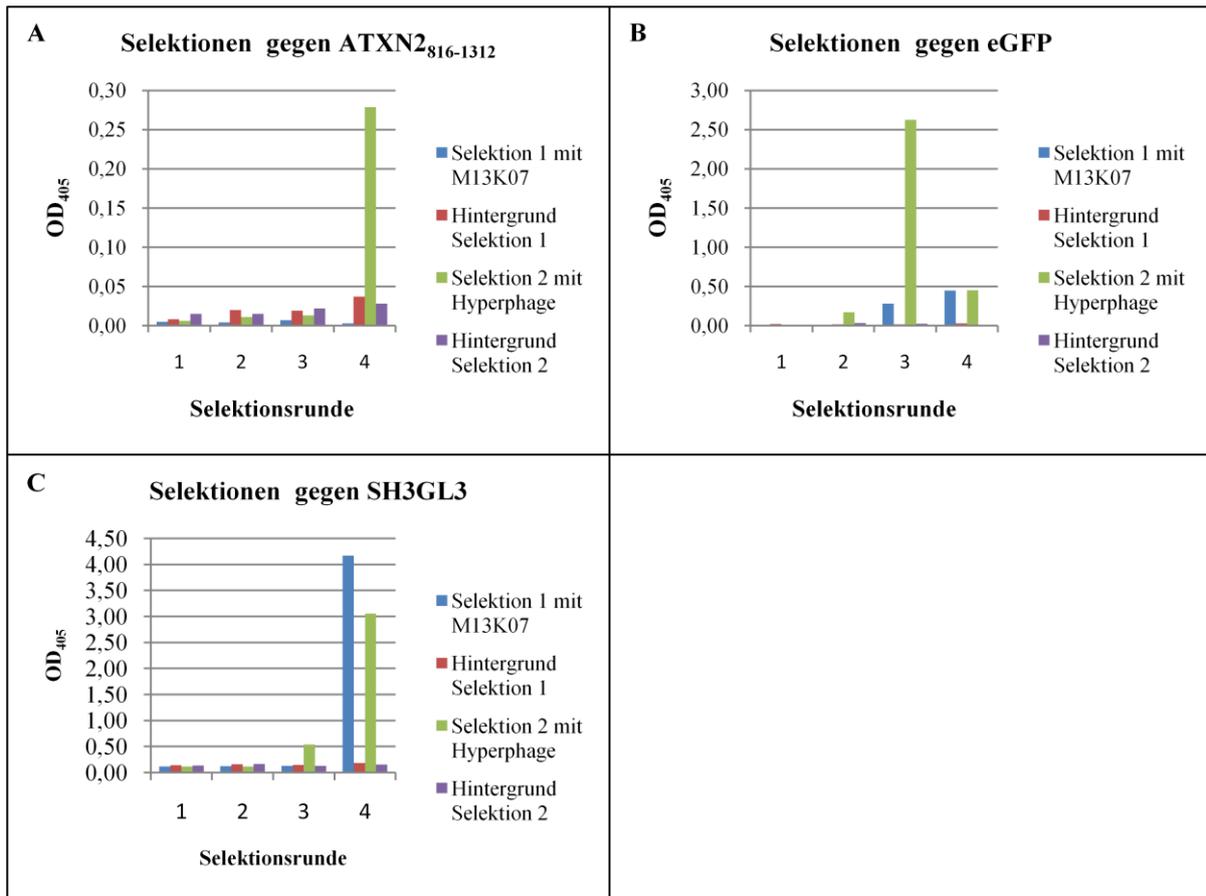
Die Tomlinson Bibliothek I ist eine semisynthetische Antikörper-Phagen-Display-Bibliothek. Sie besteht aus scFv-Fragmenten, deren DNA in das Phagmid pIT2 kloniert und dann in TG1 *E. coli*-Zellen transformiert wurde. Ausgehend von diesen *E. coli*-Zellen können Antikörper-präsentierende Phagen hergestellt werden. Die Tomlinson Bibliothek I beruht auf einzelnen humanen *in vivo* rekombinierten variablen Domänen der schweren Kette ( $V_H$ , V3-23/DP-47 und  $J_H4b$ ) und der leichten Kette ( $V_K$ , O12/O2/DPK9 und  $J_K1$ ) von Antikörpern. Die Diversität der Bibliothek basiert auf der Diversifizierung von 18 bestimmten Positionen in den Antigen-bindenden Regionen der scFvs (H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H96, H97, H98, L50, L53, L91, L92, L93, L94 und L96). Die Positionen wurden mittels PCR-Mutagenese unter Verwendung degenerierter Primer verändert und sind auch in natürlich vorkommenden Antikörpern sehr divers. Nach Vorselektion mit Protein A und Protein L besitzt die Bibliothek eine Größe von  $1,47 \times 10^8$ . (Geneservice 2007; de Wildt *et al.* 2000)

## 1.7 Zielsetzung

Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 2 ist eine neurodegenerative Erkrankung, die durch eine Polyglutaminexpansion im Protein Ataxin-2 ausgelöst wird. Die biologische Funktion von Ataxin-2 und die molekularen Erkrankungsmechanismen konnten bisher nicht geklärt werden. Für die Aufklärung stellen "Intrabodies" ein vielversprechendes Mittel dar. Mit Hilfe dieser Antikörperfragmente können Protein-Protein-Wechselwirkungen inhibiert werden und die Funktion der Proteine ermittelt werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, scFv-Fragmente zu identifizieren, die Protein-Protein-Interaktionen unterbinden. Dafür wird ein neuartiges Screening-Verfahren eingesetzt, bei dem einzelne Selektionsrunden aus einem "Panning-Prozess" (Antikörper-Subbibliotheken) in einen Hefeexpressionsvektor umkloniert werden und in einem "Intrabody" Screen auf die Inhibierung von unterschiedlichen Protein-Protein-Wechselwirkungen getestet werden. Parallel soll die Antigenbindung monoklonaler Antikörperfragmente aus den Selektionsrunden in ELISA und Western Immunoblot untersucht werden. Ausgewählte Antikörper sollen dann in humanen Zelllinien exprimiert werden und die Antigenbindung der *in vitro* selektierten scFv-Fragmente *in vivo* getestet werden.

Grundlage für diese Arbeit bilden verschiedene Selektionen, die in der AG Konthur durchgeführt wurden. Als Ausgangsmaterial diente die Tomlinson Bibliothek I. Mit Hilfe des Phagen-Displays wurden Phagen hergestellt, die die scFv-DNA trugen und die zugehörigen Antikörperfragmente auf ihrer Oberfläche präsentierten. Die Phagen wurden anschließend in 4 "Panning"-Runden auf die Bindung an die Proteine Endophilin A3 (SH3GL3) und eGFP ("enhanced Green Fluorescent Protein"), sowie eine Region des Ataxin-2 Proteins, ATXN2<sub>816-1312</sub>, selektiert. Die Anreicherung der spezifischen Phagen wurde in einem polyklonalen Phagen-ELISA kontrolliert (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Ergebnisse der Anreicherung spezifisch bindender Phagen im polyklonalen Phagen-ELISA.** Die Phagen wurden im Selektionsprozess entweder in allen Runden mit M13K07-Helferphagen (Selektion 1) oder initial mit Hyperphagen und in den weiteren Runden mit M13K07-Helferphagen (Selektion 2) hergestellt. Bei der Selektionen gegen ATXN2<sub>816-1312</sub> (A) konnte eine Anreicherung spezifisch bindender Phagen in Selektion 2 Runde 4 erzielt werden. Gegen eGFP (B) konnten spezifisch bindende Phagen in den Runden 3 und 4 beider Selektionen angereichert werden. Die Selektionen gegen SH3GL3 (C) ergaben eine Anreicherung spezifischer Phagen in Selektion 1 Runde 4 und Selektion 2 Runde 3 und 4.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte und Zubehör

Laborgeräte	Hersteller
Agarose-Gelelektrophoresekammern mit Kämmen	Max Planck Institut für molekulare Genetik
Assay Platten	Nunc, Roskilde, Dänemark; Genetix, Hampshire, UK
Digitales pH-/ mV-/ Thermometer	Greisinger, Regenstauf
Electrophoresis Power Supply EPS200, 300, 301, 600	Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektroporator Micro Pulser™	BioRad, München
Erlenmeyerkolben 250 ml, 500 ml, 1000 ml, (ohne Schikanen)	Schott, Mainz
Flockeneisbereiter AF20	Scotsman, Vernon Hills, USA
Geldokumentation GelDoc 2000	BioRad, München
Kulturplatten OmniTray	Nunc, Roskilde, Dänemark
Messzylinder 100 ml, 1000 ml	Fortuna, Brilon
Peltier Thermal Cycler PTC200	MJ Research, Waltham, USA
QFill2	Genetix, Hampshire, UK
Reagenz Reservoir 50 ml	Corning, New York, USA
Replikator 96 Pins, 384 Pins	Boekel, Feasterville, USA; Nunc, Roskilde, Dänemark
Schottflaschen 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml	Schott, Mainz
SDS Gel Färbekammer	
TE Series Transphor Electrophoresis Unit	Hoefler, San Francisco, USA
Ultraschallbad Transsonic 310	Elma, Singen
Ultraschall Desintegrator Sonifier Cell Disruptor B12	Branson Sonic Power, Connecticut, USA
UV-Lampe Modell UVL 21	Ultra-Violet Products, San Gabriel, USA
Vortexer Vortex-Genie	Scientific Industries, New York, USA
Waage Adventurer™ Pro AV812	Ohaus, Pine Brook, USA
Wasserbad Grant Sub 14	Grant Instruments, Cambridge, UK
XCell SureLock™ Electrophoresis Mini-Cell	Invitrogen, Carlsbad, USA
XCell 4 SureLock™ Electrophoresis Midi-Cell	Invitrogen, Carlsbad, USA
Inkubatoren	
Brutschrank Heraeus B6200	Heraeus, Hanau
CO <sub>2</sub> -Inkubator für die Zellkultur Cytoperm2	Heraeus, Hanau
Inkubationsschüttler Innova™ 4430 (37 °C)	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kühlbarer Inkubationsschüttler Innova™ 4330	New Brunswick Scientific, Edison, USA

(30°C)

Kühlbrutschrank IPP 500 (37 °C) Memmert, Schwabach  
Mikrotiterplattenschüttler ThermoShaker PST-60HL-4 Lab4You, Berlin

#### Mikroskope

Mikroskop Leica DMIL Leica, Wetzlar  
Fluoreszenzmikroskop LSM 510 meta Zeiss, Oberkochen

#### Pipetten

Elektrische Multikanalpipette 50-1200 µl Eppendorf, Hamburg  
Multikanalpipetten 5-50 µl, 20-200 µl Abimed, Langenfeld  
Pipetten 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl Gilson, Middleton, USA; Eppendorf, Hamburg

#### Photometer

Biophotometer Eppendorf, Hamburg  
Ultrospec 3100 pro Amersham Biosciences

#### Schüttler, Rührer und Mixer

Magnetrührer MR3001 Heidolph, Schwabach  
Roller TRM-V IDL, Nidderau  
Schüttler Gerhardt, Königswinter  
Thermomixer comfort 5355 Eppendorf, Hamburg  
Wipptisch Rocky Fröbel, Lindau

#### Sterilwerkbänke

Sterilwerkbank Microflow Laminar Flow Workstation Kendro, Langenselbold  
Sterilwerkbank Heraguard HPH 18 Heraeus, Hanau  
Sterilwerkbank Hera Safe HSP 12 Heraeus, Hanau

#### Wasseraufbereitungsanlagen

Anlage zur Herstellung von bidestilliertem Wasser  
Werner Reinstwassersystem NANOpure Diamond UV Barnstead, Dubuque, USA

#### Zentrifugen

Centrifuge 5810 R (mit Kühlsystem) Eppendorf, Hamburg  
Centrifuge 5415 C Eppendorf, Hamburg

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Cryo-Röhrchen mit Schraubverschluss	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deckgläschen	Carl Roth, Karlsruhe
Einweg-Küvetten UVette	Eppendorf, Hamburg
Einweg-Küvetten	Brand, Wertheim
Einweg-L-Spatel	Sigma, Steinheim
Einweg-Pipetten steril (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning, New York, USA

Gene Pulser Elektroporationsküvetten 0,1 cm	BioRad, München
Immobilon-PSQ Transfer Membran	Millipore, Billerica, USA
Impfösen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Mikrotiterklebeband 83 mm	neoLab, Heidelberg
Mikrotiterplatte Flachboden, flexibel	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Mikrotiterplatte NUNC-Immuno Plate F96	Nunc, Roskilde, Dänemark
Maxisorb	
Mikrotiterplatte U96 Polypropylen 0,5 ml natural	Nunc, Roskilde, Dänemark
Mikrotiterplatte 384 Wells Polystyrol 120 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen
NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gel	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE® Novex® 4-12 % Bis-Tris Midi-Gel	Invitrogen, Carlsbad, USA
Objekträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl, 50-1200 µl)	Gilson, Middleton, USA; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter 20 µl, 200 µl, 1000µl	Biozym, Oldendorf
Polypropylen-Röhrchen 14 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polypropylen-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Corning, New York, USA; Greiner Bio-one, Frickenhausen
Polypropylen-Säulen (5 ml)	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Whatman Papier 3mm	Whatman, Maldstone, USA
Zellkulturflasche 75cm <sup>2</sup>	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkultur Testplatten 12	TPP, Trasadingen, Schweiz

### 2.1.3 Lösungen, Puffer und Chemikalien

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
Allgemeines		
PBS 1x; pH 7,4	Stock 10x	
	2,5 g/l Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
	80 g/l Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
	14,3 g/l Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
	2,5 g/l Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt

PBS-T	1x PBS 0,1 % Tween® 20	Sigma-Aldrich, München
2% PTM	1x PBS 2 % (w/v) Milchpulver 1 % Tween® 20	BioRad, München Sigma-Aldrich, München
Tris-Hydrochlorid pH 6,8 oder 7,7	121,1 g/l Tris-Base pH mit Salzsäure auf 6,8 oder 7,7 einstellen	Merck, Darmstadt
<b>Agarose-Gelelektrophorese</b>		
Agarose	1-1,2 g/100 ml Agarose (in 1x TAE oder 0,5x TBE)	Invitrogen, Carlsbad, USA
TAE 50x; pH 8,18- 8,29	242 g/l Tris-Base 57,1 ml/l Eisessig 100 ml/l 0,5 M EDTA (pH 8,0)	Merck, Darmstadt Carl Roth, Karlsruhe Sigma, Steinheim
TBE 5x; pH 8,13- 8,23	54,0 g/l Tris-Base 27,5 g/l Borsäure 20 ml/l 0,5 M EDTA (pH 8,0)	Merck, Darmstadt Carl Roth, Karlsruhe Sigma, Steinheim
<b>ELISA</b>		
Substratpuffer (50 mM Citratpuffer, pH 4,3)	50 mM Trinatriumcitrat 50 mM Zitronensäure	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt
<b>Hefetransformation</b>		
TE-Puffer	10 mM Tris-Hydrochlorid pH 7,7 1 mM EDTA pH 8,0	Sigma, Steinheim
Mix 1	100 mM Lithiumacetat 1 M Sorbitol 5 mM TE-Puffer pH 7,7	Sigma, Steinheim Sigma, Steinheim
Mix 2	100 mM Lithiumacetat 40 % PEG 5 M TE-Puffer pH 7,7	Sigma, Steinheim Sigma, Steinheim
<b>Periplasmapräparation</b>		
PE-Puffer 3x; pH 8,0	60 % Sucrose 150 mM Tris-Base 1 mM EDTA pH 8,0	Invitrogen, Carlsbad, USA Merck, Darmstadt Sigma, Steinheim
<b>Proteinaufreinigung</b>		
Lysispuffer nativ; pH 8,0	50 mM Natriumdihydrogen- phosphat 300 mM Natriumchlorid 10 mM Imidazol	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München
Waschpuffer nativ; pH 8,0	50 mM Natriumdihydrogen- phosphat 300 mM Natriumchlorid 20 mM Imidazol	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München

Elutionspuffer nativ; pH 8,0	50 mM Natriumdihydrogen- phosphat	Merck, Darmstadt
	300 mM Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
	250 mM Imidazol	Sigma-Aldrich, München
<b>SDS-PAGE</b>		
MES-Laufpuffer 1x	Stock 20x in H <sub>2</sub> O	
	1 M MES	Sigma, Steinheim
	1 M Tris-Base	Merck, Darmstadt
	69,3 mM SDS	Carl Roth, Karlsruhe
	20,5 mM EDTA	Sigma, Steinheim
Laemmli-Puffer 4x	0,2 M Tris-Hydrochlorid pH6,8	Merck, Darmstadt
	8 % SDS	Carl Roth, Karlsruhe
	40 % (w/v) Glycerol	Merck, Darmstadt
	0,004 % Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
	5 % β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Coomassie-Färbelösung	1,25 g Coomassie Brilliant Blue R- 250	Sigma, Steinheim
	225 ml Ethanol technisch	Merck, Darmstadt
	225 ml H <sub>2</sub> O	
	50 ml Eisessig	Carl Roth, Karlsruhe
Entfärbelösung	10 % Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
	20 % Ethanol	Merck, Darmstadt
	70 % H <sub>2</sub> O	
<b>Western Blot</b>		
Blotting-Puffer	3 g/l Tris-Base	Merck, Darmstadt
	14 g/l Glycin	Merck, Darmstadt
<b>Sonstige Puffer</b>		
NEB Puffer Nr. 2 und 3		New England Biolabs, Frankfurt am Main
Taq Polymerase Puffer		Max Planck Institut für Molekulare Genetik
Ligase Puffer		New England Biolabs, Frankfurt am Main
<b>Chemikalien</b>		
ABTS		Sigma, Steinheim
Ammoniumacetat		Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid		Merck, Darmstadt
Bisbenzimid (Hoechst)		Sigma-Aldrich, München
BSA		Sigma-Aldrich, München
DMSO	100 %	Merck, Darmstadt; Sigma, Steinheim
Ethanol	100 %	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Stock 10 mg/ml	Merck, Darmstadt

	0,00005 % in TAE oder TBE	
EXGene 500 (Polyethylenimin)		Fermentas, St. Leon-Rot
Glycerol	87 %	Merck, Darmstadt
Harnstoff		AppliChem, Darmstadt
Heringssperma-DNA		Sigma, Steinheim
Immersionsöl 518F		Zeiss
IS Mountung Medium	0,1 % Natriumazid	Dianova, Hamburg
Methanol	100 %	Merck, Darmstadt
Natrium-meta-Arsenit		Merck
Nickel-NTA-Agarose		Qiagen, Hilden
Paraformaldehyd	16 %	Polysciences, Warrington, USA
2-Propanol	100 %	Merck, Darmstadt
Salzsäure	37 %	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA Lösung	10x	Biochrom, Berlin
Wasserstoffperoxid	30 %	Merck, Darmstadt

#### 2.1.4 Medien und Zusätze

Medium/ Zusatz	Zusammensetzung	Hersteller
<b>Bakterienkultur</b>		
2xYT Medium	16 g/l Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l Natriumchlorid	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
2xYT-Agar	16 g/l Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l Natriumchlorid 15 g/l Agar	Qbiogene, Montreal, Kanada
<b>Hefekultur</b>		
YPD-Medium	20 g/l Bacto™ Trypton 10 g/l Bacto™ Hefeextrakt 50 ml/l 40 % Glucose (17 g/l Bacto™ Agar für Festmedium)	Becton, Dickinson and Co., New Jersey, USA Becton, Dickinson and Co., New Jersey, USA Merck, Darmstadt Becton, Dickinson and Co., New Jersey, USA
SD-htlua-Medium	6,78 g/l Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren 100 ml/l 40 % Glucose (20 g/l Bacto™ Agar für Festmedium)	Difco, Lawrence, USA Merck, Darmstadt Becton, Dickinson and Co., New Jersey, USA

SD-a+htlu-Medium	6,78 g/l Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren	Difco, Lawrence, USA
	100 ml/l 40 % Glucose	Merck, Darmstadt
	10 ml/l 100 x Histidin	Sigma, Steinheim
	10 ml/l 100 x Uracil	Sigma, Steinheim
	10 ml/l 100x Leucin	Sigma, Steinheim
	10 ml/l 100x Tryptophan	Sigma, Steinheim
	(20 g/l Bacto™ Agar für Festmedium)	Becton, Dickinson and Co., New Jersey, USA
SD-tl+hua-Medium	6,78 g/l Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren	Difco, Lawrence, USA
	100 ml/l 40 % Glucose	Merck, Darmstadt
	10 ml/l 100 x Adenin	Sigma, Steinheim
	10 ml/l 100 x Histidin	Sigma, Steinheim
	10 ml/l 100 x Uracil	Sigma, Steinheim
	(20 g/l Bacto™ Agar für Festmedium)	Becton, Dickinson and Co., New Jersey, USA
SD-tla+hu-Medium	6,78 g/l Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren	Difco, Lawrence, USA
	100 ml/l 40 % Glucose	Merck, Darmstadt
	10 ml/l 100 x Histidin	Sigma, Steinheim
	10 ml/l 100 x Uracil	Sigma, Steinheim
	(20 g/l Bacto™ Agar für Festmedium)	Becton, Dickinson and Co., New Jersey, USA
SD-tla+hu-Einfriermedium	6,78 g/l Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren	Difco, Lawrence, USA
	50 ml/l 40 % Glucose	Merck, Darmstadt
	200 ml/l 5 M Betain	Sigma, Steinheim
	20 ml/l 50 % Glycerol	Merck, Darmstadt
	10 ml/l 100 x Histidin	Sigma, Steinheim
	10 ml/l 100 x Uracil	Sigma, Steinheim
<b>Säugetierzellkultur</b>		
DMEM-Zellkulturmedium	500 ml DMEM	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA
	10 % Fötale Bovines Serum	Sigma, Steinheim
	1 % Penicillin (50 U/ml)/ Streptomycin 50 µg/ml)	Biochrom, Berlin
<b>Aminosäurestocks 100 x;</b>		
Adenin	1 % (w/v) in 0,1 M Natrium- hydroxid; mit H <sub>2</sub> O auf 0,1% verdünnen	Sigma, Steinheim
Histidin	0,2 % (w/v) in H <sub>2</sub> O	Sigma, Steinheim
Leucin	0,6 % (w/v) in H <sub>2</sub> O	Sigma, Steinheim

Tryptophan	0,4 % (w/v) in H <sub>2</sub> O	Sigma, Steinheim
Uracil	1 % (w/v) in 0,1 M Natriumhydroxid; mit H <sub>2</sub> O auf 0,2% verdünnen	Sigma, Steinheim
<b>Antibiotika</b>		
Ampicillin	Stock: 50 mg/ml in 50 % Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Stock: 34 mg/ml in 50 % Ethanol	Böhringer Mannheim
<b>Sonstige Zusätze</b>		
2 % Glucoselösung	D-(+)-Glucosemonohydrat Stock: 40 % (w/v) in H <sub>2</sub> O	Alpha Aesar, Karlsruhe; Merck, Darmstadt
HMFM; pH 7,0	4 mM Magnesiumsulfat 15 mM Trinatriumcitrat 68 mM Ammoniumsulfat 36% Glycerol 0,13 M Kaliumdihydrogenphosphat 0,27 M Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt
IPTG	Stock: 1M in H <sub>2</sub> O	Fermentas, St. Leon-Rot

