

# Freie Universität zu Berlin

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie



## Identifizierung und Validierung funktioneller Intrabodies zur Inhibition von Protein-Protein-Wechselwirkungen bei SCA2

Diplomarbeit  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Diplom-Biochemiker

vorgelegt von

**Tonio Schütze**

geboren am 14.09.1983 in Schwedt/Oder

angefertigt am



**Max-Planck-Institut  
für molekulare Genetik**

Hauptreferent: Prof. Dr. Hans Lehrach  
Korreferent: Prof. Dr. med. Werner Reutter  
Betreuer: Dr. Zoltán Konthur & Dr. Sylvia Krobtsch

Berlin, April 2010

## **Zusammenfassung**

Dysfunktionale Protein-Protein-Interaktionen können für die Ausbildung von Krebs oder Neurodegenerativen Erkrankungen von entscheidender Bedeutung sein. Um die Ursache dieser Krankheiten zu verstehen benötigt man Liganden, die in Proteininteraktionsnetzwerke eingreifen. Ziel dieser Arbeit ist es einen 2-Stufen *in vivo/in vitro* Assay zur Selektion von Intrabodies (Antikörperfragmente, die im Innern der Zelle wirksam sind) zu etablieren, die Protein-Protein-Interaktionen inhibieren und dabei Schwierigkeiten und Besonderheiten derartiger Screens, wie die potenziell oligoklonale Hefe oder Falschpositive zu begegnen und einer Lösung zuzuführen. Mittels standardisierten, optimierten Bedingungen soll eine Intrabody-Screen-Methode gegen beliebige Targets etabliert werden. Man hätte so ein Werkzeug um einzelne Funktionen eines Proteins wie bestimmte Interaktionen oder enzymatische Funktionen gezielt zu beeinflussen, ohne das gesamte Protein auszuknocken. Dies würde neue Möglichkeiten zur Untersuchung von (Fehl-)Funktionen von Proteinen ermöglichen. Des Weiteren wäre es denkbar Intrabodies, aufgrund ihrer Analogie zu Antikörpern, als Therapeutikum zur Behandlung bisher unheilbarer Krankheiten beim Menschen zu verwenden.

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>9</b>
1.1.	Neurodegenerative Krankheiten.....	9
1.2.	Polyglutaminerkrankungen .....	9
1.3.	Spinocerebelläre Ataxie Typ 2 .....	10
1.3.1.	Das Gen <i>SCA2</i> .....	11
1.3.2.	Das Protein Ataxin 2.....	11
1.3.3.	Funktionen und Interaktionen von Ataxin 2.....	11
1.4.	Identifizierung interferierender Liganden .....	
	mit der Yeast-two-Hybrid-Technologie .....	12
1.4.1.	Chemische Verbindungen (small molecules).....	13
1.4.2.	Aptamere.....	14
1.4.3.	Peptid-Aptamere .....	15
1.4.4.	Herstellung rekombinanter Antikörperfragmente.....	15
1.4.5.	Formate rekombinanter Antikörperfragmente.....	15
1.4.6.	Selektion rekombinanter Antikörperfragmente .....	16
1.4.7.	Intrabodies .....	18
1.5.	Vorarbeiten.....	20
1.6.	Zielsetzung der Arbeit .....	21
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
2.1.	Material .....	22
2.1.1.	Laborgeräte und Zubehör .....	22
2.1.2.	Verbrauchsmaterialien.....	25
2.1.3.	Lösungen, Puffer und Chemikalien .....	27
2.1.4.	Medien und Zusätze.....	31
2.1.5.	Mikroorganismen.....	34
2.1.6.	Plasmide und Phagemide.....	35
2.1.7.	Primer .....	35
2.1.8.	Enzyme .....	36

2.1.9.	Antikörper und Nachweisreagenzien.....	36
2.1.10.	DNA- und Proteinstandards.....	37
2.1.11.	Kit-Systeme .....	37
2.1.12.	Software und Webtools.....