### 2.1.5 Mikroorganismen und Säugetierzelllinien

Mikroorganismus/Stamm	Genotyp	Anbieter/Herkunft
<i>Escherichia coli</i> DH10B	<i>F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL nupG λ-</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Escherichia coli</i> HB2151	<i>ara Δ(lac-proAB) thi/F' pro A<sup>+</sup>B lacI<sup>q</sup> lacZΔM15</i>	Max Planck Institut für molekulare Genetik
<i>Escherichia coli</i> TG1	<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>-</sup>)[F' traD36 proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15]</i>	Stratagene, La Jolla, USA
<i>Escherichia coli</i> XL1 blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10(Tet<sup>r</sup>)]</i>	Stratagene, La Jolla, USA
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) Star	<i>F' ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm rne131 (DE3)</i>	Max Planck Institut für molekulare Genetik
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> L40 ade A	<i>MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3,112 LYS2:::(lexAop)4-HIS3 ura3:::(lexAop)8-lacZ ade2:::KanMX4-(lexAop)8-URA3 GAL4 gal80 can1 cyh2</i>	Max Planck Institut für molekulare Genetik

Säugetierzelllinie	Organismus	Organ
HEK 293T	<i>Homo sapiens</i>	Niere
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	Gebärmutterhals

### 2.1.6 Plasmide und Phagmide

Plasmid	Verwendung	Herkunft
pACT4-1b	“Prey”-Plasmid für den “Intrabody” Screen	AG Krobitsch, Max Planck Institut für molekulare Genetik
pBTM116, pBTM117c, pBTM 118c	“Bait”-Plasmide für den “Intrabody” Screen	AG Krobitsch, Max Planck Institut für molekulare Genetik
pFLAG CMV 5a ccdB	Plasmid für die scFv-Expression in Säugerzellen	AG Konthur, Max Planck Institut für molekulare Genetik
pIB NLS Ade	Plasmid für die scFv-Expression in Hefezellen	AG Konthur, Max Planck Institut für molekulare Genetik
pIT2	Phagmid für die scFv-Expression in <i>E. coli</i>	Medical Research Council Cambridge
pRARE3	Helferplasmid für die Proteinexpression (Antigenexpression) in <i>E. coli</i>	AG Konthur, Max Planck Institut für molekulare Genetik
pRSET-BH6	Plasmid für die Expression von Proteinen (Antigenen) in <i>E. coli</i>	AG Konthur, Max Planck Institut für molekulare Genetik

### 2.1.7 Primer

Name	Sequenz	Verwendung	Hersteller/Herkunft
GPD 574f <sup>c</sup>	5'-TGATTGTAATTCTGTAA ATC-3'	Sequenzier- primer	Invitrogen, Carlsbad, USA
5'_scFv_HindIII_ pFLAG	5'-GAATTCAAGCTTGCCAC CATGGAGGTGCAGCTGTTG GAGTCT-3'	PCR-Primer	Invitrogen, Carlsbad, USA
3'_scFv_pFLAG	5'-AGGGGTACCGTGATGGT GATGATGATGTGCGGC-3'	PCR-Primer	Invitrogen, Carlsbad, USA
M13 REV	5'-CAGGAAACAGCTATGAC C-3'	Sequenzier- primer	Max Planck Institut für molekulare Genetik
T7 Pomotor Primer	5'-TAATACGACTCACTATA GGG-3'	Sequenzier- primer	Max Planck Institut für molekulare Genetik
VH-tom-NcoI_f	5'-ACATGCCATGGCCGAGG TGCAGC-3'	PCR-Primer	Invitrogen, Carlsbad, USA
VL-tom-NotI_rev	5'-AAGGAAAAAAGCGGCC GCCC GTTTGATTTC-3'	PCR-Primer	Invitrogen, Carlsbad, USA

## 2.1.8 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
<b>Restriktionsendonucleasen</b>	
<i>Hind</i> III	New England Biolabs, Frankfurt am Main
<i>Nco</i> I	New England Biolabs, Frankfurt am Main
<i>Not</i> I	New England Biolabs, Frankfurt am Main
<b>Polymerasen</b>	
Taq Polymerase	Max Planck Institut für molekulare Genetik
<b>Ligasen</b>	
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Lysozym	Sigma, Steinheim

## 2.1.9 Antikörper und Nachweisreagentien

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller
Alexa 488-anti-Maus IgG	1:500	Invitrogen, Carlsbad, USA
anti-ATXN2 (Maus)	1:200	BD Bioscience, San Jose, USA
anti-FLAG (Kaninchen)	1:500	Sigma-Aldrich, München
Cy3-anti-Kaninchen IgG	1:500	Dianova, Hamburg
Protein L-HRP	1:5000 und 1:2500	Thermo Science, Bonn
Streptavidin-HRP	1:2500	Thermo Science, Bonn

## 2.1.10 DNA- und Proteinstandards

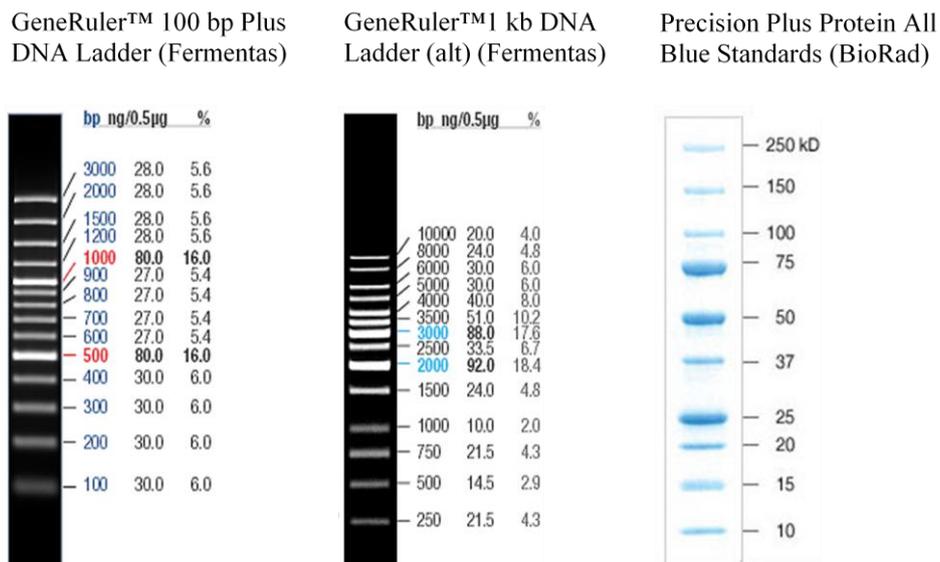


Abbildung 7: Verwendete DNA- und Proteinstandards

### 2.1.11 Kitsysteme

Name	Verwendung	Hersteller
CN/DAB Substrat Kit	Detektion der HRP beim Western Immunoblot, bei der Streptavidin-HRP-Färbung	Thermo Science, Bonn
peqGOLD Cycle Pure Kit	Aufreinigung von PCR-Proben	Peqlab, Erlangen
peqGOLD Gel Extraction Kit	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	Peqlab, Erlangen
peqGOLD Plasmid Miniprep KitI	Plasmidpräparation aus Bakterien	Peqlab, Erlangen
peqGOLD X Change Plasmid Maxi Kit	Plasmidpräparation aus Bakterien	Peqlab, Erlangen
peqGOLD X Change Plasmid Maxi-EF Kit	Plasmidpräparation aus Bakterien	Peqlab, Erlangen
Pierce 660nm Assay Kit	Konzentrationsbestimmung nach der Aufreinigung von Proteinen	Thermo Science, Bonn
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Plasmidpräparation aus Bakterien	Qiagen, Hilden

### 2.1.12 Software und Webtools

Bezeichnung	Verwendung	Anbieter
Axio Vision Release 4.7	Bildbearbeitung	Zeiss
LSM 510 meta	Fluoreszenzaufnahmen	Zeiss
Microsoft Office	Textverarbeitung, Bildbearbeitung und Tabellenkalkulation etc.	Microsoft
Photo Plus 6	Bildbearbeitung	Serif
Softmax Pro 4.8	ELISA-Auswertung, Konzentrationsbestimmung	MindVision Software
Vector NTI Advance 10	Sequenzauswertung	Invitrogen
ProtParam	Ermittlung der Proteinestabilität	<a href="http://www.expasy.ch">http://www.expasy.ch</a>

### 2.1.13 Sonstiges

Bezeichnung	Hersteller
BSA	New England Biolabs, Frankfurt am Main
dNTPs	Invitrogen, Carlsbad, USA
GlycoBlue™	Ambion, Austin, USA

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Herstellung von Medien für die *E. coli* Kultivierung

Zur Kultivierung von *E. coli* können flüssige und feste Medien verwendet werden. Für die Herstellung von flüssigem Medium wurden 31 g 2xYT-Medium (fertiger Mix in Pulverform) in 1 l destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert. Für festes Kulturmedium wurden 46 g 2xYT-Agar (fertiger Mix in Pulverform) in 1 l destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert. Die Aufbewahrung erfolgte bei Raumtemperatur. Je nach Verwendungszweck wurden den Medien Zusätze wie Antibiotika, Glucose oder IPTG beigefügt.

### 2.2.2 Kultivierung von Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*)

Hefezellen wurden in flüssigem oder auf festem Medium kultiviert. Als Medien wurden YPD-Medium oder Selektionsmedium (SD-Medium) verwendet.

### 2.2.3 Bestimmung der Zelldichte von Bakterien- und Hefekulturen

Um die Zelldichte von Bakterien- und Hefekulturen zu bestimmen, wurde die optische Dichte der Kultur bei einer Wellenlänge von 600 nm am Photometer gemessen. Als Referenz diente das sterile Medium.

### 2.2.4 Lagerung und Reaktivierung von Bakterien- und Hefekulturen

Bakterien- und Hefekulturen können für kurze Zeit bei 4 °C gelagert werden. Für eine längere Lagerung wurden Gefrierkulturen angelegt. Die Kulturen wurden dazu 1:2 in 60 % Glycerol verdünnt und bei -80 °C aufbewahrt. Zur Reaktivierung der Bakterien wurde etwas Zellmaterial aus den Gefrierkulturen entnommen, in 5 ml 2xYT-Medium gegeben und bei 37 °C inkubiert. Zur Reaktivierung der Hefen wurde etwas Zellmaterial aus der Gefrierkultur entnommen und auf YPD-Agar ausgestrichen. Die Platte wurde für 3 Tage bei 30 °C inkubiert, anschließend eine Kolonie isoliert und in YPD-Medium überführt. Die Flüssigkultur wurde dann ebenfalls bei 30 °C inkubiert.

### 2.2.5 Infektion von *E. coli* mit scFv-Antikörperfragment tragenden Phagen

Zunächst wurde eine ü. N.-Kultur des *E. coli*-Stamms HB2151 in 3 ml 2xYT-Medium hergestellt. Mit dieser Kultur wurden 50 ml 2xYT-Medium im Verhältnis 1:50 angeimpft. Die Kultur wurde für ca. 3 h bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

In Mikrotiterplatten wurden Verdünnungsreihen (von  $10^{-1}$  bis  $10^{-3}$ ) mit den Phagen aus verschiedenen Selektionsrunden in 1xPBS hergestellt. Zu den Phagen wurden anschließend 100 µl der HB2151 Kultur pro Well gegeben und die Platten für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Verdünnungen auf 2xYT-Agarplatten mit 100 µg/ml Amp und 2 % Glu ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden je Selektionsrunde 92 einzelne Kolonien isoliert und mit diesen je 200 µl 2xYT-Medium mit 100 µg/ml Amp, 2 % Glu und HMFM angeimpft (die Wells H3, H6, H9 und H12 wurden nicht angeimpft). HMFM (“Hogness Modified Freezing Medium”) dient als Zusatz, um Mikrotiterplatten mit Bakterienkulturen einfrieren zu können. Die Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 37 °C und 700 rpm inkubiert und dann bei -80 °C aufbewahrt.

#### 2.2.6 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Bei der Elektroporation wird Plasmid-DNA mit Hilfe eines elektrischen Impulses in Zellen eingebracht. Elektrokompente Zellen (DH10B, BL21 (DE3) STAR mit dem Helferplasmid pRARE3) wurden dazu zunächst auf Eis aufgetaut. Im Anschluss wurden 5 µl Ligationsansatz bzw. 1 µl Plasmid-DNA mit 50 µl der elektrokompenten Zellen gemischt und in vorgekühlte 0,1 cm Küvetten überführt. Die Zellen wurden anschließend im Elektroporator Micro Pulser™ transformiert (Programm: *E. coli*, 1,8 kV), in 1 ml 2xYT-Medium aufgenommen und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach 60 min Inkubation bei 37 °C und 800 rpm wurden die Bakterien für 3 min bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 100 µl abgenommen. Die Bakterien wurden im verbliebenen Überstand resuspendiert, auf 2xYT-Agarplatten mit 2 % Glu, 100µg/ml Amp und/oder 17µg/ml Cam ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

#### 2.2.7 Transformation von *S. cerevisiae* und “Intrabody” Screen

Für die Transformation von Hefezellen wurde zunächst eine 2 ml ü. N.-Kultur des Hefestamms L40 ade A in YPD-Medium hergestellt. Mit dieser Vorkultur wurden 30 ml YPD-Medium auf eine  $OD_{600}$  von 0,3 eingestellt. Die Kultur wurde für ca. 4 h bei 30 °C bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6-0,8 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Zellpellet in 10 ml 1x TE-Puffer resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5 min bei 2000 rpm wurde der Überstand entfernt, die Zellen in 1 ml Mix 1 resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. 40 µl der Zellen wurden mit 230 µl Mix 2, je 500 ng “Bait”- und “Prey”-Plasmid-DNA und

5 µl Heringssperma-DNA (10 µg/µl) gemischt und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Die verwendeten “Bait”- und “Prey”-Plasmide beinhalten die DNA der Proteine bzw. der Regionen des Proteins Ataxin-2, deren Interaktion im “Intrabody” Screen inhibiert werden sollte, fusioniert mit LexA (“Bait”) oder der Gal4AD (“Prey”). Gal4 ist ein Transkriptionsaktivator, der für die Transkription von Genen, benötigt wird, die für Enzyme des Galactose-Abbaus kodieren (Fields & Song 1989). LexA ist ein *E. coli*-Protein, das eine DNA-Bindedomäne besitzt und als Repressor in die SOS-Antwort auf DNA-Schäden involviert ist (Little *et al.* 1981).

Im Anschluss wurden 30 µl DMSO zugegeben und die Zellen für 7 min bei 42 °C inkubiert (Hitzeschock). Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen 4 min bei 3000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 50 µl bidestilliertem Wasser resuspendiert. Die 50 µl Suspension wurden anschließend auf SD-tl+hua-Agarplatten (SD-Agar mit 10 ml/l Adenin, 10 ml/l Histidin und 10 ml/l Uracil) ausplattiert und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

Für die Transformation mit Antikörperfragment-Subbibliotheken wurden einzelne Kolonien der mit “Bait” und “Prey” transformierten Hefezellen auf SD-tl+hua-Agarplatten ausgestrichen und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert, um mehr Zellmaterial zu erhalten. Mit dem Zellmaterial einer ausgestrichenen Kolonie wurde jeweils eine 30 ml ü. N.-Kultur in SD-tl+hua-Medium hergestellt. Damit wurden 200 ml SD-tl+hua-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 eingestellt. Die 200 ml Kulturen wurden für ca. 4 h bei 30 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen in 4 50 ml Polypropylen-Röhrchen überführt und für 5 min bei RT und 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das Pellet von 50 ml Kultur in 25 ml TE-Puffer resuspendiert. Danach wurde wieder 5 min bei 2000 rpm und RT zentrifugiert und das Zellpellet nach Entfernen des Überstandes in 1 ml Mix 1 resuspendiert. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden 500 µl der Zellen zu 2,8 ml Mix 2, 60 µl Heringssperma-DNA und 4-6 µg Plasmid-DNA (enthält die Antikörper-Subbibliothek) gegeben. Im Anschluss an eine 30 minütige Inkubation bei 30 °C wurden dem Ansatz 60 µl DMSO zugefügt und die Zellen für 14 min bei 42 °C inkubiert (Hitzeschock). Die Ansätze wurden 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen in 3 ml bidestilliertem Wasser resuspendiert. 500 µl der resuspendierten Zellen wurden auf SD-tla+hu-Agarplatten (SD-Agar mit 10 ml/l Histidin und 10 ml/l Uracil) ausplattiert und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

Für den “Intrabody” Screen wurden 3x 384 Kolonien von den Agarplatten isoliert und in SD-tla+hu-Einfriermedium überführt. Die Flüssigkulturen wurden 3 Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend auf SD-tla+hu-Agar und SD-htlua-Agar (SD-Agar ohne Aminosäurezusatz)

replikaplatziert. Die Platten wurden für 4 Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend das Wachstum der Kolonien analysiert.

## 2.2.8 Proteinexpression

### 2.2.8.1 scFv-Expression in Mikrotiterplatten

In Mikrotiterplatten wurden 200 µl 2xYT-Medium mit 100 µg/ml Amp und 2 % Glu pro Well vorgelegt und das Medium mit scFv-DNA tragenden *E. coli*-Kulturen (siehe 2.2.5) angeimpft. Die Platten wurden ü. N. bei 37 °C und 700 rpm inkubiert. Für die Induktion der Proteinexpression wurden am nächsten Tag 10 µl der ü. N.-Kultur in 200 µl vorgewärmtes 2xYT-Medium mit 100 µg/ml Amp und IPTG (Endkonzentration 1mM) überführt und die Kulturen ü. N. bei 30 °C und 700 rpm inkubiert. Die Platten wurden am nächsten Tag für die scFv-Präparation verwendet.

### 2.2.8.2 Antigenexpression

Mit Antigen-DNA transformierte *E. coli*-Zellen (BL21 (DE3) STAR pRARE3 transformiert mit pRSET-BH6, das Plasmid enthält die Antigen-DNA) wurden mit 3 ml 2xYT-Medium mit 100 µg/ml Amp und 17 µg/ml Cam von Agarplatten abgeschwemmt. Mit 1 ml der abgeschwemmten Zellen wurden dann 200 ml 2xYT-Medium (mit 100µg/ml Amp und 17µg/ml Cam) angeimpft ( $OD_{600} = 0,2$ ). Die Kulturen wurden für ca. 2 h bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,7 inkubiert. Anschließend wurde den Kulturen für die Induktion der Expression IPTG (Endkonzentration 1 mM) zugefügt und sie wurden für weitere 3-4 h inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend in 50 ml Polypropylen-Röhrchen überführt und für 20 min bei 4000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Um die DNA ihrer Größe und Konformation entsprechend aufzutrennen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden 1-1,2 % Agarosegele mit 1x TAE-oder 0,5x TBE-Puffer und 0,0005 % Ethidiumbromid hergestellt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert unter UV-Licht, wodurch die DNA sichtbar gemacht werden kann. Die

DNA wurde mit Ladepuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und die Auftrennung für 20 min bei 120V durchgeführt. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit der GelDoc 2000 Anlage.

### 2.3.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Gelextraktion von DNA erfolgte mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit. Dazu wurde die DNA-Bande mit der gewünschten Größe unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten und dann nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNA wurde mit 60 µl Elutionspuffer eluiert.

### 2.3.3 Plasmidpräparation

Plasmidpräparationen wurden mit verschiedenen Kits durchgeführt. Aus 5 ml Bakterienkultur wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des peqGOLD Plasmid Miniprep KitI gewonnen. Die Präparation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die DNA mit 65µl Elutionspuffer eluiert.

Für die Präparation der Plasmid-DNA aus 100 ml Bakterienkultur wurden das peqGOLD X Change Plasmid Maxi Kit, das Qiagen Plasmid Maxi Kit und das peqGOLD X Change Plasmid Maxi-EF Kit verwendet. Die Präparationen erfolgte nach Herstellerangaben, nur die Zentrifugationsschritte wurden abweichend davon bei 4000 rpm oder 6000 rpm durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde anschließend in 200µl Millipore-H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.3.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde mittels Photometer bestimmt. Dazu wurde die DNA 1:50 oder 1:100 verdünnt. Mit Hilfe des Photometers wurden dann die Konzentration und die Reinheit der Proben über die Absorption bei 260, 280 und 230 nm ermittelt. Die maximale Absorption von DNA liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Absorption von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl.

### 2.3.5 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen kann ein DNA-Fragment spezifisch aus einem Plasmid herausgeschnitten werden.

Zwischen 150 ng und 20µg Plasmid-DNA wurde mit den Restriktionsendonucleasen *NcoI* und *NotI* oder *HindIII* und *NotI* geschnitten. Das eingesetzte Volumen der

Restriktionsendonucleasen variierte je nach eingesetzter DNA-Menge. Allen Ansätzen wurde BSA, der benötigte Puffer und bidestilliertes Wasser zugefügt. Die Restriktionen wurden für 3 h oder ü. N. bei 37°C durchgeführt. Die Aufreinigung der Fragmente erfolgte mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit oder mit dem peqGOLD Cycle Pure Kit. Ein Beispiel für die Zusammensetzung eines Restriktionsverdau ist in Tabelle 1 dargestellt.

Komponente	Volumen
ddH <sub>2</sub> O	8 µl
<i>Hind</i> III (20U/µl)	0,5 µl
<i>Not</i> I (10U/µl)	1 µl
BSA (100x)	0,5 µl
Puffer Nr. 2 (10x)	5 µl
DNA	35µl (1 µg)
gesamt	50 µl

**Tabelle 1: Beispiel für die Zusammensetzung eines Restriktionsverdau**

### 2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei einer Ligation werden zwei DNA-Fragmente (z. B. Plasmid und scFv) von einer Ligase unter ATP-Verbrauch miteinander verbunden.

Die Ligation der DNA-Fragmente wurde mit Hilfe der T4 DNA Ligase durchgeführt. Plasmide und scFvs wurden im Verhältnis 1:3 ligiert (die eingesetzten Volumina wurden anhand der Fragmentlängen ermittelt). Als Kontrolle diente ein Ligationsansatz, der ausschließlich den leeren Vektor enthielt (Religationskontrolle). Alle Ligationsansätze enthielten außerdem bidestilliertes Wasser und T4 DNA Ligase Puffer. Die Ligationen wurden ü. N. bei RT durchgeführt. Ein Beispiel für einen Ligationsansatz ist in Tabelle 2 dargestellt.

Komponente	Volumen
ddH <sub>2</sub> O	5,5 µl
Ligase-Puffer (10x)	1 µl
T4 DNA Ligase (400 U/µl)	0,7 µl
Insert	1,4 µl (40 ng)
Vektor	1,4 µl ( 100 ng)
gesamt	10 µl

**Tabelle 2: Beispiel für die Zusammensetzung eines Ligationsansatzes**

### 2.3.7 Ethanolpräzipitation

Die Ethanolpräzipitation wurde durchgeführt, um die DNA nach einer Ligation aus den Ansätzen zu fällen und vorhandene Salze zu entfernen. Zu jedem Ligationsansatz wurden 1/10 des Volumens an 7,5 M Ammoniumacetat, 2 µl GlycoBlue und das 2,5 fache des Volumens an 100 % Ethanol gegeben. Im Anschluss wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gefroren und dann für 10 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 50 µl 70 % Ethanol gewaschen. Die Proben wurden wieder in flüssigem Stickstoff gefroren und für 10 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet luftgetrocknet und dann in 2µl bidestilliertem Wasser resuspendiert.

### 2.3.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde durch die Service Abteilung des Max Planck Instituts für molekulare Genetik durchgeführt. Dazu wurden Bakterienkulturen für die Plasmidpräparation, sowie die benötigten Primer für die anschließende Sequenzierung abgegeben. Die Sequenzdaten wurden mit dem Programm VectorNTI 10 analysiert.

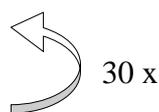
### 2.3.9 Polymerase Ketten Reaktion

Um kurze DNA-Abschnitte zu amplifizieren, wurde eine PCR durchgeführt. Ein Beispiel für die Zusammensetzung eines Ansatzes sowie ein PCR-Programm sind in den folgenden Tabellen (Tabellen 3 und 4) dargestellt. Die PCR-Reaktionen wurden im Peltier Thermal Cycler PTC200 durchgeführt.

Komponente	Volumen
Taq-Polymerase Puffer (10x)	5 µl
dNTPs (2,5 mM)	4 µl
Primer "forward" (10 µM)	1 µl
Primer "reverse" (10 µM)	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
Template (DNA oder Kultur)	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	37,5 µl
gesamt	50 µl

**Tabelle 3: Beispiel für die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes**

Schritt	Temperatur	Zeit	Vorgang
1	94 °C	4 min	Denaturierung
2	94 °C	30 sec	Denaturierung
3	55 °C	1 min	“Annealing”
4	72 °C	2 min	Elongation
5	72 °C	5 min	Auffüllreaktion
6	4 °C	∞	



**Tabelle 4: Beispiel für ein PCR-Programm**

## 2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.4.1 Aufreinigung von Proteinen (Antigenen) mit His6-“Tag”

Die in *E. coli* (BL21 (DE3) STAR pRARE3 :: pRSET-BH6 Antigen) exprimierten rekombinanten Antigene wurden mittels “Immobilized Metal Affinity Chromatography” (IMAC) aufgereinigt. Für die Aufreinigung wurden die pelletierten *E. coli*-Zellen (Abschnitt 2.2.8.2) zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Bakterienpellets (von je 50 ml Kultur) wurden in 3 ml nativem Lysispuffer resuspendiert und der Suspension 3 µl Lysozym (Stock 20 mg/ml) zugefügt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen 3x 20 sec mit 20 sec Pausen auf Eis sonifiziert. Das Lysat wurde in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, welcher die Antigene enthielt, wurde in neue Reaktionsgefäße überführt. 60 µl des Überstands wurde für die spätere Analyse in einer SDS-PAGE in separate Reaktionsgefäße gegeben. Im Anschluss wurden mit Ni-NTA-Agarose gefüllte Polypropylen-Säulen mit 20 ml nativem Lysispuffer äquilibriert. Der Überstand wurde auf die Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. In diesem Schritt werden die Antigene über die vorhandenen His6-“Tags” an die Nickel-Ionen gebunden. Anschließend wurden die Säulen 2x mit 10 ml nativem Waschpuffer mit geringer Imidazolkonzentration gewaschen, wodurch unspezifisch gebundene Proteine von der Säulenmatrix entfernt werden. Die Waschfraktionen wurden ebenfalls aufgefangen. Danach wurden 5x 2 ml Elutionspuffer auf die Säulen pipettiert. Durch die hohe Imidazolkonzentration im Elutionspuffer werden die gebundenen Antigene von den Nickelionen gelöst und können in separaten Elutionsfraktionen gesammelt werden. Die einzelnen Fraktionen wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

#### 2.4.2 Bestimmung der Antigenkonzentrationen

Nach der Aufreinigung wurde die Konzentration der Antigene in den einzelnen Eluaten mit Hilfe des Pierce 660nm Assay Kits bestimmt. Dazu wurden je 10 µl des Proteinstandards, der Eluate und des Elutionspuffers (als Blindprobe) in eine flexible Mikrotiterplatte mit flachem Boden gegeben. Im Anschluss wurden 150 µl Protein Assay Reagenz zugefügt, die Proben für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Konzentrationen am ELISA Reader mit dem Programm Softmax Pro 4.8 unter Verwendung des Proteinstandards ermittelt.

#### 2.4.3 scFv-Präparation in Mikrotiterplatten

Durch die Präparation werden exprimierte scFvs aus dem Periplasma von Bakterien in den Kulturüberstand überführt. Dafür wurden 50 µl 3x PE-Puffer (Periplasma-Extraktionspuffer) in jedes Well der Mikrotiterplatten mit den Kulturen (*E. coli* HB2151; siehe 2.2.8.1) gegeben und die Platten für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Platten für 15 min bei 3500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (enthält die scFvs) wurde im Anschluss für einen Western Immunoblot und ELISAs verwendet.

#### 2.4.4 “Enzyme-linked Immunosorbent Assay” mit scFv-Fragmenten

Im ELISA kann die Bindung eines Antikörpers an sein Antigen spezifisch nachgewiesen werden. Dazu wurden die ELISA-Platten mit 100 µl Antigen (10 µg/ml in 1xPBS) für 1 h bei RT beschichtet (“coating”). Im Anschluss wurden die Platten 3x mit PBS-T gewaschen und für 1 h bei RT mit 2 % PTM (380 µl/Well) abgesättigt (“blocken” der Platten). Nach 3x Waschen mit PBS-T wurden 200 µl der Überstände aus der scFv-Präparation (1:2 in 2 % PTM) in jedes Well gegeben und wieder 1 h bei RT inkubiert. Erneut wurde 3x mit PBS-T gewaschen und die Platten für eine weitere Stunde mit 200 µl Protein L-HRP/Well (1:5000 in 2 % PTM) bei RT inkubiert. Protein L bindet an die leichte Kette (Typ κ) der scFvs. Danach wurde 2x mit PBS-T und 1x mit 1x PBS gewaschen und in jedes Well 100 µl ELISA-Substrat (1 Tablette ABTS gelöst in 20 ml Substratpuffer und versetzt mit 10 µl 30 % Wasserstoffperoxid) gegeben. Die Platten wurden für 30 min inkubiert und die Färbung dann mit Hilfe des ELISA-Readers bei der substratspezifischen Wellenlänge von 405 nm ausgelesen.

#### 2.4.5 SDS-PAGE

Die mittels IMAC aufgereinigten Antigene (siehe 2.4.1) wurden in einer SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) ihrer molekularen Masse entsprechend aufgetrennt.

Für die SDS-PAGE wurden bereits gebrauchsfertige Gele von Invitrogen verwendet. Die Proben wurden mit 4x Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min im Peltier Thermal Cycler PTC200 auf 95 °C erhitzt. Der Puffer und die Hitze bewirken dabei die Denaturierung der Proteine. Das im Puffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol bewirkt die Reduktion der Disulfidbrücken im Protein. Das ebenfalls enthaltene SDS bewirkt als ionisches Detergenz die Denaturierung der Proteine und führt zur negativen Ladung (Maskierung der eigentlichen Ladung), wodurch alle Proteine in Richtung Pluspol aufgetrennt werden. 10  $\mu$ l der Proben und 5  $\mu$ l des Proteinstandards wurden auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese in 1x MES-Laufpuffer für 35 min bei 200V und 400mA durchgeführt.

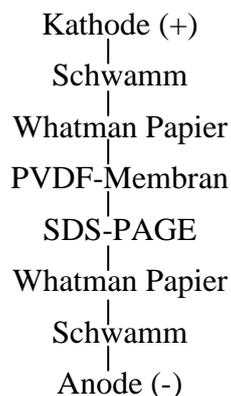
#### 2.4.6 Coomassie-Färbung und Entfärbung

Nach der SDS-PAGE wurden die Gele mit einer Coomassie-Färbelösung behandelt, um die Proteine sichtbar zu machen. Die Gele wurden dazu für 45 min in die Coomassie-Färbelösung und anschließend für 1,5 h in Entfärbelösung gelegt. Nach dem Entfärben wurden die Gele in bidestilliertes Wasser gelegt.

#### 2.4.7 Western Immunoblot

Mit Hilfe eines Western Immunoblots können Proteine aus einer SDS-PAGE auf eine Membran transferiert werden und anschließend durch Immunfärbung spezifisch nachgewiesen werden.

Die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Blot wurde dafür wie folgt aufgebaut:



Die Schwämme und das Whatman Papier wurden vor dem Zusammenbau des Blots in Blotting-Puffer getaucht. Die PVDF-Membran wurde zunächst mit 70 % Ethanol befeuchtet und dann ebenfalls in Blotting-Puffer getaucht. Der Transfer der Proteine erfolgte dann für 1 h bei 200 V und 400 mA.

Im Anschluss an den Transfer wurden die auf die Membran übertragenen Proteine (Antigene) mittels Immunfärbung spezifisch angefärbt.

Dazu wurde die Membran zunächst für 1 h bei RT mit 2 % PTM abgesättigt ("blocking"), um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Nach einem 5 min Waschschrift mit PBS-T wurde die Membran in Streifen geschnitten und für 1 h bei RT mit 600 µl der scFvs aus den scFv-Präparationen (1:2 verdünnt in 2 % PTM) inkubiert. Nach einem weiteren 5 min Waschschrift mit PBS-T wurden die Blotstreifen für eine Stunde bei RT mit HRP konjugiertem Protein L (1:2500 verdünnt in 2 % PTM) inkubiert. Die Membranstreifen wurden noch einmal für 5 min mit PBS-T gewaschen. Danach wurde das Substrat CN/DAB auf die Streifen gegeben. Die Farbreaktion wurde mit Wasser abgestoppt und die Streifen zwischen Whatman Papier getrocknet.

#### 2.4.8 Färbung mit Streptavidin-HRP

Mit der Färbung mit Streptavidin-HRP lassen sich biotinylierte Proteine nach einem Elektrotransfer spezifisch auf einer Membran nachweisen.

Die Membran wurde dafür wie bei der Immunfärbung zunächst für 1 h bei RT mit 2 % PTM abgesättigt und dann für 5 min mit PBS-T gewaschen. Danach wurde die Membran für 1 h bei RT mit Streptavidin-HRP (1:2500 verdünnt in 2 % PTM) inkubiert. Die Membran wurde wieder 5 min mit PBS-T gewaschen. Im Anschluss wurde CN/DAB auf die Membran gegeben und die Farbreaktion dann mit Wasser abgestoppt. Die Membran wurde zwischen Whatman Papier getrocknet.

#### 2.4.9 Bestimmung der Proteinstabilität

Die Stabilität von Proteinen wurde mit Hilfe des Webtools ProtParam (auf [www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)) ermittelt. Dazu wurde die Aminosäuresequenz des Proteins auf der Website eingegeben und die Stabilität anschließend vom Programm errechnet.

## 2.5 Zellbiologische Methoden

### 2.5.1 Kultivierung von Säugetierzellen

Die Säugetierzellen (HEK 293T und HeLa) wurden in Zellkulturmedium (DMEM mit 10 % Fötalem Bovinen Serum und 1 % Penicillin (5U/ml)/ Streptomycin (50 µg/ml)) im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C kultiviert. Alle 3-5 Tage wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellen mit sterilem 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 0,5 ml bzw. 1 ml 5x Trypsin/EDTA-Lösung von der Kulturflasche abgelöst und in eine neue Kulturflasche mit frischem Medium überführt.

### 2.5.2 Transfektion von Säugetierzellen

Für die Transfektion der Zellen wurden diese auf Deckgläschen (in 1 ml Medium/Well in Zellkultur Testplatten) mit einer Konfluenz von 50-70 % ausgesät und anschließend für 24 h im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert.

Für die eigentliche Transfektion wurden 2 µg der Plasmid-DNA (Plasmid mit scFv-DNA), 6 µl Polyethylenimin (1 mg/ml, EXGene 500) und 100 µl 150 mM Natriumchlorid gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Mischung zu den Zellen gegeben und die Transfektionsansätze für 24 h bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert.

### 2.5.3 Induktion von oxidativem Stress in Säugetierzellen

Zur Induktion von oxidativem Stress wurden die entsprechenden Zellkulturansätze mit 5 µl 100 mM Natrium-meta-Arsenit versetzt und anschließend für 1 h im Brutschrank inkubiert.

### 2.5.4 Immunfluoreszenzfärbung und -mikroskopie

Um die Lokalisation von Proteinen oder Antikörperfragmenten in Säugerzellen feststellen zu können, wurden die Zellen immunfluoreszenzgefärbt.

Zunächst wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend 10 min bei RT mit 0,5 ml/Well 2 % Paraformaldehyd, um sie zu fixieren. Das Paraformaldehyd wurde entfernt und die Zellen für 10 min in 0,5 ml eiskaltem Methanol/Well inkubiert, was die Permeabilisierung der Zellwände bewirkt. Nach der Behandlung mit Methanol wurden die Zellen für 30 min mit 3 % BSA (0,5 ml/Well) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem ersten Primärantikörper (200 µl/Well anti-ATXN2 1:200 verdünnt in 3 % BSA). Die Zellen wurden 1 h bei RT

inkubiert und dann 2x mit 1x PBS gewaschen. Danach wurden die Säugetierzellen für 1 h bei RT mit dem zweiten Primärantikörper inkubiert (200 µl/Well anti-FLAG 1: 500 verdünnt in 3 % BSA). Dieser Antikörper bindet an den FLAG-“Tag” der scFvs. Nach 2x Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen für 1 h bei RT mit den fluochromgekoppelten Sekundärantikörpern Alexa 488-anti-Maus IgG und Cy3-anti-Kaninchen IgG (beide 1:500 verdünnt in 3 % BSA) inkubiert. Alexa 488-anti-Maus IgG bindet an anti-ATXN2 und Cy3-anti-Kaninchen IgG bindet an anti-FLAG. Anschließend wurden die Zellen 1x mit 1x PBS gewaschen und dann 5 min mit 200 µl/Well 50 mM Ammoniumchlorid behandelt, um den Hintergrund zu reduzieren. Nach 2 weiteren Waschschritten mit 1x PBS erfolgte die Färbung der Zellkerne durch 20 sec Inkubation mit Hoechst (Bisbenzimid, 200 µl/Well, 10 µl Hoechst in 10 ml 1x PBS). Abschließend wurde noch 2x mit 1x PBS gewaschen.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden 5 µl Mountingmedium auf Objektträger gegeben, um eine gleichmäßigere Fluoreszenz zu erzielen und ein schnelles Verblässen zu verhindern. Anschließend wurden die Deckgläschen mit den Zellen auf die Objektträger gelegt. Die Mikroskopie wurde mit dem LSM 510 meta von Zeiss durchgeführt. Für die Aufnahmen wurde das Objektiv Plan-Neofluar 40x/ 1,3 oil DIC verwendet. Die Aufnahmen wurden anschließend mit dem Programm Axio Vision Release 4.7 bearbeitet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 *in vivo* Identifikation von inhibitorischen scFv-Antikörperfragmenten mittels

##### “Intrabody” Screen

Mittels “Intrabody” Screen sollten Antikörperfragmente, die Protein-Protein-Interaktionen inhibieren, identifiziert werden. Ausgangspunkt waren Antikörper-Subbibliotheken, die im “Panning”-Prozess durch Selektion gegen verschiedene Targets hergestellt worden waren. Für den Screen wurden die Antikörperfragmente aus den einzelnen Selektionsrunden zunächst in einen Hefeexpressionsvektor umklontiert.

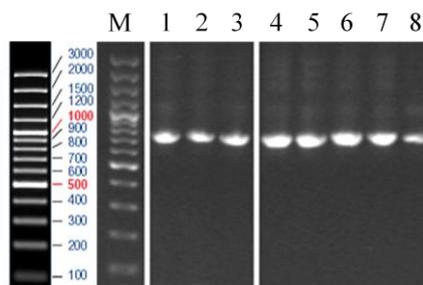
##### 3.1.1 Subklonierung einzelner Selektionsrunden in einen Hefeexpressionsvektor

Die Grundlage für die Umklonierung bildeten Antikörperfragment-Subbibliotheken in Form von TG1 *E. coli*-Zellen. Diese beinhalteten Phagmide (pIT2) mit DNA unterschiedlicher scFv-Fragmente aus verschiedenen Selektionsrunden. Als Targets wurden in den Selektionen die Proteine SH3GL3 und eGFP, sowie eine Region des Ataxin-2-Proteins, ATXN2<sub>816-1312</sub>, welche die C-terminale Region mit dem PAPB-Bindemotiv PAM2 umfasst, eingesetzt. Für alle Targets wurden zwei Selektionen parallel durchgeführt. In der einen wurden die Antikörperbibliotheken initial mit Hyperphagen verpackt, in der anderen mit M13K07-Helferphagen. In allen weiteren Selektionsrunden wurden zur Verpackung der Bibliotheken M13K07-Helferphagen eingesetzt. Die Subbibliotheken, die für die Klonierung verwendet wurden, sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Selektion (Subbibliothek)	Abkürzung
Selektion gegen ATXN2 <sub>816-1312</sub> mit Hyperphage/M13K07 Runde 4	anti-ATXN2 <sub>816-1312</sub> Hyp. R.4
Selektion gegen SH3GL3 mit M13K07 Runde 4	anti-SH3GL3 M13K07 R.4
Selektion gegen SH3GL3 mit Hyperphage/M13K07 Runde 3	anti-SH3GL3 Hyp. R.3
Selektion gegen SH3GL3 mit Hyperphage/M13K07 Runde 4	anti-SH3GL3 Hyp. R.4
Selektion gegen eGFP mit M13K07 Runde 3	anti-eGFP M13K07 R.3
Selektion gegen eGFP mit M13K07 Runde 4	anti-eGFP M13K07 R.4
Selektion gegen eGFP mit Hyperphage/M13K07 Runde 3	anti-eGFP Hyp. R.3
Selektion gegen eGFP mit Hyperphage/M13K07 Runde 4	anti-eGFP Hyp. R.4

**Tabelle 5: Die für die Umklonierung verwendeten Subbibliotheken**

Mit den *E. coli*-Zellen aus den verschiedenen Selektionsrunden wurden Flüssigkulturen in 2xYT Medium mit Amp und Glu angeimpft und die Phagmide mittels Plasmidpräparation aus den Zellen gewonnen. Anschließend wurden die Phagmide mit den Restriktionsendonucleasen *NcoI* und *NotI* geschnitten. Der Hefeexpressionsvektor pIB NLS Ade, in welchen die scFv-DNA umklontiert werden sollte, wurde mit den gleichen Enzymen geschnitten. Sowohl der Hefeexpressionsvektor, als auch die scFv-DNA-Fragmente wurden nach dem Restriktionsverdau auf ein Agarosegel aufgetragen und geextrahiert. Da die Konzentration der Antikörperfragmente nach der Aufreinigung gering war, wurden sie mittels PCR und den Primern VH-tom-*NcoI*\_f und VL-tom-*NotI*\_rev amplifiziert. Die Amplifikation wurde mit Hilfe eines Agarosegels überprüft (Abbildung 8).

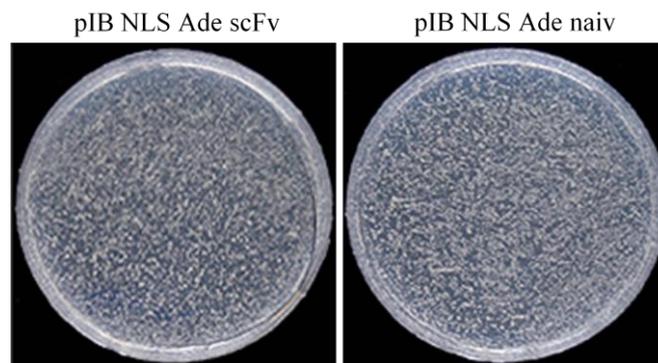


**Abbildung 8: Kontrolle der PCR zur Amplifikation der scFv-DNA-Fragmente.** M: 100 bp Plus DNA Leiter scFv-Fragmente aus den Selektionen: 1: anti-SH3GL3 M13K07 R.4; 2 und 3: anti-SH3GL3 Hyp. R.3 und 4; 4: anti-ATXN2<sub>816-1312</sub> Hyp. R.4; 5 und 6: anti-eGFP M13K07 R.3 und 4; 7 und 8: anti-eGFP Hyp. R.3 und 4; Bei allen Proben ist eine Bande bei ca. 750 bp zu sehen.

Alle PCR-Proben zeigten wie erwartet eine Bande bei ca. 750 bp, was darauf schließen lässt, dass die DNA der Antikörperfragmente erfolgreich amplifiziert wurde.

Im Anschluss an die PCR wurden die Fragmente nochmals mit *NcoI* und *NotI* geschnitten und mit dem bereits linearisierten Plasmid pIB NLS Ade ligiert. Zusätzlich wurde eine Religationskontrolle durchgeführt, in der das Plasmid ohne Insert (scFv-DNA) ligiert wurde. Zur Entfernung der Salze aus den Ligationsansätzen und zur Konzentrierung der DNA wurden die Proben mit Ethanol präzipitiert, wodurch höhere Transformationsraten erreicht werden können. Danach wurden DH10B *E. coli*-Zellen mit den Ligationsansätzen transformiert und auf 2xYT-Agar mit Cam und Glu ausgestrichen. Für eine ausreichende Diversität der scFv-Fragmente war eine Anzahl von 5000-10000 Kolonien auf den Platten erforderlich. Die benötigte Anzahl konnte auch erreicht werden, wohingegen auf der Platte mit der Religationskontrolle ca. 400 Kolonien gezählt wurden. Folglich wuchsen auf den Platten 12,5-25-mal mehr Kolonien, die das Plasmid mit Insert enthielten, als Kolonien mit religiertem Plasmid.

Um die Vollständigkeit und Funktionalität des Plasmids pIB NLS Ade zu überprüfen, wurden zwei Einzelklone von den Agarplatten isoliert und Flüssigkulturen in 2xYT-Medium mit Cam und Glu angeimpft. Danach wurde die Plasmid-DNA aus den *E. coli*-Kulturen präpariert und in den *S. cerevisiae*-Stamm L40 ade A transformiert, welcher Adenin-auxotroph ist. Die Transformationsansätze wurden auf SD-a+htlu-Medium ausplattiert, um die Funktionalität des auf dem Plasmid pIB NLS Ade enthaltenen Auxotrophiemarkers ADE2 zu überprüfen (Abbildung 9, links). Zur Kontrolle wurden L40 ade A-Zellen mit einer unselektierten Antikörper-Bibliothek transformiert, welche auch im pIB NLS Ade-Vektorhintergrund vorlag (Abbildung 9, rechts). Da sowohl die transformierten Hefezellen, als auch die Kontrolle auf den Platten wuchsen, konnte gezeigt werden, dass der Auxotrophiemarker ADE2 funktionsfähig ist, und die Plasmide für weitere Analysen eingesetzt werden können.



**Abbildung 9: Überprüfung der Funktionalität des Hefeexpressionsvektors pIB NLS Ade.** links: L40 ade A-Zellen transformiert mit pIB NLS Ade scFv (Einzelklon aus der Selektion: anti-eGFP Hyp. R.3); rechts: L40 ade A-Zellen transformiert mit pIB NLS Ade naiv (unselektierte Antikörper-Bibliothek, Kontrolle)

Im Anschluss an die Überprüfung des Plasmids wurden die *E. coli*-Kolonien von den Agarplatten abgeschwemmt, neue Kulturen damit angeimpft und die Plasmid-DNA aus den Zellen isoliert.

### 3.1.2 “Intrabody” Screen

Im “Intrabody” Screen sollten inhibitorische Binder für die Interaktionen folgender Proteine bzw. Regionen des Ataxin-2-Proteins identifiziert werden: ATXN2<sub>816-1312</sub> und PABC, ATXN2(Q22)<sub>1-396</sub> und SH3GL3, sowie ATXN2<sub>481-815</sub> und SH3GL3. Die Interaktionen der Proteine wurden bereits von Ralser *et al.* 2004 und 2005b belegt. Bei ATXN2(Q22)<sub>1-396</sub> handelt es sich um die N-terminale Region des Proteins Ataxin-2, die das SBM1-Bindemotiv enthält, ATXN2<sub>481-815</sub> ist die Region, die das SBM2-Bindemotiv enthält.

Für den “Intrabody” Screen wurden L40 ade A-Hefezellen, welche neben Adenin- auch Tryptophan- und Leucin-auxotroph sind, zunächst mit “Bait”- und “Prey”-Plasmiden transformiert. Die Plasmide beinhalteten die DNA der Proteinregionen ATXN2<sub>816-1312</sub>, ATXN2<sub>481-815</sub>, ATXN2(Q22)<sub>1-396</sub>, sowie der Proteine PABC und SH3GL3, fusioniert mit LexA (“Bait”) oder Gal4AD (“Prey”). Die Hefezellen wurden wie unter 2.2.7 beschrieben transformiert, zur Selektion der “Bait”- (TRP1) und “Prey”-Plasmide (LEU2) auf SD-tl+hua-Agar ausplattiert und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Transformationsansätze setzten sich im Einzelnen wie in Tabelle 6 dargestellt zusammen. Für jede Transformation wurde zusätzlich eine Negativkontrolle (Transformation ohne Plasmid-DNA) durchgeführt.

Transformation	“Bait”	“Prey”
1	pBTM116 LexA-ATXN2 <sub>816-1312</sub>	pACT4-1b Gal4AD-PABC
2	pBTM117c LexA-ATXN2(Q22) <sub>1-396</sub>	pACT4-1b Gal4AD-SH3GL3
3	pBTM118c LexA-ATXN2 <sub>481-815</sub>	pACT4-1b Gal4AD-SH3GL3

**Tabelle 6: Ansätze für die Hefetransformation mit “Bait”- und “Prey”-Plasmiden.** Die Plasmide wurden von der AG Krobisch zur Verfügung gestellt.

Anschließend wurden von jedem Transformationsansatz Einzelklone isoliert und für die Transformation mit den Antikörper-Subbibliotheken, die zuvor in den Hefeexpressionsvektor pIB NLS Ade umklont worden waren (siehe 3.1.1), verwendet.

Die Transformation der Hefezellen wurde wie in Abschnitt 2.2.7 beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle dienten Transformationen mit der unselektierten Antikörperbibliothek (pIB NLS Ade naiv). Die einzelnen Ansätze sind in Tabelle 7 aufgeführt.

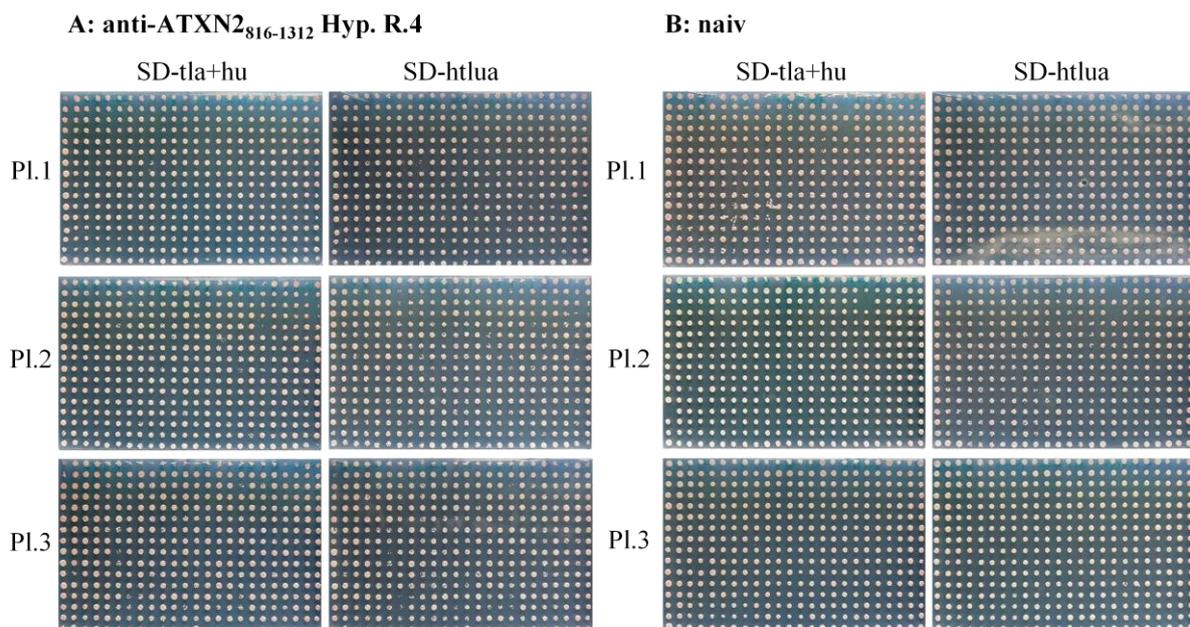
“Bait” + “Prey”	Transformation mit
LexA-ATXN2 <sub>816-1312</sub> + Gal4AD-PABC	pIB NLS Ade scFv anti-ATXN2 <sub>816-1312</sub> Hyp. R.4
LexA-ATXN2 <sub>816-1312</sub> + Gal4AD-PABC	pIB NLS Ade naiv
LexA-ATXN2(Q22) <sub>1-396</sub> + Gal4AD-SH3GL3	pIB NLS Ade scFv anti-SH3GL3 M13K07 R.4
LexA-ATXN2(Q22) <sub>1-396</sub> + Gal4AD-SH3GL3	pIB NLS Ade scFv anti-SH3GL3 Hyp. R.3
LexA-ATXN2(Q22) <sub>1-396</sub> + Gal4AD-SH3GL3	pIB NLS Ade scFv anti-SH3GL3 Hyp. R.4
LexA-ATXN2(Q22) <sub>1-396</sub> + Gal4AD-SH3GL3	pIB NLS Ade naiv
LexA-ATXN2 <sub>481-815</sub> + Gal4AD-SH3GL3	pIB NLS Ade scFv anti-SH3GL3 M13K07 R.4
LexA-ATXN2 <sub>481-815</sub> + Gal4AD-SH3GL3	pIB NLS Ade scFv anti-SH3GL3 Hyp. R.3
LexA-ATXN2 <sub>481-815</sub> + Gal4AD-SH3GL3	pIB NLS Ade scFv anti-SH3GL3 Hyp. R.4
LexA-ATXN2 <sub>481-815</sub> + Gal4AD-SH3GL3	pIB NLS Ade naiv

**Tabelle 7: Transformationsansätze für den “Intrabody” Screen**

Die transformierten Zellen wurden auf SD-tla+hu-Agarplatten ausplattiert, um auf das Vorhandensein der “Bait”- und “Prey”-Plasmide, sowie des Plasmids pIB NLS Ade zu selektieren und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

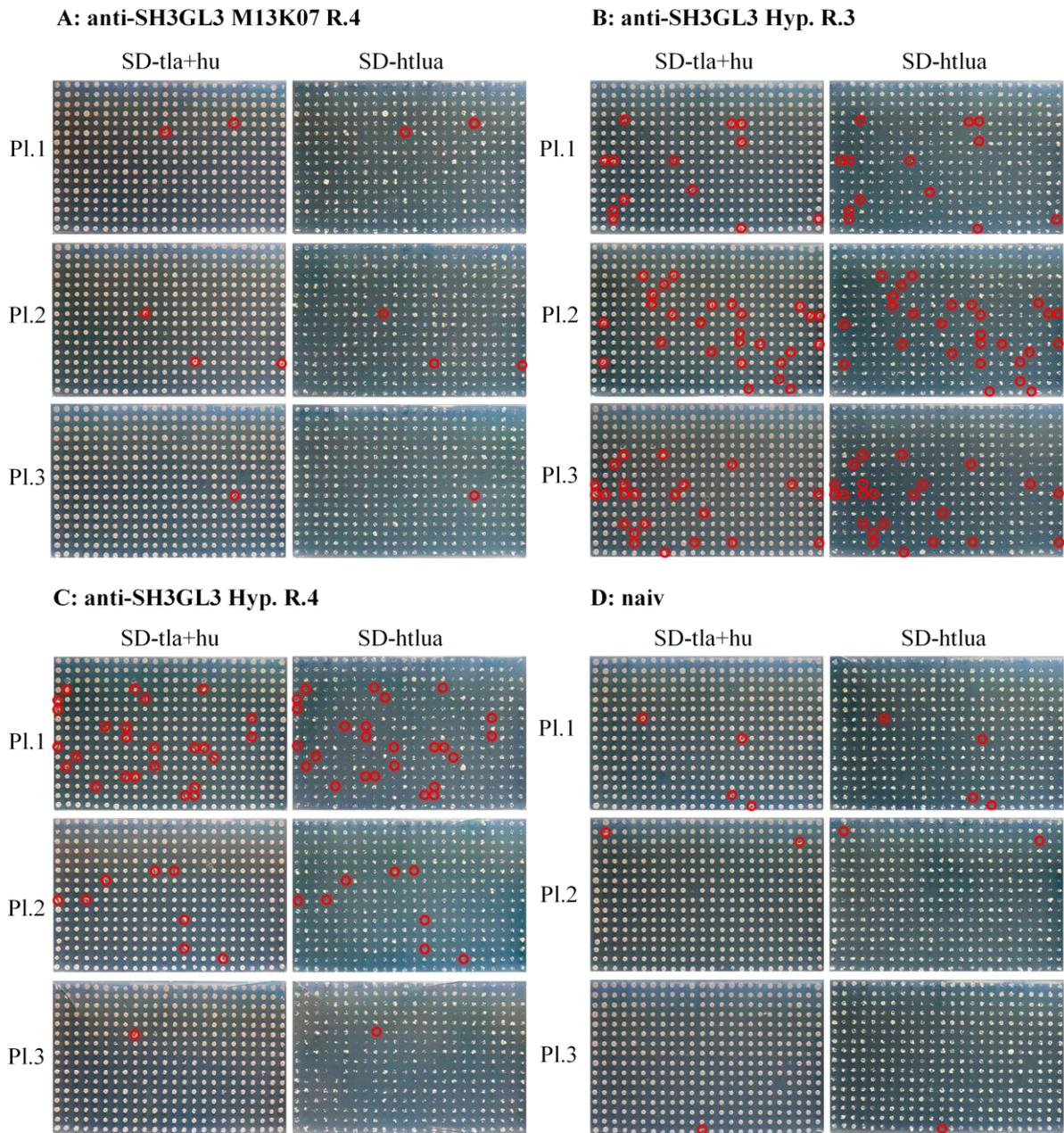
Danach wurden 3 x 384 Kolonien pro Agarplatte isoliert und in SD-tla+hu-Einfriermedium überführt. Nach 3 Tagen Inkubation bei 30 °C wurden die Hefen auf Agarplatten mit SD-tla+hu-Medium und SD-htlua-Medium ausgestempelt und für 4 Tage bei 30 °C kultiviert. Anschließend wurde das Wachstum der Zellen auf den Platten analysiert (Abbildungen 10, 11 und 12). Wird die Interaktion von “Bait”- und “Prey”-Proteinen durch scFv-Fragmente (“Intrabodies”) inhibiert, können die Reportergene *HIS3* und *URA3* nicht transkribiert werden, wodurch die Hefezellen nur auf SD-tla+hu-Medium wachsen können. Hefen, die keine inhibitorischen “Intrabodies” exprimieren, können hingegen auf beiden Selektionsmedien wachsen.

“Intrabody” Screen für die Interaktion von ATXN2<sub>816-1312</sub> und PABC



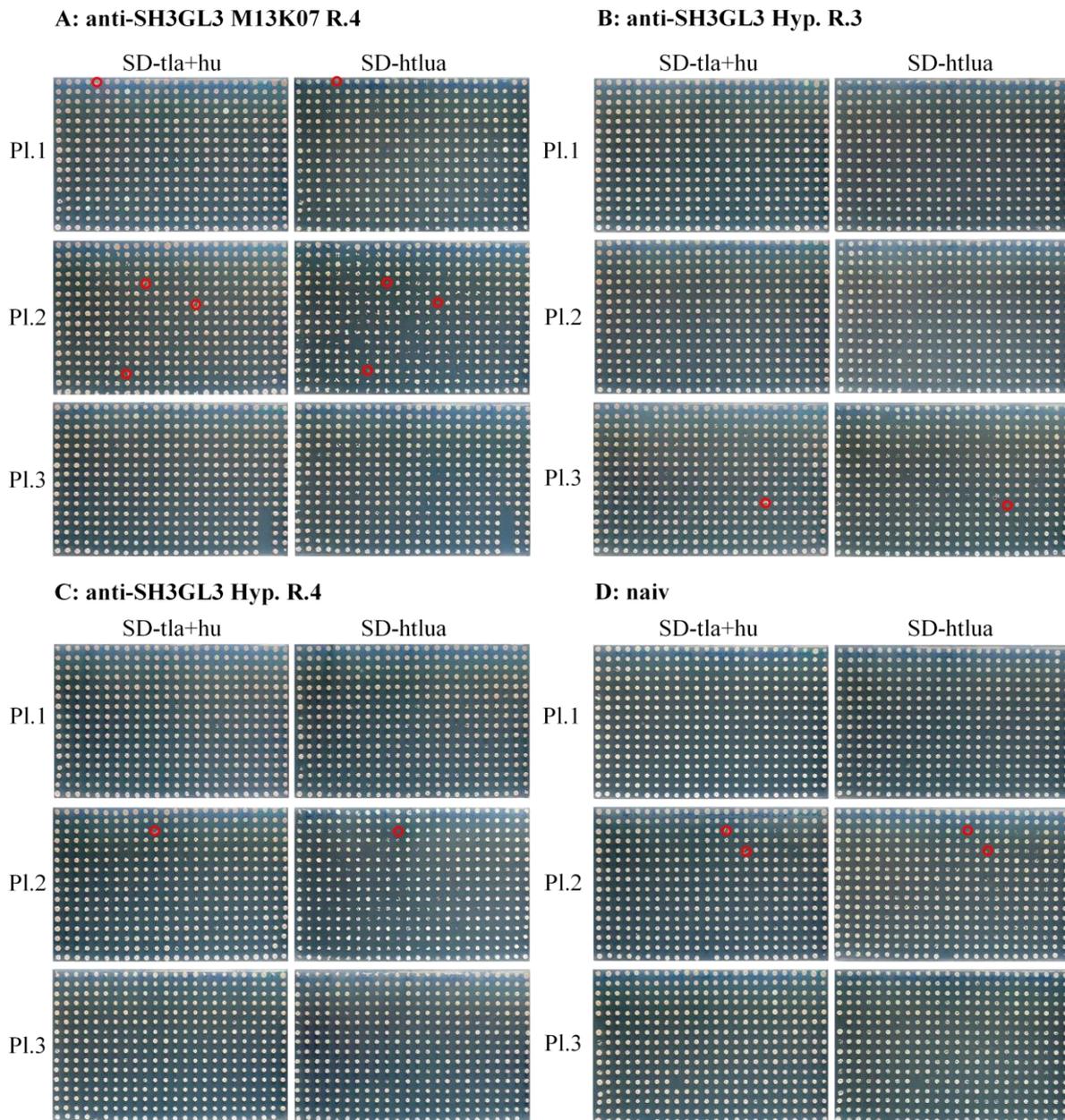
**Abbildung 10: “Intrabody” Screen für die Interaktion von ATXN2<sub>816-1312</sub> und PABC.** A: nach Transformation mit pIB NLS Ade scFv anti-ATXN2<sub>816-1312</sub> Hyp. R.4; B: nach Transformation mit pIB NLS Ade naiv. Für die Interaktion von ATXN2<sub>816-1312</sub> und PABC konnten keine potentiell inhibitorischen scFv-Fragmente identifiziert werden.

“Intrabody” Screen für die Interaktion von ATXN2(Q22)<sub>1-396</sub> und SH3GL3



**Abbildung 11: “Intrabody” Screen für die Interaktion von ATXN2(Q22)<sub>1-396</sub> und SH3GL3.** A: nach Transformation mit pIB NLS Ade scFv anti-SH3GL3 M13K07 R.4; B: nach Transformation mit pIB NLS Ade scFv anti-SH3GL3 Hyp. R.3; C: nach Transformation mit pIB NLS Ade scFv anti-SH3GL3 Hyp. R.4 D: nach Transformation mit pIB NLS Ade naiv; Hefen, die potentiell inhibitorische Antikörperfragmente trugen, wurden auf beiden Platten rot gekennzeichnet.

**“Intrabody” Screen für die Interaktion von ATXN2<sub>481-815</sub> und SH3GL3**



**Abbildung 12: “Intrabody” Screen für die Interaktion von ATXN2<sub>481-815</sub> und SH3GL3.** A: nach Transformation mit pIB NLS Ade scFv anti-SH3GL3 M13K07 R.4; B: nach Transformation mit pIB NLS Ade scFv anti-SH3GL3 Hyp. R.3; C: nach Transformation mit pIB NLS Ade scFv anti-SH3GL3 Hyp. R.4; D: nach Transformation mit pIB NLS Ade naiv; Hefen, die potentiell inhibitorische Antikörperfragmente trugen, wurden auf beiden Platten rot gekennzeichnet.

Da alle Hefekolonien auf beiden Selektionsmedien wuchsen, konnten für die Interaktion von ATXN2<sub>816-1312</sub> und PABC keine potentiell inhibitorischen Binder identifiziert werden. Für die Interaktionen von ATXN2(Q22)<sub>1-396</sub> mit SH3GL3 und ATXN2<sub>481-815</sub> mit SH3GL3 konnten hingegen 110 bzw. 8 Kolonien mit potentiell inhibitorischen “Intrabodies” identifiziert werden. Die einzelnen Ergebnisse des Screens sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Transformationen (“Bait”, “Prey” und Plasmid mit Antikörper-Subbibliothek)	Kolonien mit potentiell inhibitorischen “Intrabodies”
LexA-ATXN2 <sub>816-1312</sub> , Gal4AD-PABC und pIB NLS Ade scFv anti-ATXN2 <sub>816-1312</sub> Hyp. R.4	0
LexA-ATXN2 <sub>816-1312</sub> , Gal4AD-PABC und pIB NLS Ade naiv	0
LexA-ATXN2(Q22) <sub>1-396</sub> , Gal4AD-SH3GL3 und pIB NLS Ade scFv anti-SH3GL3 M13K07 R.4	6
LexA-ATXN2(Q22) <sub>1-396</sub> , Gal4AD-SH3GL3 und pIB NLS Ade scFv anti-SH3GL3 Hyp. R.3	63
LexA-ATXN2(Q22) <sub>1-396</sub> , Gal4AD-SH3GL3 und pIB NLS Ade scFv anti-SH3GL3 Hyp. R.4	34
LexA-ATXN2(Q22) <sub>1-396</sub> , Gal4AD-SH3GL3 und pIB NLS Ade naiv	7
LexA-ATXN2 <sub>481-815</sub> , Gal4AD-SH3GL3 und pIB NLS Ade scFv anti-SH3GL3 M13K07 R.4	4
LexA-ATXN2 <sub>481-815</sub> , Gal4AD-SH3GL3 und pIB NLS Ade scFv anti-SH3GL3 Hyp. R.3	1
LexA-ATXN2 <sub>481-815</sub> , Gal4AD-SH3GL3 und pIB NLS Ade scFv anti-SH3GL3 Hyp. R.4	1
LexA-ATXN2 <sub>481-815</sub> , Gal4AD-SH3GL3 und pIB NLS Ade naiv	2

**Tabelle 8:** Ergebnisse der “Intrabody” Screens

### 3.2 *in vitro* Identifizierung monoklonaler Binder (scFv-Fragmente)

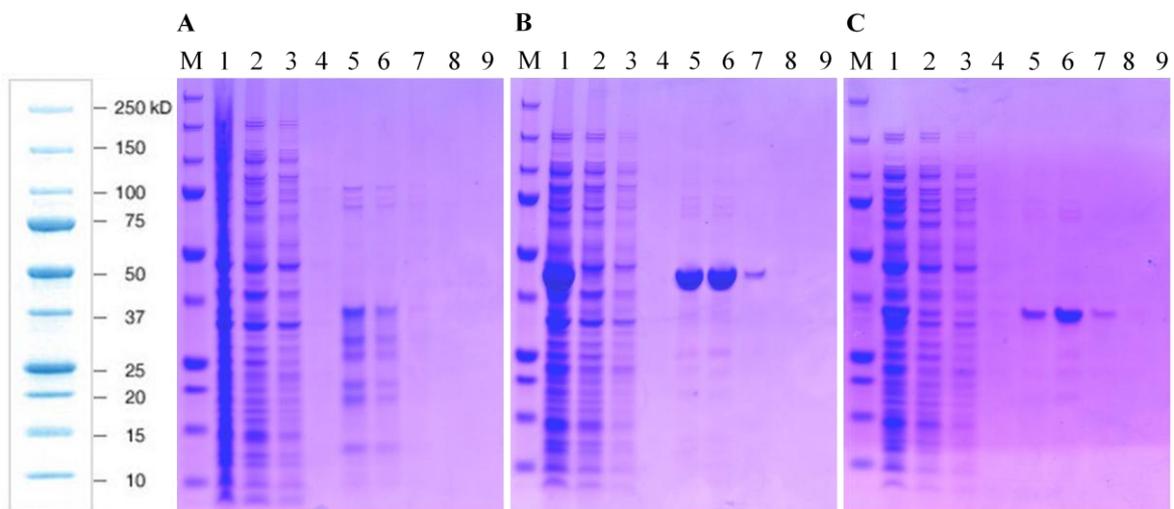
Neben der *in vivo* Identifizierung potentiell inhibitorischer Antikörperfragmente in einem “Intrabody” Screen wurden monoklonale Antikörperfragmente aus den einzelnen Selektionsrunden (Subbibliotheken) *in vitro* auf ihre Antigenbindung getestet. Für die Identifikation monoklonaler Binder wurde die Bindung der Antikörper an das jeweilige Antigen in ELISA und Western Immunoblot untersucht.

#### 3.2.1 Antigengewinnung für ELISA und Western Immunoblot

Für die *in vitro* Identifizierung monoklonaler Binder wurden zunächst die Antigene ATXN2<sub>816-1312</sub>, SH3GL3 und eGFP für ELISA und Western Immunoblot mittels Proteinexpression in *E. coli* rekombinant hergestellt und aufgereinigt.

Als erstes wurde der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) Star, der bereits das Helferplasmid pRARE3 trug, mit dem Plasmid pRSET-BH6 transformiert, das die DNA von ATXN2<sub>816-1312</sub>, SH3GL3 oder eGFP enthält. Durch Verwendung des Plasmids pRSET-BH6 werden die Antigene mit

N-terminalem His6- und Avi-“Tag” exprimiert. Die Transformation der *E. coli*-Zellen wurde, wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben, durchgeführt und die Zellen danach auf 2xYT-Agarplatten mit Amp und Glu ausplattiert. Nach ü. N.-Inkubation bei 37 °C wurden die Kolonien von den Platten abgeschwemmt, Flüssigkulturen angeimpft und die Expression der Proteine durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1mM) induziert. Anschließend wurden die Proteine über den vorhandenen His6-“Tag” mittels IMAC aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.4.1). Die Aufreinigung der Proteine wurde mit einer SDS-PAGE (Coomassie-gefärbt) überprüft (Abbildung 13). Neben den Elutionsfraktionen wurden aus der Aufreinigung auch der Überstand mit allen exprimierten Proteinen, sowie der Säulendurchfluss und die Waschfraktionen auf die Gele aufgetragen.



**Abbildung 13: Überprüfung der Aufreinigung der Proteine ATXN2<sub>816-1312</sub> (A), SH3GL3 (B) und eGFP (C).** M: Protein-Standard; 1: Überstand; 2: Säulendurchfluss; 3: Waschfraktion 1; 4: Waschfraktion 2; 5-9: Elutionen 1-5.

Die Proteinregion ATXN2<sub>816-1312</sub> und die Proteine SH3GL3 und eGFP besitzen Größen von 56 kDa, 40 kDa und 32 kDa. SH3GL3 und eGFP konnten erfolgreich aufgereinigt werden, da in den Elutionen 1-3 Banden mit der gewünschten Größe von 40 bzw. 32 kDa zu sehen waren. Daneben waren in den Elutionen 1 und 2 einige schwache Banden bei 20-25 kDa und 75 kDa zu sehen, die von Verunreinigungen durch *E. coli*-Proteine stammten. Bei ATXN2<sub>816-1312</sub> war keine Bande im Bereich von 56 kDa zu sehen, sondern mehrere Banden zwischen 13 und 35 kDa. ATXN2<sub>816-1312</sub> konnte folglich nicht als vollständige Proteinregion aufgereinigt werden. Neben den Banden zwischen 13 und 35 kDa waren noch weitere schwache Banden bei 75 kDa sichtbar, die wieder von Verunreinigungen durch *E. coli*-Proteinen hervorgerufen wurden. In den Elutionen 4 und 5 waren bei allen Proteinen keine

Banden erkennbar. Die Konzentration der Proteine in den einzelnen Elutionen wurde mittels Pierce 660 nm Assay Kit bestimmt.

Da ATXN2<sub>816-1312</sub> nicht vollständig aufgereinigt werden konnte, wurde die für die Antigengewinnung verwendete DNA sequenziert, um eventuelle Stoppcodons in der Sequenz zu untersuchen, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Transkription und so zu kleineren Fragmenten führen könnten. Die Auswertung der Sequenz ergab keine vorzeitigen Stopps. Des Weiteren wurde die Stabilität von ATXN2<sub>816-1312</sub> mit Hilfe des Webtools ProtParam ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)) bioinformatisch analysiert, da es sich bei den Banden auch um Abbauprodukte handeln könnte. Dabei stellte sich das Protein als instabil heraus. Außerdem wurde das 28 kDa Fragment im Vorfeld der Arbeit massenspektrometrisch analysiert und als ATXN2<sub>816-1312</sub>-Fragment identifiziert.

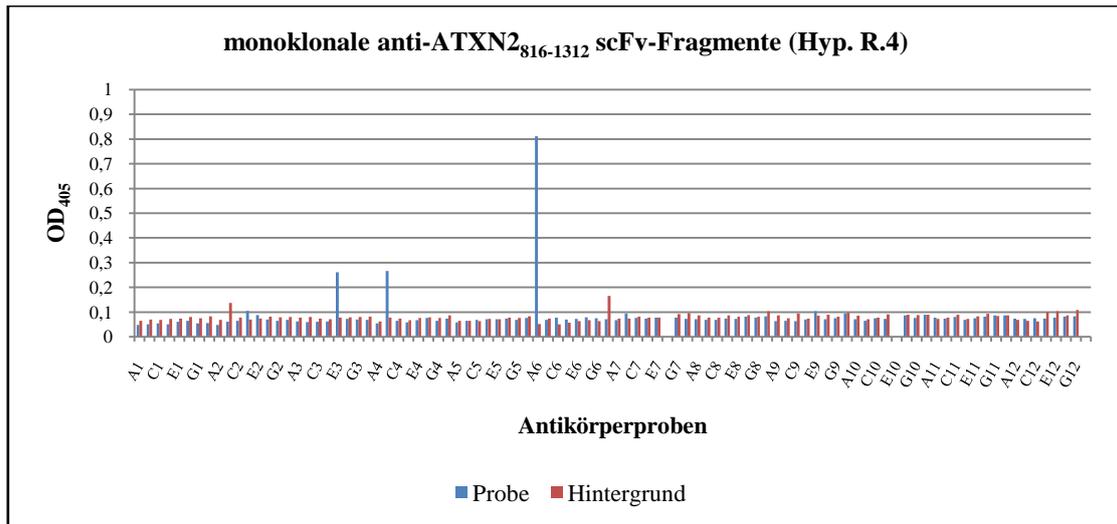
Da alle Analysen darauf hinwiesen, dass es sich bei den Banden um Abbauprodukte von ATXN2<sub>816-1312</sub> handelte, wurde neben SH3GL3 und eGFP auch die aufgereinigten ATXN2<sub>816-1312</sub>-Fragmente für die weiteren Versuche verwendet.

### 3.2.2 Gewinnung von monoklonalen scFv-Fragmenten für ELISA und Western Immunoblot

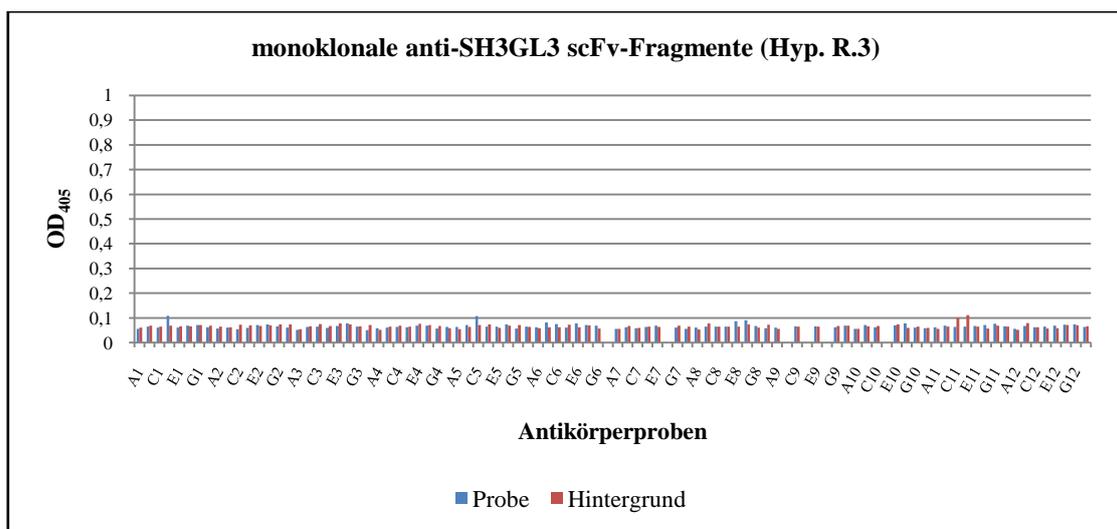
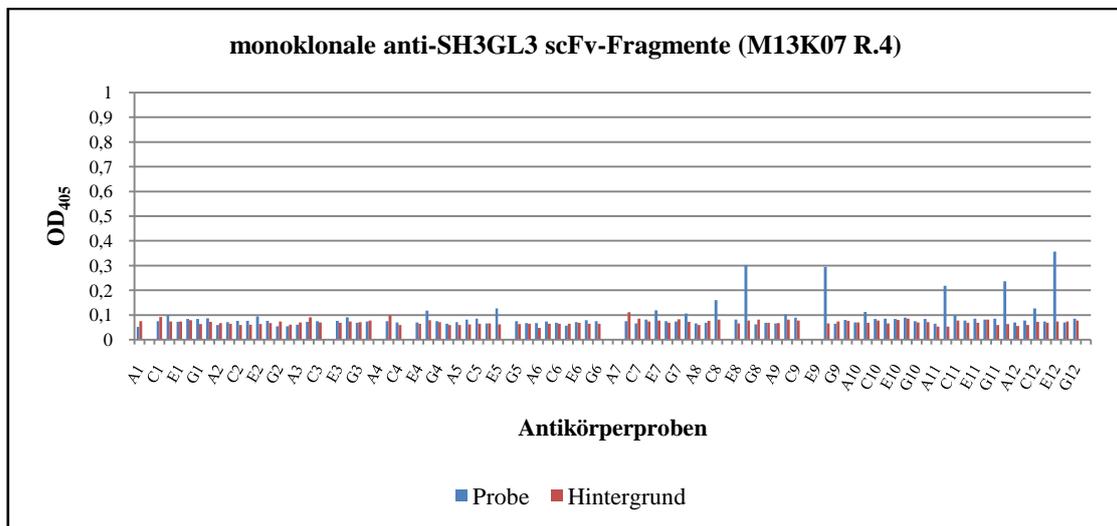
Für ELISA und Western Immunoblot wurden monoklonale Antikörperfragmente aus den einzelnen Selektionsrunden (siehe 3.1.1) gewonnen. Ausgangspunkt für diesen Schritt waren die Phagen aus den einzelnen Selektionsrunden, die die Antikörper-DNA-Fragmente auf dem Phagmid pIT2 trugen und das scFv-Fragment auf ihrer Oberfläche präsentierten. Mit diesen Phagen wurden HB2151 *E. coli*-Zellen infiziert und die Zellen auf 2xYT-Agarplatten mit Amp und Glu ausplattiert. Pro Selektion wurden 92 Kolonien isoliert und Flüssigkulturen angeimpft. Anschließend wurde die Expression der scFv-Fragmente durch Zugabe von IPTG zu den Kulturen induziert und die scFvs aus dem Periplasma der *E. coli*-Zellen präpariert.

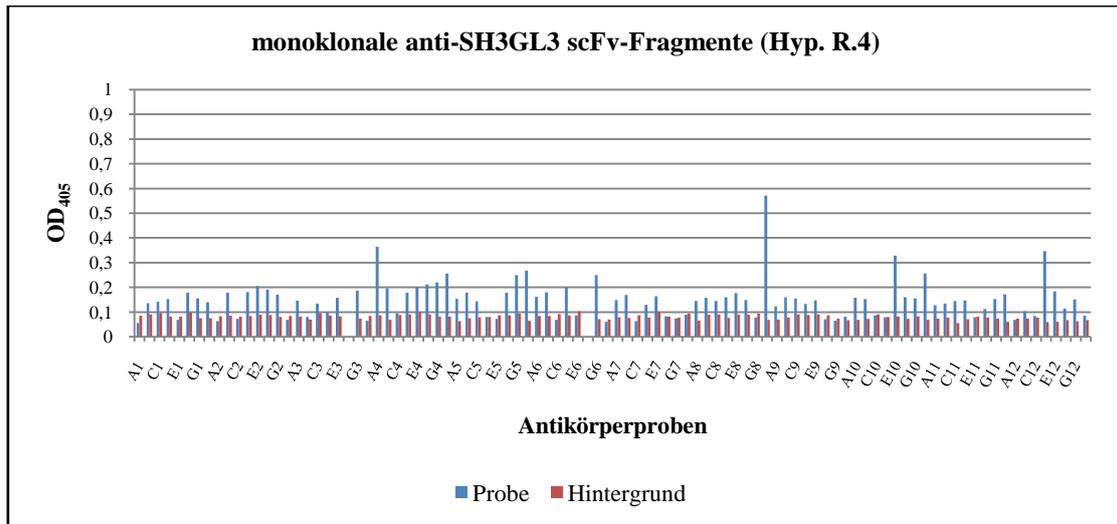
### 3.2.3 ELISA zur Identifizierung monoklonaler Binder

Mit den zuvor hergestellten Antigenen ATXN2<sub>816-1312</sub>, SH3GL3 und eGFP und den scFv-Fragmenten wurden ELISAs zur Identifizierung monoklonaler Binder durchgeführt (Abbildungen 14, 15 und 16). Die Durchführung der ELISAs erfolgte wie unter 2.4.4 beschrieben. Um den Hintergrund für jede Probe bestimmen zu können, wurde immer nur die Hälfte der ELISA-Platten mit dem jeweiligen Antigen inkubiert, die andere Hälfte wurde mit 2 % PTM abgesättigt. Der Nachweis gebundener Antikörperfragmente erfolgte mit Protein L-HRP und ELISA-Substrat.

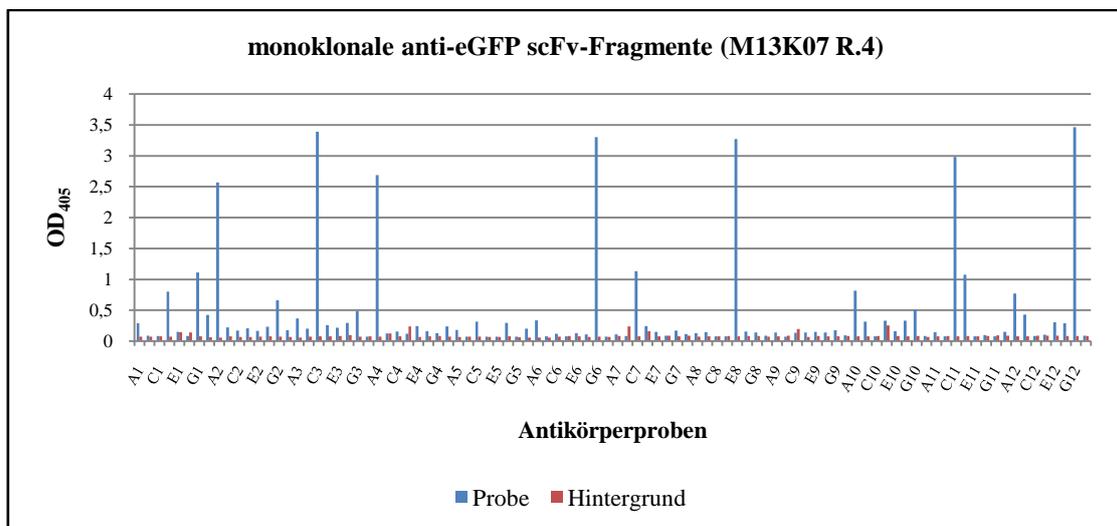
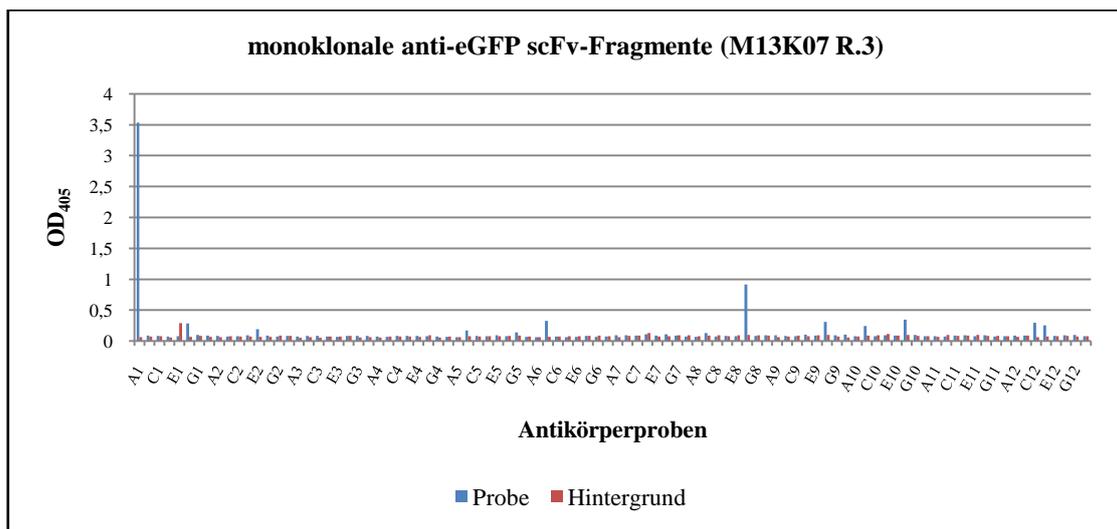


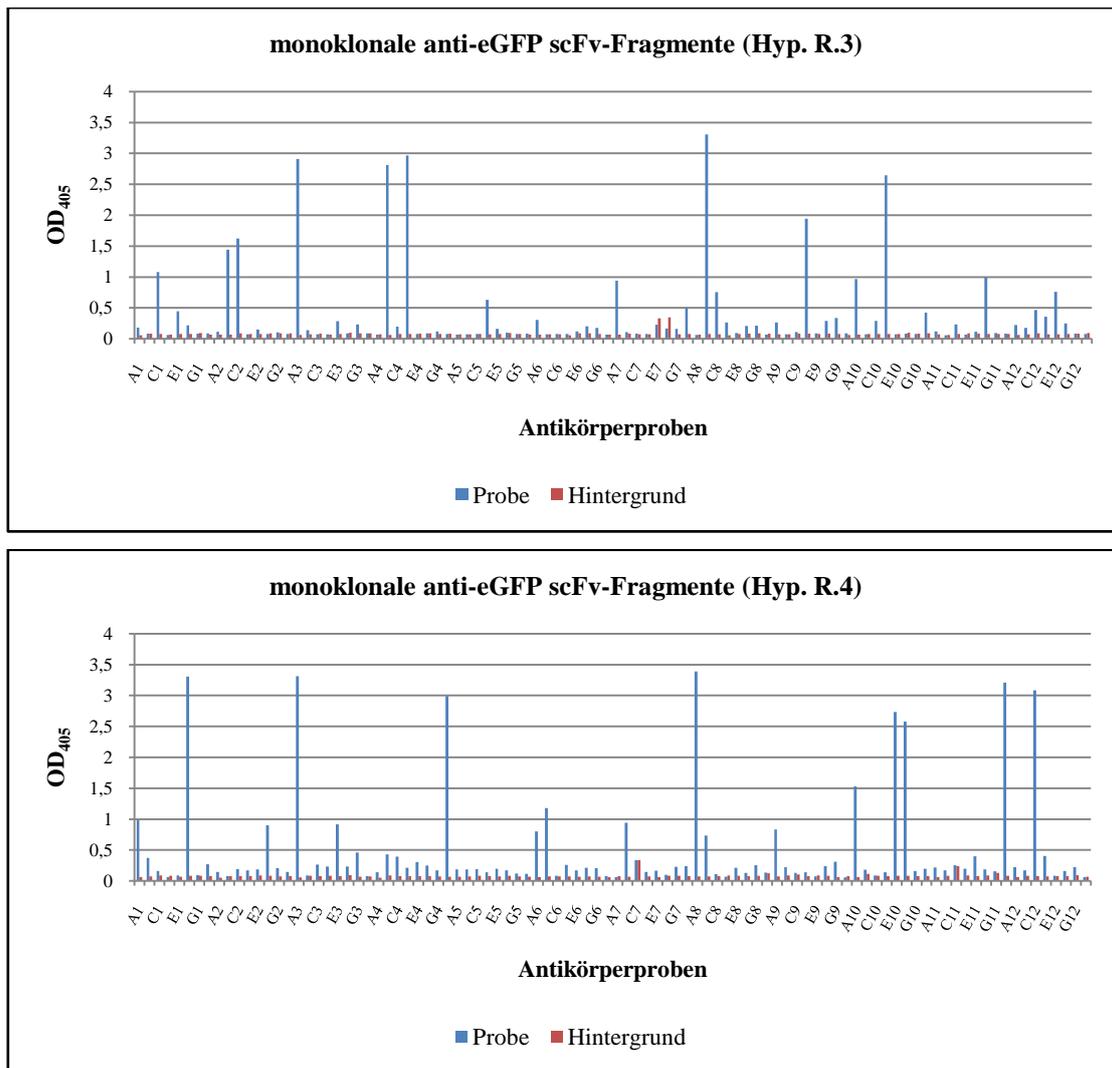
**Abbildung 14: ELISAs zur *in vitro* Identifikation monoklonaler Antikörperfragmente für ATXN2<sub>816-1312</sub>.** Die Proben F7, E10 und H12 wurden für die weiteren Untersuchungen nicht verwendet, da sich Luftblasen in den Wells befanden.





**Abbildung 15: ELISAs zur *in vitro* Identifizierung monoklonaler scFv-Fragmente für SH3GL3.** Die Proben B1, D3, A4, D4, F5, H6, A7, D8, D9, E9 und H12 aus der Selektion anti-SH3GL3 M13K07 R.4 und die Proben H6, F7, B9, D9, F9 und D10 aus Selektion anti-SH3GL3 Hyp. R.3 wurden aufgrund von Luftblasen in den Wells nicht für weitere Untersuchungen verwendet, ebenso die Proben F3 und F6 aus Selektion anti-SH3GL3 M13K07 R.4.





**Abbildung 16: ELISAs zur *in vitro* Identifikation monoklonaler Antikörperfragmente für eGFP.**

Alle getesteten Antikörperfragmente, deren Signal im ELISA 3-fach höher war, als der Hintergrund wurden als positiv (Binder) bewertet. Für ATXN2<sub>816-1312</sub> konnten im ELISA drei monoklonale Binder identifiziert werden. Für SH3GL3 und eGFP ergaben sich 14 bzw. 108 Binder, wobei der größte Teil in Runde 4 der Selektionen auftrat, die initial mit Hyperphagen durchgeführt wurden.

### 3.2.4 Western Immunoblot ausgewählter monoklonaler Binder

Im Anschluss an die ELISAs wurde ein Western Immunoblot durchgeführt, um zu überprüfen, ob die im ELISA identifizierten Binder auch hier ihr Antigen binden. Die aufgereinigten Antigene ATXN2<sub>816-1312</sub>, SH3GL3 und eGFP wurden dazu nochmals in einer SDS-PAGE aufgetrennt und dann mittels Elektrottransfer auf eine Membran übertragen. Anschließend erfolgte die Immunfärbung der Blots (siehe Abschnitt 2.4.7). Die Membranen wurden dazu in Streifen geschnitten und mit den 3 bzw. 14 im ELISA identifizierten scFv-

Fragmenten für ATXN2<sub>816-1312</sub> und SH3GL3, sowie 45 der Binder für eGFP inkubiert. Als Negativkontrolle wurden zwei Nichtbinder für jedes Target verwendet. Der Nachweis der Antikörper erfolgte mit Protein L-HRP und CN/DAB.

Auf den Membranstreifen waren nach der Entwicklung keine Banden zu sehen. Die Bindung der Antikörperfragmente an ihr Target konnte im Western Immunoblot folglich nicht nachgewiesen werden. Um nachzuweisen, dass die Antigene aber auf die Membran transferiert worden waren, wurden einige Membranstreifen mit Streptavidin-HRP, das an den biotinylierten Avi-“Tag” der Antigene bindet, inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit CN/DAB. Durch die Streptavidin-HRP-Färbung konnten die Antigene auf den Membranstreifen nachgewiesen werden.

### 3.2.5 DNA-Sequenzierung ausgewählter monoklonaler Binder

Die DNA der im Western Immunoblot überprüften scFv-Fragmente wurde im Anschluss sequenziert (Tabelle 9). In den Subbibliotheken konnten insgesamt drei unterschiedliche monoklonale Binder für ATXN2<sub>816-1312</sub>, 4 für SH3GL3 und 15 für eGFP identifiziert werden. Zum Teil wurden gleiche anti-eGFP scFvs in unterschiedlichen Selektionsrunden isoliert. Die Sequenzen der Kontrollen unterschieden sich immer von denen der Binder.

Originalsequenz	variable Region der schweren Kette			variable Region der leichten Kette		
	SYAMS	CDR1	CDR3 (As 95-101)	CDR1	CDR2 (As 50-56)	CDR3 (As 89-97)
Selektion	SYAMS	AISGSGGTYTAYADSVKVG	-----FDY	RASQSISSYLN	AASLIQS	QQSYSTPPT
anti-ATXN2 <sub>nlc-132</sub> Hyp. R. 4 E3	SYAMS	NISSYGFSCYADSVKVG	TYTTFDY	RASQSISSYLN	NASYLIQS	QQYATPFPAT
anti-ATXN2 <sub>nlc-132</sub> Hyp. R. 4 B4	SYAMS	SIDDSGGTYTAYADSVKVG	ATYGFY	RASQSISSYLN	AASLIQS	QQYNAYPPT
anti-ATXN2 <sub>nlc-132</sub> Hyp. R. 4 A6	SYAMS	SISGTCGATYADSVKVG	TYTTFDY	RASQSISSYLN	GASLIQS	QQYASYPPT
anti-ATXN2 <sub>nlc-132</sub> Hyp. R. 4 C5	SYAMS	SINDGGTATYADSVKVG	YISAFDY	RASQSISSYLN	SASTLIQS	QQSTDSFYT
anti-SH3GL3 M13K07 R. 4 F9	SYAMS	DIWASGSSYADSVKVG	GYAAFDY	RASQSISSYLN	AASLIQS	QQTAANPPT
anti-SH3GL3 M13K07 R. 4 E12	SYAMS	SIWAASGTYTAYADSVKVG	AAKTFDY	RASQSISSYLN	NASLIQS	QQXXSYPT
anti-SH3GL3 M13K07 R. 4 B11; H11	SYAMS	SINYGSTYADSVKVG	GAGNFDY	RASQSISSYLN	SASLIQS	QQSAASPDT
anti-SH3GL3 M13K07 R. 4 H4	SYAMS	SINTDGSSTYADSVKVG	TASGFDY	RASQSISSYLN	SASLIQS	QQNAYTPT
anti-SH3GL3 Hyp. R. 4 A4; D12; E10; G5, G6, H4; H5; H8; H10	SYAMS	SINYSSTYADSVKVG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	SASLIQS	QQSASYPAT
anti-eGFP M13K07 R. 3 F8	SYAMS	AIISYGNATYADSVKVG	SYDPFDY	RASQSISSYLN	YASLIQS	QQSYTTPPT
anti-eGFP M13K07 R. 3 C12	SYAMS	CIYATGTYTAYADSVKVG	TSDFDY	RASQSISSYLN	NASLIQS	QQTASYPPT
anti-eGFP M13K07 R. 3 A1	SYAMS	DINYSNMSTYADSVKVG	SSGAFDY	RASQSISSYLN	YASLIQS	QQYFSGPPT
anti-eGFP M13K07 R. 3 F10	SYAMS	YITNGTGYTAYADSVKVG	ASDYFDY	RASQSISSYLN	YASLIQS	QQSAMAPDT
anti-eGFP M13K07 R. 4 E8; G6; G12	SYAMS	DINYSNMSTYADSVKVG	SSGAFDY	RASQSISSYLN	YASLIQS	QQYFSGPPT
anti-eGFP M13K07 R. 4 A3; B12	SYAMS	GISSGGASTYADSVKVG	YNTYFDY	RASQSISSYLN	YASLIQS	QQAGNDFPT
anti-eGFP M13K07 R. 4 A6	SYAMS	TIYSTGDSYADSVKVG	GAGGFDY	RASQSISSYLN	AASLIQS	QQYDTAPAT
anti-eGFP M13K07 R. 4 C3	SYAMS	XINYSNMSTYADSVKVG	SSGAFDY	RASQSISSYLN	YASLIQS	QQYFSGPPT
anti-eGFP M13K07 R. 4 A1; G10; H1	SYAMS	YIGSTGNSTYADSVKVG	DSSSFDY	RASQSISSYLN	YASLIQS	QQAYNGPPT
anti-eGFP M13K07 R. 4 C11	SYAMS	YINASGTYTAYADSVKVG	DTDAFDY	RASQSISSYLN	YASLIQS	QQGTSNPPT
anti-eGFP M13K07 R. 4 C5	SYAMS	YITNGTGYTAYADSVKVG	STDPFDY	RASQSISSYLN	YASLIQS	QQGYASPDT
anti-eGFP Hyp. R. 3 G9	SYAMS	A1ADSGGTYTAYADSVKVG	YSDFDY	RASQSISSYLN	YASLIQS	QQGXTAPST
anti-eGFP Hyp. R. 3 D5; E12	SYAMS	AIISYGNATYADSVKVG	SYDPFDY	RASQSISSYLN	YASLIQS	QQSYTTPPT
anti-eGFP Hyp. R. 3 H10	SYAMS	DINYSNMSTYADSVKVG	SSGAFDY	RASQSISSYLN	YASLIQS	QQYFSGPPT
anti-eGFP Hyp. R. 3 C12	SYAMS	DISSDGGTAYADSVKVG	TNSYFDY	RASQSISSYLN	GASLIQS	QQKSYYPAT
anti-eGFP Hyp. R. 3 E1; E3; E12; H7	SYAMS	GISSGGASTYADSVKVG	YNTYFDY	RASQSISSYLN	YASLIQS	QQAGNDFPT
anti-eGFP Hyp. R. 3 D9	SYAMS	TINANGAYTAYADSVKVG	SYSSFDY	RASQSISSYLN	GASLIQS	QQKSYYPAT
anti-eGFP Hyp. R. 3 D10	SYAMS	TISSNGGTYTAYADSVKVG	AYSADFY	RASQSISSYLN	GASLIQS	QQSNSGTFG
anti-eGFP Hyp. R. 3 D4	SYAMS	YISGTYTAYADSVKVG	DTNYFDY	RASQSISSYLN	YASLIQS	QQTAAGPST
anti-eGFP Hyp. R. 4 E4; G9	SYAMS	A1ADSGGTYTAYADSVKVG	YSDFDY	RASQSISSYLN	YASLIQS	QQGXTAPST
anti-eGFP Hyp. R. 4 C4; G8	SYAMS	GISSGGASTYADSVKVG	YNTYFDY	RASQSISSYLN	YASLIQS	QQAGNDFPT
anti-eGFP Hyp. R. 4 A10; B6	SYAMS	TINANGAYTAYADSVKVG	SYSSFDY	RASQSISSYLN	GASLIQS	QQKSYYPAT
anti-eGFP Hyp. R. 4 F10	SYAMS	TISSNGGTYTAYADSVKVG	AYSADFY	RASQSISSYLN	GASLIQS	QQSNSGTFG
anti-eGFP Hyp. R. 4 C8	SYAMS	TIYSTGDSYADSVKVG	SYDYFDY	RASQSISSYLN	YASLIQS	QQSYNGPDT
anti-eGFP Hyp. R. 4 B1; E4; E11	SYAMS	YIGSTGNSTYADSVKVG	DSSSFDY	RASQSISSYLN	YASLIQS	QQAYNGPPT
anti-eGFP Hyp. R. 4 F1	SYAMS	YINASGTYTAYADSVKVG	DTDAFDY	RASQSISSYLN	YASLIQS	QQGTSNPPT
anti-eGFP Hyp. R. 4 C12	SYAMS	YISGTYTAYADSVKVG	DTNYFDY	RASQSISSYLN	YASLIQS	QQTAAGPST

**Tabelle 9: Ergebnisse der Sequenzierung der scFv-Fragmente.** Die Abbildung zeigt eine Auflistung der CDRs der sequenzierten scFv-DNA-Fragmente, da sich diese nur in den CDR-Regionen voneinander unterscheiden. Gleiche Sequenzen von scFv-Fragmenten aus unterschiedlichen Selektionsrunden (Subbibliotheken) sind farblich gleich gekennzeichnet. Sequenzen, die nicht in unterschiedlichen Selektionsrunden auftreten, sind nicht farblich hinterlegt. Die Sequenzen von Nichtbindern sind als Kontrolle gekennzeichnet.

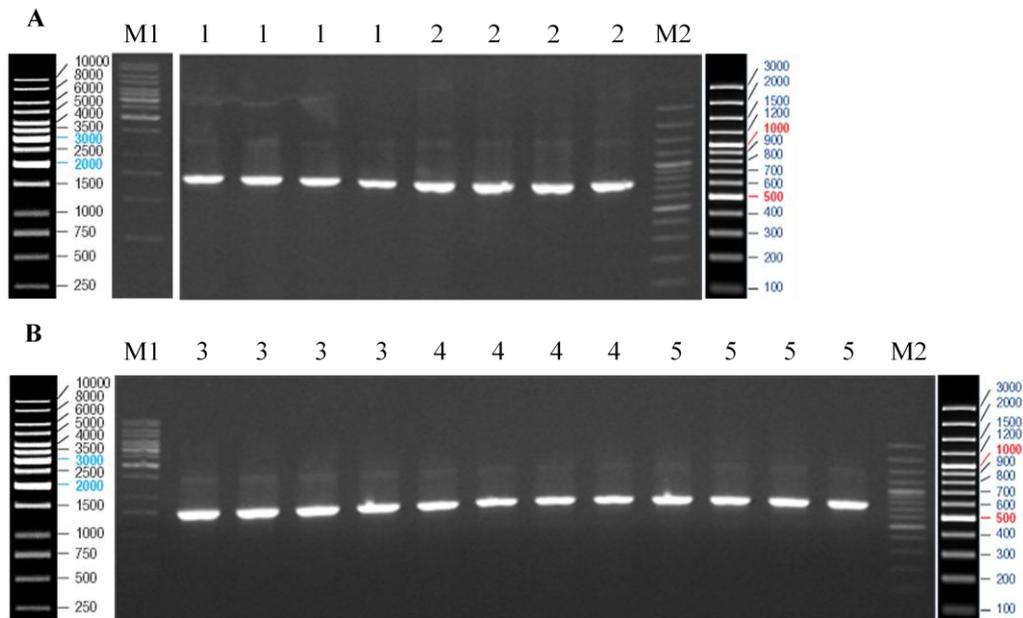
### 3.3 *in vivo* Expressionsstudien ausgewählter scFv-Fragmente in Säugetierzellen

Die drei *in vitro* identifizierten Binder für ATXN2<sub>816-1312</sub> sollten *in vivo* exprimiert und auf ihre Bindung an Ataxin-2 getestet werden. Die DNA der Antikörperfragmente wurde zunächst für die Transfektion und Expression in Säugerzellen umklont. Anschließend wurden HEK 293T- und HeLa-Zellen mit den Konstrukten transfiziert. Die Expression und Lokalisation der Antikörper wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert.

#### 3.3.1 Subklonierung von Antikörperfragmenten in einen Expressionsvektor für Säugetierzellen

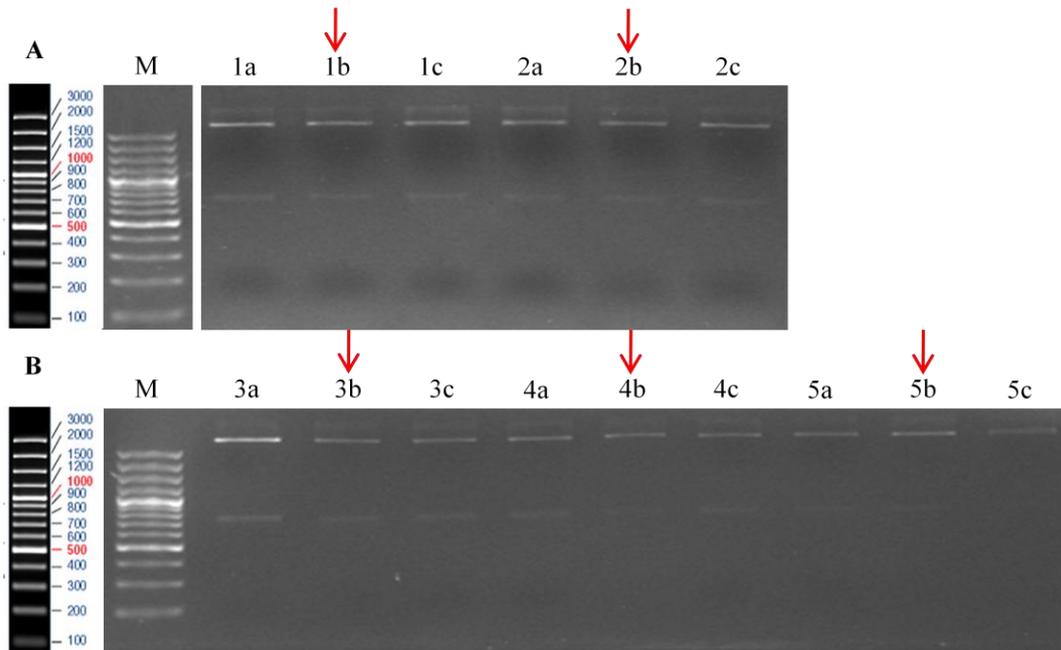
Ausgehend von den ELISA-Ergebnissen und den Sequenzanalysen wurde die DNA der drei Binder für ATXN2<sub>816-1312</sub> und zweier Binder für eGFP, die als Kontrolle dienten, in das Plasmid pFLAG CMV 5a ccdB umklont. Das Plasmid enthält unter anderem die Sequenzen eines His6- und eines FLAG-“Tags”, die sich bei der Expression C-terminal am Protein befinden. Im Einzelnen wurde die DNA folgender Antikörperfragmente umklont: scFv E3, B4 und A6 aus der Selektionsrunde anti-ATXN2<sub>816-1312</sub> Hyp. R.4, sowie scFv F1 und C12 aus der Selektionsrunde anti-eGFP Hyp. R.4.

Für die Subklonierung wurden zunächst Flüssigkulturen der ausgewählten HB2151 *E. coli*-Klone angeimpft und die Plasmid-DNA aus den Zellen isoliert. Im Anschluss wurde eine PCR mit den Primern 5' \_scFv\_HindIII\_ pFLAG und 3' scFv\_pFLAG durchgeführt, um eine *HindIII*-Schnittstelle an das 5'Ende der scFv-DNA anzufügen. Die PCR wurde mit Hilfe eines Agarosegels überprüft (Abbildung 17).



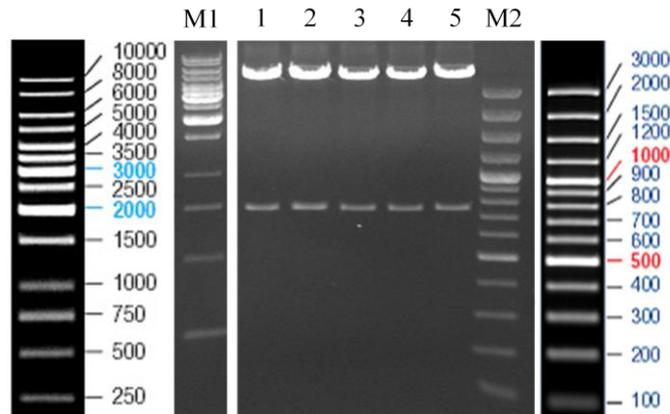
**Abbildung 17: Kontrolle der PCR zum Anfügen einer *Hind*III-Schnittstelle an scFv-DNA-Fragmente.** M1: 1 kb DNA Leiter; M2: 100 bp Plus DNA Leiter; 1: scFv E3 anti-ATXN2<sub>816-1312</sub>Hyp. R.4; 2: scFv B4 anti-ATXN2<sub>816-1312</sub>Hyp. R.4; 3: scFv A6 anti-ATXN2<sub>816-1312</sub>Hyp. R.4; 4: scFv F1 anti-eGFP Hyp. R.4; 5: scFv C12 anti-eGFP Hyp. R.4; Die Proben wurden mehrfach auf die Gele aufgetragen, da sie im Anschluss mittels Gelextraktion aufgereinigt wurden.

Bei allen Proben war eine Bande bei ca. 750 bp zu sehen, die den amplifizierten scFv-DNA-Fragmenten entsprach und die anschließend gelextrahiert wurde. Danach wurde die DNA der scFv-Fragmente und das Plasmid pFLAG CMV 5a ccdB mit den Restriktionsendonucleasen *Hind*III und *Not*I geschnitten. Die ccdB-Kassette im Plasmid ermöglicht eine bessere Kontrolle der Restriktion, da sie dabei aus dem Plasmid entfernt wird und auf einem Agarosegel als einzelne Bande erkennbar ist. Nach der Aufreinigung der DNA wurden die scFv-Fragmente mit den linearisierten Plasmid pFLAG CMV 5a ccdB ligiert, mittels Elektrottransformation in DH10B *E. coli*-Zellen transformiert und die Transformationsansätze anschließend auf 2xYT-Agarplatten mit Amp und Glu ausplattiert. Auf den Platten wuchsen zwischen 60 und 170 Kolonien, die Platte mit der Religationskontrolle (leeres Plasmid), die ebenfalls durchgeführt wurde, blieb hingegen leer. Um die Ligation zu überprüfen und einzelne Kolonien zu identifizieren, die das Plasmid mit einem scFv-Fragment enthielten, wurden pro Platte 3 Kolonien isoliert, Flüssigkulturen angeimpft und die Plasmid-DNA aus den Zellen präpariert. Die DNA wurde anschließend mit *Hind*III und *Not*I geschnitten und die Restriktion auf einem Agarosegel überprüft (Abbildung 18A und B).



**Abbildung 18: Restriktion der Plasmid-DNA verschiedener *E. coli*-Kolonien nach der Transformation.** Pro Transformationsansatz wurden 3 Kolonien isoliert (a,b,c) und die Plasmid-DNA mit *Hind*III und *Not*I verdaut. M: 100 bp Plus DNA Leiter; 1: pFLAG CMV 5a scFv E3 anti-ATXN2<sub>816-1312</sub> Hyp. R.4; 2: pFLAG CMV 5a scFv B4 anti-ATXN2<sub>816-1312</sub> Hyp. R.4; 3: pFLAG CMV 5a scFv A6 anti-ATXN2<sub>816-1312</sub> Hyp. R.4; 4: pFLAG CMV 5a scFv F1 anti-eGFP Hyp. R.4; 5: pFLAG CMV 5a scFv C12 anti-eGFP Hyp. R.4; Klon b jeder Transformation wurde für die Weiterarbeit ausgewählt (Pfeil).

Bei der Restriktion wurden zwei Banden in Höhe von 750 bp und 4644 bp erwartet. Die kleinere Bande entspricht dem herausgeschnittenen scFv-Fragment und die größere dem Plasmid. Beide Banden waren bei allen Restriktionsansätzen zu sehen. Zusätzlich zeigten einige Proben noch eine 3. Bande bei ca. 5500 bp, was dem Plasmid mit Insert (5394 bp) entspricht. Jeweils einer der drei Klone aus jedem Transformationsansatz wurde für die Weiterarbeit verwendet. Da die Banden auf den Gelen nur sehr schwach waren, wurde die Plasmid-DNA der ausgewählten Klone nochmals mit *Hind*III und *Not*I verdaut, um sicher positive Klone weiter zu verwenden (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Restriktion der Plasmid-DNA ausgewählter Klone.** M1: 1kb DNA Leiter; M2: 100 bp Plus DNA Leiter; 1: pFLAG CMV 5a scFv E3 anti-ATXN2<sub>816-1312</sub> Hyp. R.4; 2: pFLAG CMV 5a scFv B4 anti-ATXN2<sub>816-1312</sub> Hyp. R.4; 3: pFLAG CMV 5a scFv A6 anti-ATXN2<sub>816-1312</sub> Hyp. R.4 4: pFLAG CMV 5a scFv F1 anti-eGFP Hyp. R.4; 5: pFLAG CMV 5a scFv C12 anti-eGFP Hyp. R.4.

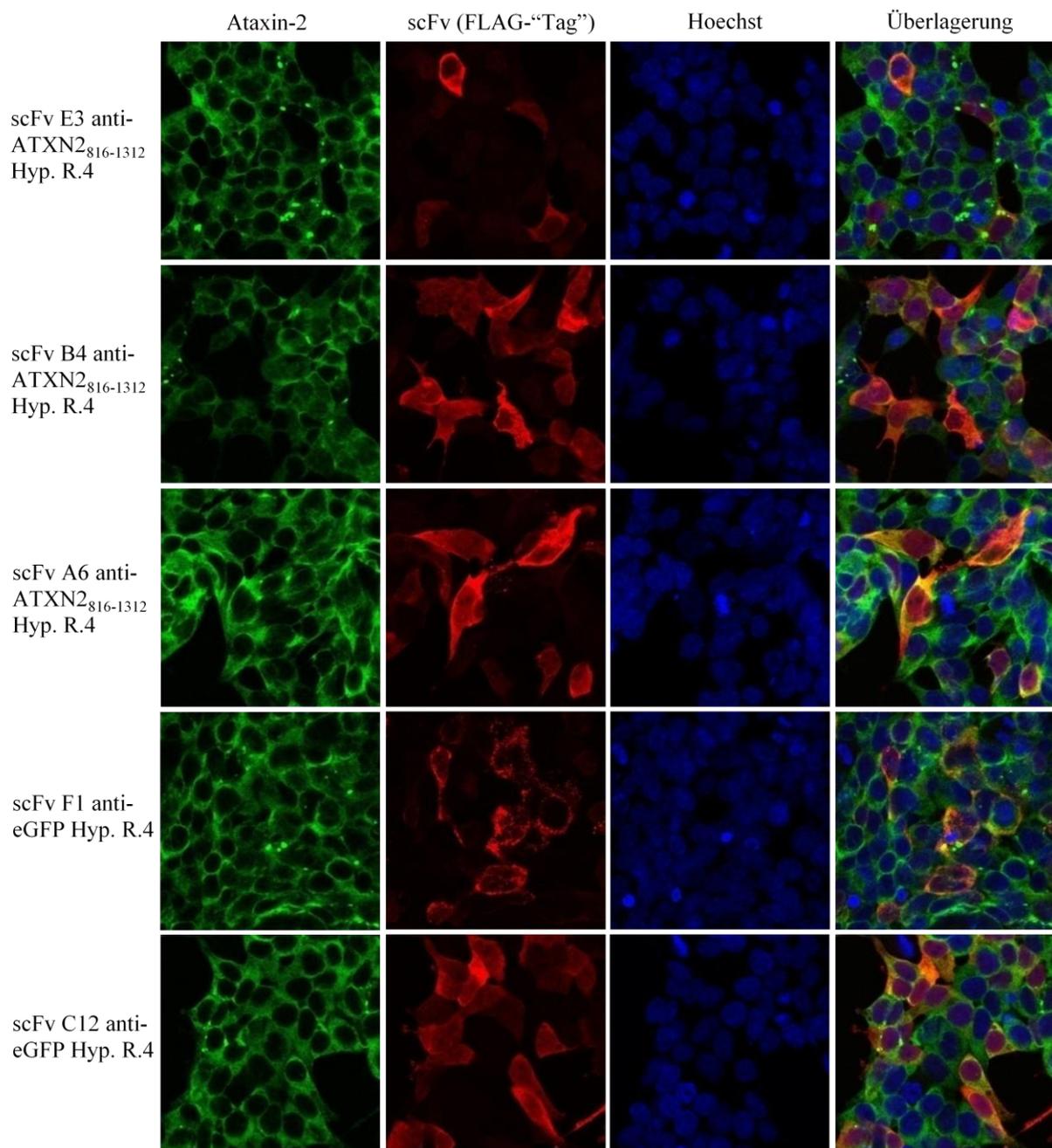
Alle Restriktionsansätze zeigten die gewünschten Banden in Höhe von 750 bp und 4644 bp. Daher wurden nochmals Flüssigkulturen mit den ausgewählten Klonen angeimpft und die Plasmid-DNA präpariert. Die DNA wurde anschließend für die Transfektion von Säugerzellen verwendet.

### 3.3.2 Expression von “Intrabodies” in Säugerzellen

Zur Überprüfung der Expression der “Intrabodies” wurden HEK 293T-Zellen mit den in pFLAG CMV 5a ccdB umklonierten scFv-DNA-Fragmenten transfiziert und anschließend 24 h bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert. Anschließend wurden die Zellen, wie in Abschnitt 2.5.4 beschrieben, immunfluoreszenzgefärbt und die Expression und Lokalisation der “Intrabodies” mit Hilfe von Fluoreszenzaufnahmen mit dem LSM 510 meta analysiert (Abbildung 20).

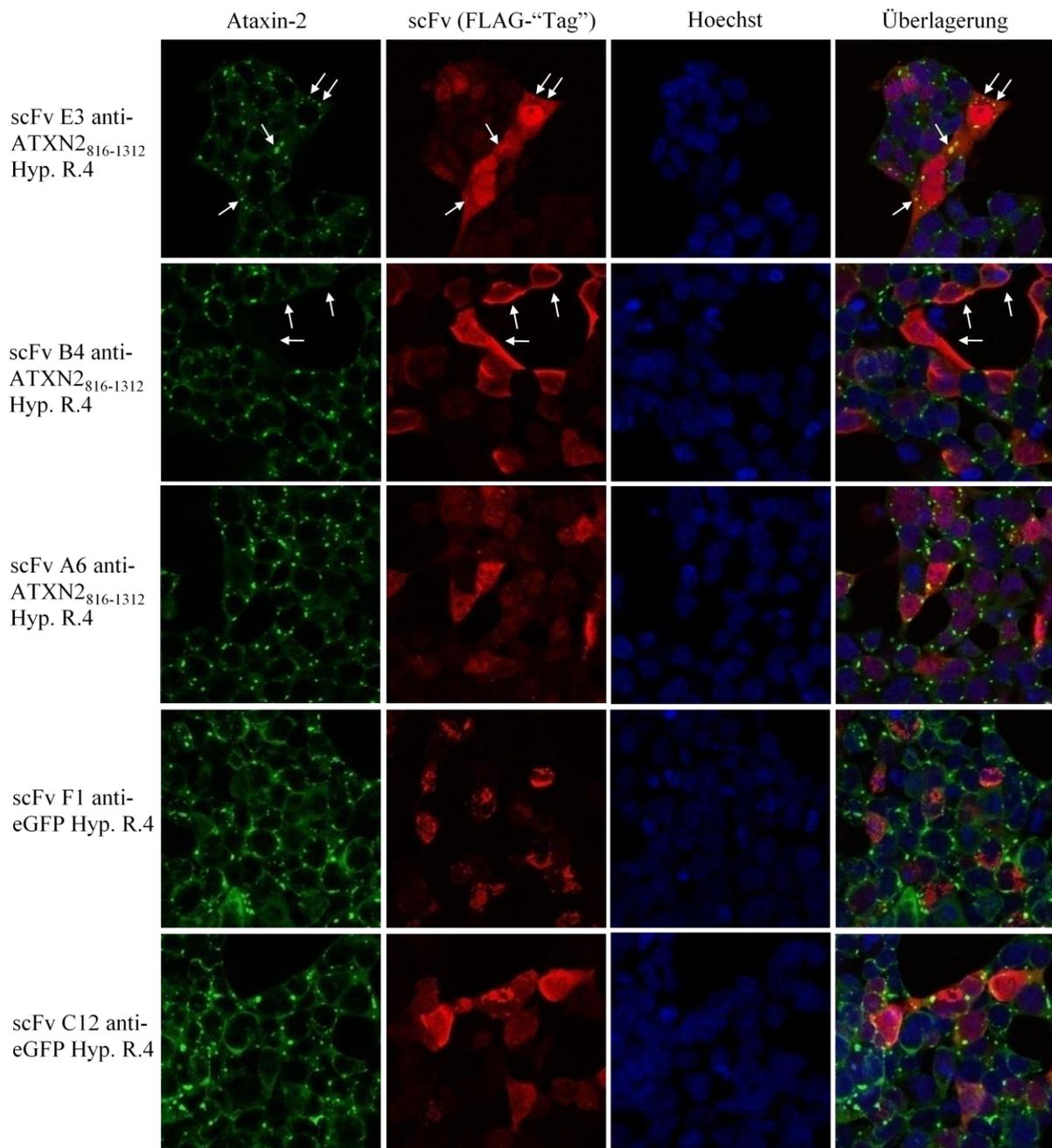
Alle “Intrabodies” zeigten primär eine zytoplasmatische Lokalisation und neigten zum Teil zur Bildung von Akkulaten. Die Neigung zur Akkumulation war beim anti-eGFP “Intrabody” F1 am stärksten ausgeprägt. Das endogene Ataxin-2 war ebenfalls zytoplasmatisch lokalisiert.

Eine Interaktion der “Intrabodies” mit Ataxin-2 ließ sich anhand der mikroskopischen Aufnahmen nicht eindeutig ermitteln.



**Abbildung 20: Expression der “Intrabodies” in HEK 293T-Zellen.** Als primäre Antikörper wurden anti-ATXN2 und anti-pFLAG (gegen den FLAG-“Tag” der “Intrabodies” gerichtet) verwendet. Die sekundären Antikörper waren Alexa 488-anti-Maus-IgG (gegen anti-ATXN2) und Cy3-anti-Kaninchen-IgG (gegen anti-pFLAG). Die Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt.

Um eine mögliche Interaktion der “Intrabodies” mit dem endogenen Ataxin-2 eindeutiger bestimmen zu können, wurden HEK 293T-Zellen nach der Transfektion durch Zugabe von Arsenit oxidativem Stress ausgesetzt, immunfluoreszenzgefärbt und die Expression fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abbildung 21). Durch den oxidativen Stress kommt es zur Ausbildung von “Stress Granules” (SGs), in die Ataxin-2 rekrutiert wird. Bei einer Interaktion der “Intrabodies” mit Ataxin-2 würden auch diese verstärkt im Bereich der SGs sichtbar sein.



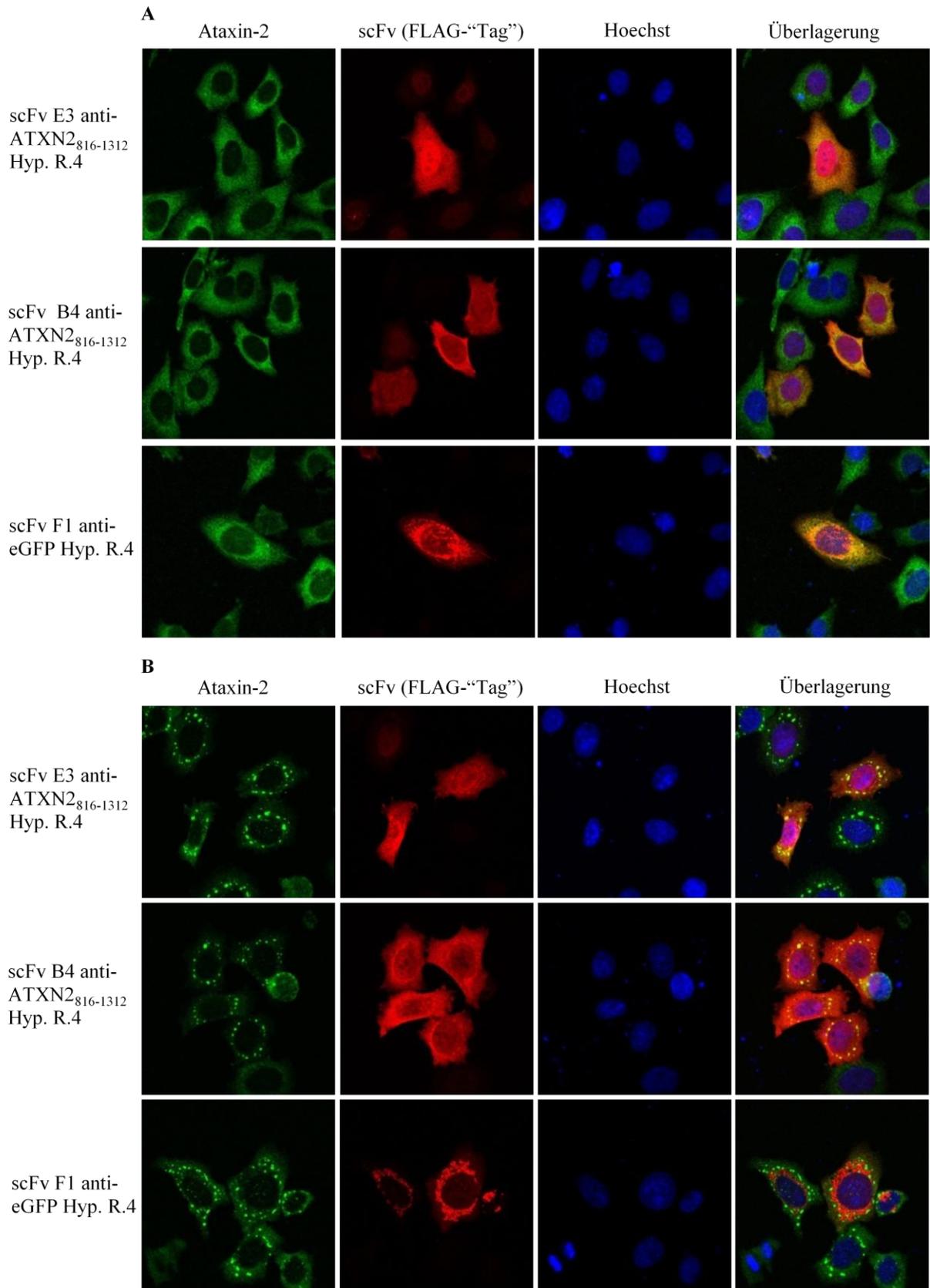
**Abbildung 21:** Expression der “Intrabodies” in HEK 293T-Zellen nach oxidativem Stress durch Zugabe von Arsenit.

Der anti-ATXN2<sub>816-1312</sub> “Intrabody” E3 wurde hauptsächlich im Zellkern, aber auch im Zytoplasma exprimiert. Außerdem zeigte er teilweise eine Kolokalisation mit den “Stress Granules” (SG; in der Abbildung 21 durch weiße Pfeile gekennzeichnet). Der anti-ATXN2<sub>816-1312</sub> “Intrabody” B4 zeigte hauptsächlich eine zytoplasmatische Expression. Das scFv-Fragment kolokalisierte nicht mit den SGs, einige der “Intrabody”-exprimierenden Zellen zeigten aber weniger SGs und ein geringeres endogenes Ataxin-2-Level als die restlichen Zellen (durch weiße Pfeile markiert). Der “Intrabody” A6 (anti-ATXN2<sub>816-1312</sub>) zeigte sowohl eine zytoplasmatische, als auch eine Zellkernlokalisierung, ohne erkennbare

Kolokalisation mit dem endogenen Ataxin-2. Die beiden Kontroll-“Intrabodies” F1 und C12 (anti-eGFP) waren hauptsächlich im Zytoplasma zu finden. Vor allem “Intrabody” F1 neigte dabei stark zur Akkumulation.

Da zwei der anti-ATXN2<sub>816-1312</sub>-“Intrabodies” nach oxidativem Stress zum Teil mit den SGs kolokalisierten (“Intrabody” anti-ATXN2<sub>816-1312</sub> Hyp. R.4 F3) oder das endogene Ataxin-2-Level verringert schien (“Intrabody” anti-ATXN2<sub>816-1312</sub> Hyp. R.4 B4), wurden nochmals Säugetierzellen mit diesen Antikörperfragmenten transfiziert. Für diese Transfektion wurden HeLa-Zellen verwendet. Neben den beiden “Intrabodies” gegen ATXN2<sub>816-1312</sub> wurden die Zellen auch mit dem Kontroll-“Intrabody” anti-eGFP Hyp. R.4 F1 transfiziert (Abbildung 22A). Ein Teil der transfizierten Zellen wurde wieder oxidativem Stress durch Arsenit-Zugabe ausgesetzt (Abbildung 22B).

Alle “Intrabodies” wurden im Zytoplasma und Zellkern exprimiert. Anders als in den HEK 293T-Zellen zeigte der anti-ATXN2<sub>816-1312</sub> “Intrabody” E3 sowohl in den nicht gestressten HeLa-Zellen, als auch in den gestressten Zellen eine Kernlokalisierung. Eine Kolokalisation des Antikörperfragments mit endogenem Ataxin-2 konnte nicht festgestellt werden. Der anti-ATXN2<sub>816-1312</sub> “Intrabody” B4 war in allen HeLa-Zellen primär zytoplasmatisch zu finden. Im Gegensatz zu den HEK 293T-Zellen war sowohl ohne als auch mit oxidativem Stress kein Einfluss auf das endogene Ataxin-2 festzustellen. Beide “Intrabodies” neigten vor allem unter Stressbedingungen zur Bildung von Akkumulaten. Das Kontroll-scFv-Fragment F1 gegen eGFP war zytoplasmatisch lokalisiert und akkumulierte wie auch in den HEK-293T-Zellen stark.



**Abbildung 22: Expression der “Intrabodies” in HEK 293T-Zellen ohne (A) und mit (B) oxidativem Stress durch Arsenit-Zugabe.**

## 4. Diskussion

Ein vielversprechendes Mittel zur Aufklärung von Proteinfunktionen, Protein-Protein-Interaktionen und Erkrankungsmechanismen, sowie zur Therapie von Erkrankungen stellen intrazellulär exprimierte scFv-Fragmente, so genannte “Intrabodies”, dar.

Ziel dieser Arbeit war es mit Hilfe eines *in vivo* Screens ausgehend von Phagen-Display-Subbibliotheken “Intrabodies” zu identifizieren, die Protein-Protein-Wechselwirkungen unterbinden können. Parallel sollten aus den Subbibliotheken (Selektionsrunden) monoklonale Antikörperfragmente gewonnen werden und ihre Antigenbindung *in vitro* nachgewiesen werden. Die Antigenbindung einiger *in vitro* identifizierter Binder sollte anschließend auch in Säugerzelllinien belegt werden.

### 4.1 *in vivo* Selektion von scFv-Fragmenten

Eine Methode zur Selektion von “Intrabodies”, die auf dem herkömmlichen Y2H-System basiert, ist die “Intracellular Antibody Capture Technology” (IACT), bei der scFv-Fragmente ausschließlich auf ihre Stabilität und Antigenbindung selektiert werden. Für die Selektion werden die eingesetzten Phagen-Display-Bibliotheken zunächst in einer “Panning”-Runde vorselektiert. Anschließend wird eine Weiterentwicklung des Y2H-Systems genutzt, um “Intrabodies” zu identifizieren und zu isolieren, die *in vivo* an ihr Antigen binden. Das Targetprotein wird dazu als Fusionsprotein mit der DNA-Bindedomäne eines Transkriptionsfaktors exprimiert (“Bait”). Die Antikörper-Bibliothek wird direkt als Fusionsprodukt mit der Aktivierungsdomäne (“Prey”) koexprimiert. Bei Interaktion von “Bait” und “Prey” bzw. Targetprotein und Antikörperfragment wird so die Transkription der Reportergene aktiviert, wodurch die Hefezellen auf Selektionsmedium wachsen können. Die so identifizierten Binder können anschließend nochmals in einem Säugerzell two-Hybrid Screen auf Antigenbindung getestet werden (Visintin *et al.* 1999, 2002, Stocks 2004).

Eine weitere Methode zur *in vivo* Selektion von scFv-Fragmenten, die so genannte “Quality Control”, nutzt ebenfalls das Y2H-System. Diese Methode dient der antigenunabhängigen Selektion stabiler und löslicher “Intrabodies”, auf deren Grundstruktur “Intrabody”-Bibliotheken entwickelt werden können (Auf der Maur *et al.* 2001, 2004).

Die Suche nach scFv-Fragmenten, die stabil intrazellulär exprimiert werden und an ihr Antigen binden, führte zur Definition einer “Intrabody”-Konsensussequenz, bei der die Antikörper nur in den CDR-Regionen variabel sind. Eine Grundstruktur aus  $V_H 3$  und  $V_K$

(Visintin *et al.* 2002) bzw.  $V_H$  3 und  $V_{\kappa}1$  (Tse *et al.* 2002) stellte sich dabei für die intrazelluläre Expression als besonders geeignet heraus. Die für diese Arbeit als Grundlage verwendete Tomlinson Bibliothek I erfüllt diese Strukturbedingungen optimal und wurde schon von einer anderen Arbeitsgruppe für die Selektion von intrazellulären Bindern verwendet (Tanaka & Rabbitts 2003).

Der durchgeführte “Intrabody” Screen erweitert die bisherigen Selektionsmethoden, indem hier nicht nur auf Antigenbindung, sondern auch auf die Inhibierung einer Protein-Protein-Interaktion gescreent wird. Durch Inhibierung einzelner Protein-Protein-Wechselwirkungen können Schlussfolgerungen über die Funktion der Proteine und der Interaktion im zellulären Metabolismus oder in Signalkaskaden gezogen werden.

Neben dem Einsatz von “Intrabodies” existieren bereits andere Methoden zur Aufklärung der Funktion von Proteinen. Eine dafür häufig verwendete Technologie ist die RNA-Interferenz (RNAi). Im Gegensatz zu “Intrabodies”, die auf Proteinebene agieren, agiert RNAi auf mRNA-Ebene und führt dort zum Abbau von mRNA oder inhibiert die Proteinsynthese, wodurch die Expression ganzer Proteine unterbunden wird. Durch “Intrabodies” ist es hingegen möglich, speziell eine Interaktion eines Proteins zu inhibieren und so deren Funktion zu studieren. Dies ist vor allem bei multifunktionellen Proteinen von Vorteil, da hier alle anderen Interaktionen erhalten bleiben. Bei RNAi kann es außerdem zu unerwünschten Nebeneffekten z.B. durch Veränderung des Expressionslevels von Nichtziel-Proteinen kommen. (Lobato & Rabbitts 2003, Scacheri *et al.* 2004).

#### **4.2 *in vivo* Identifikation inhibitorischer scFv-Antikörperfragmente**

Zur *in vivo* Identifikation inhibitorischer scFv-Antikörperfragmente wurde ein “Intrabody” Screen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Grundlage dafür bildeten Antikörper-Subbibliotheken, die aus der Tomlinson Bibliothek I stammten. Die Subbibliotheken entsprachen den einzelnen Selektionsrunden, die im “Panning”-Prozess gegen die Proteine, SH3GL3 und eGFP, sowie gegen die C-terminale Region des Proteins Ataxin-2, ATXN2<sub>816-1312</sub>, entstanden sind.

Für den “Intrabody” Screen wurden die einzelnen Selektionsrunden (Subbibliotheken) in den Hefeexpressionsvektor pIB NLS Ade umkloniert. Anschließend wurden L40 ade A-Hefezellen mit “Bait”- und “Prey”-Plasmiden und den umklonierten Subbibliotheken transformiert. Die “Bait”- und “Prey”-Plasmide enthielten die DNA der Proteine bzw. Proteinregionen, deren Interaktionen durch die “Intrabodies” inhibiert werden sollten.

Im Einzelnen waren dies: ATXN2<sub>816-1312</sub> und PABC, ATXN2(Q22)<sub>1-396</sub> und SH3GL3, sowie ATXN2<sub>481-815</sub> und SH3GL3. Die scFv-Fragmente zur Inhibierung der Interaktion von ATXN2<sub>816-1312</sub> und PABC stammten aus den Selektionen gegen ATXN2<sub>816-1312</sub>. Für die beiden anderen Interaktionen wurden gegen SH3GL3 selektierte scFvs verwendet. Außerdem wurde für jede Interaktion ein Screen mit der unselektierten Bibliothek durchgeführt.

Für die Interaktion von ATXN2<sub>816-1312</sub> und PABC wurden 2304 (6 x 384) Klone im “Intrabody” Screen untersucht, jedoch konnten keine potentiell inhibitorischen Binder identifiziert werden.

Für die Interaktion von ATXN2(Q22)<sub>1-396</sub> und SH3GL3 konnten nach dem Screen von 4608 (12 x 384) Klonen insgesamt 110 potentiell inhibitorische Binder gefunden werden. Die meisten (63) stammten aus Runde 3 der Selektion gegen SH3GL3, die initial mit Hyperphagen durchgeführt wurde. In Selektionsrunde 4 der Selektion mit Hyperphagen konnten fast 6-mal mehr (34) potentiell inhibitorische scFv-Fragmente identifiziert werden, als in der Selektion, in der ausschließlich M13K07-Helferphagen zur Verpackung der Bibliothek verwendet wurden. Der “Intrabody” Screen mit der unselektierten Bibliothek ergab 7 potentiell inhibitorische Binder.

Für die Interaktion von ATXN2<sub>481-815</sub> und SH3GL3 wurden ebenfalls 4608 (12 x 384) Klone untersucht. Insgesamt konnten für diese Interaktion nur 8 potentiell inhibitorische Binder identifiziert werden, obwohl die gleichen Subbibliotheken verwendet wurden, wie für den Screen mit ATXN2(Q22)<sub>1-396</sub> und SH3GL3. Vier der potentiell inhibitorischen scFv-Fragmente stammen aus Selektionsrunde 4 der Selektion mit M13K07-Helferphagen, zwei weitere aus den Selektionsrunden 3 und 4 der Selektionen mit Hyperphagen und zwei aus der unselektierten Bibliothek.

Die Ursache dafür, dass für die Interaktion von ATXN2<sub>816-1312</sub> und PABC keine potentiell inhibitorischen “Intrabodies” identifiziert werden konnten, ist wahrscheinlich eine unzureichende Anreicherung von inhibitorischen scFv-Fragmenten in der Selektion gegen ATXN2<sub>816-1312</sub>.

Im Gegensatz dazu konnten für die Wechselwirkung von ATXN2(Q22)<sub>1-396</sub> und SH3GL3 wie bereits erwähnt 110 potentiell inhibitorische scFv-Fragmente gefunden werden. Das der Hauptteil dieser aus Runde 3 der Selektion mit Hyperphagen stammt, könnte darauf beruhen, dass für die intrazelluläre Expression von scFv-Fragmenten neben der Affinität zum Antigen auch andere Parameter entscheidend sind. So müssen die Antikörperfragmente auch unter den reduzierenden Bedingungen des Zytoplasmas eine stabile Faltung aufweisen. Häufig treten

aber Faltungsprobleme bei den scFv-Fragmenten auf, da sich im Zytoplasma keine Disulfidbrücken ausbilden können. Daher ist die Anzahl der Antikörperfragmente, die sich korrekt falten können, nur gering. Außerdem sind die Löslichkeit bzw. die Neigung zur Bildung von Aggregaten und die zelluläre Halbwertszeit entscheidende Faktoren für eine gute intrazelluläre Expression (Visintin *et al.* 1999, Stocks 2004). Für den hier durchgeführten “Intrabody” Screen ist weiterhin entscheidend, dass die scFv-Fragmente so an ihr Target binden, dass die Interaktion der Proteine unterbunden wird. Da eine Vielzahl an Eigenschaften erfüllt sein muss, ist eine höhere Diversität der Antikörper, wie sie in der 3. Selektionsrunde gegeben ist, vorteilhaft für den “Intrabody” Screen. Eine zu hohe Diversität, wie bei einer unselektierten Bibliothek, ist hingegen nachteilig, da die Transformation von Hefen verglichen mit Bakterien sehr ineffizient ist (Stocks 2004). Deswegen ist die Größe der Bibliotheken, die in Hefen analysiert werden können, begrenzt. Entgegen der Erwartungen konnten aber auch mit der unselektierten Bibliothek potentiell inhibitorische Binder für die Interaktion von ATXN2(Q22)<sub>1-396</sub> und SH3GL3 gefunden werden.

Insgesamt ergab das Screening der mit Hyperphagen hergestellten Subbibliotheken gegen SH3GL3 mehr potentiell inhibitorische “Intrabodies”, als der Screen der mit M13K07-Helferphagen hergestellten Subbibliothek. Ursächlich dafür sind vermutlich die Hyperphagen bzw. M13K07-Helferphagen, die in den Selektionen für das Verpacken der Bibliotheken verwendet wurden. Bedingt durch das Fehlen eines Wildtyp pIII Gens im Genom des Hyperphagen, kann für die Herstellung neuer Phagenpartikel nur das mit der Antikörper-DNA fusionierte pIII Gen auf dem Phagmid verwendet werden (Rondot *et al.* 2001). Dadurch werden die Antikörperfragmente von allen Phagen und multivalent präsentiert. M13K07-Helferphagen besitzen hingegen ein Wildtyp pIII Gen, sodass das pIII-Hüllprotein mit dem Fusionsprodukt aus pIII und Antikörper um den Einbau in die Phagenhülle konkurriert. Dies führt dazu, dass weniger Phagen Antikörperfragmente auf ihrer Oberfläche präsentieren und das Display meist nur monovalent ist (Hust *et al.* 2005). Der Einsatz von M13K07-Helferphagen bewirkt daher schon in der ersten Selektionsrunde eine stärkere Abreicherung der Bibliothek, wodurch potentielle Binder verloren gehen können. Dies wird durch den Einsatz von Hyperphagen in der ersten Selektionsrunde verhindert. Folglich ist eine Subbibliothek, die initial mit Hilfe von Hyperphagen hergestellt wurde, besser für den “Intrabody” Screen geeignet, da die enthaltenen Binder wahrscheinlich eine höhere Diversität aufweisen.

Wie bereits erwähnt konnten für die Interaktion von ATXN2<sub>481-815</sub> und SH3GL3 nur 8 potentiell inhibitorische Binder identifiziert werden. Auch hier stammten zwei davon

entgegen der Erwartungen aus dem Screen mit der unselektierten Bibliothek. Die geringe Anzahl an potentiell inhibitorischen “Intrabodies” ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass SH3GL3 über zwei unterschiedliche Bindemotive, dem SBM1-Motiv oder dem SBM2-Motiv von Ataxin-2 gebunden werden kann. Das SBM1-Motiv ist in der Proteinregion ATXN2(Q22)<sub>1-396</sub> enthalten, wohingegen sich das SBM2-Motiv in der Proteinregion ATXN2<sub>481-815</sub> befindet. Eine mögliche Erklärung wäre folglich, dass die anti-SH3GL3-scFv-Fragmente zur Inhibierung der Interaktion von ATXN2(Q22)<sub>1-396</sub> und SH3GL3 stärker angereichert waren, als die für die Inhibierung der Interaktion von ATXN2<sub>481-815</sub> und SH3GL3.

Aus Zeitmangel waren im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Untersuchungen der identifizierten scFv-Fragmente möglich. Die im “Intrabody” Screen identifizierten potentiell inhibitorischen Binder müssten weitergehend analysiert werden, um die Ergebnisse des Screens zu bestätigen. Die intrazelluläre Expression der scFv-Fragmente und die Inhibierung der Proteininteraktionen müsste als nächstes nochmal in Hefezellen untersucht werden. Anschließend müsste die Anzahl unterschiedlicher scFv-Fragmente durch DNA-Sequenzierung ermittelt werden und die Inhibierung der Protein-Protein-Wechselwirkungen in Säugerzellen analysiert werden.

#### **4.3 *in vitro* Identifizierung von monoklonalen antigenbindenden scFv-Fragmenten**

Aus den angereicherten Phagen-Display-Selektionsrunden wurden einzelne Klone isoliert und mittels ELISA monoklonale Binder identifiziert. Anschließend wurden diese im Western Immunoblot auf Antigenbindung untersucht.

Für die Untersuchungen wurden zunächst die benötigten monoklonalen scFv-Fragmente und die Antigene ATXN2<sub>816-1312</sub>, SH3GL3 und eGFP durch Proteinexpression in *E. coli* hergestellt. Die sekretierten scFv-Fragmente wurden direkt aus dem Kulturüberstand eingesetzt. Die Antigene wurden mittels IMAC aufgereinigt und in einer SDS-PAGE überprüft. Die Proteine SH3GL3 und eGFP wiesen in der SDS-PAGE die erwartete Größe von 40 kDa bzw. 32 kDa auf und konnten in ausreichender Menge isoliert werden. Die aufgereinigten ATXN2<sub>816-1312</sub>-Fragmente entsprachen nicht der erwarteten Größe von 56 kDa. Auf der SDS-PAGE waren mehrere gleichstarke Banden zwischen 13 kDa und 35 kDa zu sehen. Das 28 kDa Fragment wurde im Vorfeld der Arbeit bereits massenspektrometrisch analysiert. Dabei wurde bestätigt, dass es sich bei dem Fragment um einen Teil von

ATXN2<sub>816-1312</sub> handelt. Da die anderen Banden auf dem Gel ähnlich stark waren und über Ni-NTA aufgereinigt werden konnten, kann daraus geschlussfolgert werden, dass es sich bei allen Banden um Fragmente von ATXN2<sub>816-1312</sub> handelt. Zusätzlich wurde die Stabilität der Proteinregion ATXN2<sub>816-1312</sub> bioinformatisch analysiert. Die Analyse charakterisierte ATXN2<sub>816-1312</sub> als instabil, was darauf schließen lässt, dass es sich bei den Fragmenten um Abbauprodukte der Proteinregion handelt. Diese Schlussfolgerungen wurden durch die Sequenzierung der verwendeten DNA bestätigt, da diese keine vorzeitigen Stopps in der Sequenz ergab, sodass die Fragmente nicht durch vorzeitigen Abbruch der Transkription entstanden sein können. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde neben SH3GL3 und eGFP auch das aufgereinigte ATXN2<sub>816-1312</sub> weiterverwendet.

Die hergestellten Antigene und monoklonalen scFv-Fragmente wurden anschließend für die ELISA-Analysen verwendet. Im ELISA konnten für ATXN2<sub>816-1312</sub> drei Binder identifiziert werden. Für SH3GL3 und für eGFP konnten 14 bzw. 108 Binder identifiziert werden.

Die geringe Anzahl an ATXN2<sub>816-1312</sub>-bindenden scFv-Fragmenten ist auf die geringe Anreicherung an spezifisch bindenden Antikörperfragmenten in der verwendeten Selektionsrunde zurückzuführen. Die geringe Anreicherung wurde wahrscheinlich dadurch verursacht, dass das für die Selektion verwendete ATXN2<sub>816-1312</sub> ebenfalls als heterogenes Material vorlag.

Die größte Anzahl an spezifisch bindenden Antikörperfragmenten für SH3GL3 und eGFP ließ sich erwartungsgemäß in den 4. Selektionsrunden nachweisen, da hier die Anreicherung spezifisch bindender scFv-Fragmente am höchsten ist (siehe auch Abbildung 2).

Im Anschluss an die ELISAs wurden ausgewählte Binder für ATXN2<sub>816-1312</sub>, SH3GL3 und eGFP, sowie je zwei Nichtbinder als Kontrolle im Western Immunoblot auf Antigenbindung überprüft. Es konnte jedoch bei keinem der Antikörperfragmente die Antigenbindung nachgewiesen werden. Daher ist anzunehmen, dass alle im ELISA identifizierten Binder primär konformationelle Epitope erkennen. Im ELISA werden die Antigene in gefalteter Form an die Festphase gebunden, sodass lineare und konformationelle Epitope präsentiert werden können. Im Western Immunoblot hingegen sind die Antigene denaturiert, da sie in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen werden. Daher können hier nur scFv-Fragmente nachgewiesen werden, die lineare Epitope erkennen und binden.

Die DNA der ausgewählten scFv-Fragmente wurde außerdem sequenziert. Für die scFvs gegen SH3GL3 und eGFP konnten 4 bzw. 15 unterschiedliche Sequenzen ermittelt werden.

Die drei ATXN2<sub>816-1312</sub>-Binder besaßen alle eine unterschiedliche Sequenz. Ein Vergleich der *in vitro* identifizierten Antikörper mit den im “Intrabody” Screen gefundenen potentiell inhibitorischen “Intrabodies” war aus zeitlichen Gründen im Rahmen der Arbeit nicht möglich.

#### **4.4 *in vivo* Expressionsstudien ausgewählter scFv-Fragmente in Säugerzellen**

Die Expression und Antigenbindung der drei *in vitro* identifizierten Binder für ATXN2<sub>816-1312</sub>, sowie zweier Binder für eGFP, die als Kontrolle dienten, sollte auch *in vivo* nachgewiesen werden. Dazu wurden die scFv-DNA-Fragmente zunächst in den Expressionsvektor pFLAG CMV 5a ccdB umkloniert. Anschließend wurden HEK 293T-Zellen mit den Plasmiden transfiziert und die “Intrabodies” in den Zellen exprimiert.

Die scFv-Fragmente wurden nach 24 h zum Teil sehr stark in den Zellen exprimiert, was wahrscheinlich neben der zytoplasmatischen Lokalisation der “Intrabodies” auch zur Lokalisation im Nukleus führte. Außerdem bildete ein Teil der “Intrabodies” Akkumulate, was ebenfalls auf die starke Expression zurückzuführen sein könnte. Der hohe Anteil an exprimierten scFv-Fragmenten in den Zellen lässt darauf schließen, dass die “Intrabodies” eine hohe Stabilität besitzen. Sowohl die “Intrabodies”, als auch das endogene Ataxin-2 befanden sich im Zytoplasma, eine Interaktion beider war jedoch anhand der mikroskopischen Aufnahmen nicht eindeutig feststellbar. Um eine mögliche Interaktion eindeutiger feststellen zu können, wurde ein Teil der Zellen oxidativem Stress ausgesetzt. Durch den Stress kommt es zur Bildung von “Stress Granules”, in die auch Ataxin-2 rekrutiert wird. Bei einer Interaktion von “Intrabody” und Ataxin-2 wäre dann auch das scFv-Fragment in den SGs lokalisiert.

Das anti-ATXN2<sub>816-1312</sub> scFv-Fragment F3 zeigte nach 24 h Inkubation teilweise eine Kolokalsation in den SGs. Beim anti-ATXN2<sub>816-1312</sub> scFv-Fragment B4 schien die Menge an exprimiertem Ataxin-2 und die Anzahl an SGs in einigen Zellen geringer zu sein. Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurden nochmals Säugerzellen (HeLa-Zellen) mit der scFv-DNA transfiziert. Die scFv-Fragmente waren auch in den HeLa-Zellen aufgrund ihrer starken Expression im Zytoplasma und im Nukleus lokalisiert. Auch hier konnte eine Kolokalisation bzw. Interaktion der scFv-Fragmente mit Ataxin-2 unter Stressbedingungen anhand der mikroskopischen Aufnahmen nicht eindeutig bestimmt werden. Ein Grund dafür ist die starke Expression der “Intrabodies”. Im Zusammenhang mit oxidativem Stress könnten aber auch posttranslationale Modifikationen am Ataxin-2 auftreten, die dazu führen, dass der

“Intrabody” nicht mehr an das Protein binden kann und dadurch auch keine SG-Lokalisation aufweist. Eine Interaktion der anti-ATXN2<sub>816-1312</sub> scFv-Fragmente mit Ataxin-2 ist somit nicht eindeutig feststellbar, kann aber auch nicht entgültig ausgeschlossen werden.

Bei den anti-eGFP “Intrabodies” F1 und C12 war erwartungsgemäß auf keiner der Aufnahmen eine mögliche Kolokalisation mit Ataxin-2 erkennbar, vor allem “Intrabody” F1 neigte aber nach 24 h Expression stark zur Bildung von zytoplasmatischen und nukleären Akkumulaten.

#### **4.5 Fazit**

Im Rahmen dieser Arbeit konnten in einem “Intrabody” Screen potentiell inhibitorische scFv-Fragmente für die Interaktionen von ATXN2(Q22)<sub>1-396</sub> und SH3GL3, sowie ATXN2<sub>481-815</sub> und SH3GL3 identifiziert werden. Des Weiteren konnten in *in vitro* Analysen antigenbindende scFv-Fragmente für ATXN2<sub>816-1312</sub>, SH3GL3 und eGFP identifiziert werden. In einer anschließenden Analyse der Binder für ATXN2<sub>816-1312</sub> in Säugerzellen konnte eine Kolokalisation bzw. Interaktion der “Intrabodies” mit dem endogenen Ataxin-2 anhand der mikroskopischen Aufnahmen weder eindeutig festgestellt, noch entgültig ausgeschlossen werden. Für eine genauere Analyse wären Koimmunopräzipitationsstudien nötig.

## 5. Zusammenfassung

Die Spinozerebellare Ataxie Typ 2 ist eine neurodegenerative Erkrankung, die autosomal dominant vererbt wird. Sie gehört zur Familie der Polyglutaminerkrankungen, welche durch die Expansion von CAG-Wiederholungen in den krankheitsauslösenden Genen gekennzeichnet ist. Das SCA2 auslösende Gen kodiert für das Protein Ataxin-2, dessen biologische Funktion noch nicht vollständig verstanden ist. Die Mechanismen der Erkrankung konnten ebenfalls noch nicht geklärt werden.

Für die Aufklärung der Funktion von Proteinen, sowie von Erkrankungsmechanismen besitzen intrazellulär exprimierte scFv-Fragmente, so genannte "Intrabodies", ein hohes Potential.

Daher war es Ziel dieser Arbeit im neuartigen "Intrabody" Screen Antikörperfragmente zu identifizieren, die die Interaktion verschiedener Regionen des Ataxin-2 Proteins mit PABC bzw. SH3GL3 unterbinden. Für die Interaktion von ATXN2(Q22)<sub>1-396</sub> und SH3GL3, sowie ATXN2<sub>481-815</sub> und SH3GL3 konnten im Rahmen der Arbeit potentiell inhibitorische Binder gefunden werden, für die Interaktion von ATXN2<sub>816-1312</sub> und PABC hingegen nicht.

Die Antikörperfragmente, die für den "Intrabody" Screen eingesetzt wurden, stammten aus Phagen-Display-Selektionsrunden gegen ATXN2<sub>816-1312</sub> und SH3GL3. Aus diesen und weiteren Selektionsrunden wurden parallel monoklonale scFv-Fragmente für ATXN2<sub>816-1312</sub>, SH3GL3 und eGFP hergestellt. Diese wurden in ELISA und Western Immunoblot auf ihre Antigenbindung untersucht. Im ELISA konnten für alle Targets Binder identifiziert werden. Die Antigenbindung der scFv-Fragmente war im Western Immunoblot jedoch nicht nachweisbar.

Die Expression und Kolo-kalisation der anti-ATXN2<sub>816-1312</sub> scFv-Fragmente mit Ataxin-2 wurde im Anschluss in Säugerzelllinien untersucht. Als Kontrolle dienten im ELISA identifizierte anti-eGFP-Binder. Alle scFv-Fragmente ließen sich in den Säugerzellen exprimieren. Eine mögliche Interaktion der anti-ATXN2<sub>816-1312</sub> "Intrabodies" mit endogenem Ataxin-2 konnte jedoch anhand der mikroskopischen Aufnahmen weder eindeutig bestimmt, noch ausgeschlossen werden.

## 6. Literaturverzeichnis

Albrecht, M., Golatta, M., Wüllner, U., & Lengauer, T. (2004). Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3. *European Journal of Biochemistry* 271 , S. 3155-3170.

Auf der Maur, A., Escher, D., & Barberis, A. (2001). Antigen-independent selection of stable intracellular single-chain antibodies. *FEBS* (508), S. 407-412.

Auf der Maur, A., Tissot, K., & Barberis, A. (2004). Antigen-independent selection of intracellular stable antibody frameworks. *Methods* (34), S. 215-224.

Cestra, G., Castagnoli, L., Dente, L., Minenkova, O., Petrellis, A., Migone, N., et al. (1999). The SH3 Domains of Endophilin and Amphiphysin Bind to the Proline-rich Region of Synaptojanin 1 at Distinct Sites That Display an Unconventional Binding Specificity. *The Journal of Biological Chemistry* (Vol. 274, No. 45), S. 32001-32007.

de Wildt, R., Mundy, C., Gorick, B., & Tomlinson, I. (2000). Antibody arrays for high throughput screening of antibody-antigen interactions. *Nature Biotechnology* (Vol. 18), S. 989-994.

Dübel, S., Rohrbach, P., & Schmiedl, A. (2004). Rekombinante Antikörper. *Biologie in unserer Zeit* (34), S. 372-379.

Fields, S., & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* (Vol. 340), S. 245-246.

Geneservice. (10. Juli 2007). Abgerufen am 15. April 2009 von <http://www.geneservice.co.uk/products/proteomic/datasheets/tomlinsonIJ.pdf>

Giachino, C., Lantelme, E., Lanzetti, L., Saccone, S., Della Valle, G., & Migone, N. (1997). A Novel SH3-Containing Human Gene Family Preferentially Expressed in the Central Nervous System. *Genomics* 41 , S. 427-434.

Holt, L., Büssow, K., Walter, G., & Tomlinson, I. (2000). By-passing selection: direct screening for antibody-antigen interactions using protein arrays. *Nucleic Acids Research* (Vol. 28, No. 15), S. i-v.

Hoogenboom, H., Griffiths, A., Johnson, K., Chiswell, D., Hudson, P., & Winter, G. (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Research* (Vol. 19, No. 15), S. 4133-4137.

Hust, M., Toleikis, L., & Dübel, S. (2005). Antibody Phage Display. *Modern Aspects of Immunobiology* (15), S. 47-49.

Hust, M., Toleikis, L., & Dübel, S. (2007). Selection Strategies II: Antibody Phage Display. In S. Dübel (Hrsg.), *Handbook of Therapeutic Antibodies* (S. 45-68). Weinheim: Wiley-VHC.

- Huynh, D., Figueroa, K., Hoang, N., & Pulst, S.-M. (2000). Nuclear localisation or inclusion body formatin of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human. *Nature Genetics* (Vol. 26), S. 44-50.
- Janeway, J. C., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. (2005). *Immunology-The immun system in health and disease* (6 Ausg.). New York: Garland Science Publishing.
- Kedersha, N., & Anderson, P. (2002). Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochemical Society Transactions* (30), S. 963-969.
- Klockgether, T. (2007). Ataxias. *Parkinsonism and Related Disorders* , S. 391-394.
- Konthur, Z., & Cramer, R. (2003). High-throughput applications of phage display in proteomic analyses. *Targets* (Vol. 2, No. 6), S. 261-270.
- Konthur, Z., & Walter, G. (2002). Automation of phage display for high-throughput antibody development. *Targets* (Vol. 1, No. 1), S. 30-36.
- Koyano, S., Uchihara, T., Fujigasaki, H., Nakamura, A., Yagishita, S., & Iwabuchi, K. (1999). Neuronal intranuclear inclusions in spinocerebellar ataxia type 2: triple-labeling immunofluorescent study. *Neuroscience Letters* (273), S. 117-120.
- Lastres-Becker, I., Rüb, U., & Auburger, G. (2008). Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2). *The Cerebellum* , S. 115-124.
- Little, J., Mount, D., & Yanisch-Perron, C. (1981). Purified lexA protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. *Proceedings of the National Academy of Science* (Vol. 78, No. 7), S. 4199-4203.
- Lobato, M., & Rabbitts, T. (2003). Intracellular antibodies and challenges facing their use as therapeutic agents. *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 9, No. 9), S. 390-396.
- McAllister-Henn, L., Gibson, N., & Panisko, E. (1999). Applications of the Yeast Two-Hybrid System. *Methods* (19), S. 330-337.
- McCafferty, J., Griffiths, A., Winter, G., & Chiswell, D. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* (Vol. 348), S. 552-554.
- Michalik, A., & Van Broeckhoven, C. (2003). Pathogenesis of polyglutamine disorders: aggregation revisited. *Human Molecular Genetics* (Vol. 12), S. R173-R186.
- Netravathi, M., Pal, P., Purushottam, M., Thennarasu, K., Mukherjee, M., & Jain, S. (2009). Spinocerebellar ataxias types 1, 2 and 3: Age adjusted clinical serverity of disease at presentation correlates with size of CAG repeat lengths. *Journal of the Neurological Sciences*, S. 83-86.
- Pulst, S., Nechiporuk, A., Nechiporuk, T., Gispert, S., Chen, X.-N., Lopes-Cendes, I., et al. (1996). Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nature Genetics* (Vol. 14), S. 269-276.

- Ralser, M., Albrecht, M., Nonhoff, U., Lengauer, T., Lehrach, H., & Krobitch, S. (2004). An Integrative Approach to Gain Insights into the Cellular Function of Human Ataxin-2. *Journal of Molecular Biology*, S. 203-214.
- Ralser, M., Goehler, H., Wanker, E., Lehrach, H., & Krobitch, S. (2005a). Generation of a yeast two-hybrid strain suitable for competitive binding analysis. *BioTechniques* (Vol. 39, No. 2), S. 165-168.
- Ralser, M., Nonhoff, U., Albrecht, M., Lengauer, T., Wanker, E., Lehrach, H., et al. (2005b). Ataxin-2 and huntingtin interact with endophilin-A complexes to function in plastin-associated pathways. *Human Molecular Genetics* (Vol. 14, No. 19), S. 2893-2909.
- Reddy, P., & Housman, D. (1997). The complex pathology of trinucleotide repeats. *Current Opinion in Cell Biology* (9), S. 364-372.
- Rondot, S., Koch, J., Breitling, F., & Dübel, S. (2001). A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nature Biotechnology* (Vol. 19), S. 75-78.
- Sahba, S., Nechiporuk, A., Figueroa, K., Nechiporuk, T., & Pulst, S.-M. (1998). Genomic Structure of the Human Gene for Spinocerebellar Ataxia Type 2 (SCA2) on Chromosome 12q24.1. *Genomics* (47), S. 359-364.
- Satterfield, T., & Pallanck, L. (2006). Ataxin-2 and its Drosophila homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes. *Human Molecular Genetics* (Vol. 15, No. 16), S. 2523-2532.
- Scacheri, P., Rozenblatt-Rosen, O., Caplen, N., Wolfsberg, T., Umayam, L., Lee, J., et al. (2004). Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Vol. 101, No. 7), S. 1892-1897.
- Schmiedl, A., & Dübel, S. (2004). Rekombinante Antikörper und Phagen-Display. In M. Wink (Hrsg.), *Molekulare Biotechnologie* (S. 511-542). Wiley-VHC.
- Schöls, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T., & Riess, O. (2004). Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *The Lancet Neurology* (Vol. 3), S. 291-304.
- Serebriiskii, I., & Golemis, E. (2000). Uses of lacZ to Study Gene Function: Evaluation of  $\beta$ -Galactosidase Assays Employed in the Yeast Two-Hybrid System. *Analytical Biochemistry* (285), S. 1-15.
- Shibata, H., Huynh, D., & Pulst, S.-M. (2000). A novel protein with RNA-binding motifs interacts with ataxin-2. *Human Molecular Genetics* (Vol. 9, No. 9), S. 1303-1313.
- Stocks, M. (2005). Intrabodies as drug discovery tools and therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology*, S. 359-365.

Stocks, M. (2004). Intrabodies: production and promise. *Drug Discovery Today* (Vol. 9, No. 22), S. 960-966.

Tanaka, T., & Rabbitts, T. (2003). Intrabodies based on intracellular capture frameworks that bind the RAS protein with high affinity and impair oncogenic transformation. *The EMBO Journal* (Vol. 22, No. 5), S. 1025-1035.

Tse, E., Lobato, M., Forster, A., Tanaka, T., Chung, G., & Rabbitts, T. (2002). Intracellular Antibody Capture Technology: Application to Selection of Intracellular Antibodies Recognising the BCR-ABL Oncogenic Protein. *Journal of Molecular Biology* (317), S. 85-94.

*UniProt*. (24. März 2009 a). Abgerufen am 11. April 2009 von <http://www.uniprot.org/uniprot/Q99962>

*UniProt*. (24. März 2009 b). Abgerufen am 11. April 2009 von <http://www.uniprot.org/uniprot/Q99963>

*UniProt*. (3. März 2009 c). Abgerufen am 10. April 2009 von <http://www.uniprot.org/uniprot/Q99700>

van de Loo, S., Eich, F., Nonis, D., Auburger, G., & Nowock, J. (2009). Ataxin-2 associates with rough endoplasmatic reticulum. *Experimental Neurology* 215 , S. 110-118.

Visintin, M., Melchionna, T., Cannistraci, I., & Cattaneo, A. (2008). In vivo selection of intrabodies specifically targeting protein-protein interactions: A general platform for an "undruggable" class of disease targets. *Journal of Biotechnology* (135), S. 1-15.

Visintin, M., Settanni, G., Maritan, A., Graziosi, S., Marks, J., & Cattaneo, A. (2002). The Intracellular Antibody Capture Technology (IACT): Towards a Consensus Sequence for Intracellular Antibodies. *Journal of Molecular Biology* (317), S. 73-83.

Visintin, M., Tse, E., Axelson, H., Rabbits, T., & Cattaneo, A. (1999). Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid in vivo system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Vol. 96, No. 21), S. 11723-11728.

Young, K. (1998). Yeast Two-Hybrid: So Many Interactions, (in) So Little Time. *Biology of Reproduction* (58), S. 302-311.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und ausschließlich mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Berlin, 11.05.2009

---

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel und Herrn Prof. Dr. Hans Lehrach für die freundliche Übernahme des Haupt- und Koreferats bedanken.

Des Weiteren möchte ich Dr. Zoltán Konthur und Dr. Sylvia Krobitsch für die freundliche Unterstützung und Betreuung meiner Bachelorarbeit danken.

Außerdem bedanke ich mich herzlich bei der AG Konthur und der AG Krobitsch für die stete Hilfsbereitschaft und das tolle Arbeitsklima.

Weiterhin möchte ich meiner Familie und meinem Freund für ihre Unterstützung danken.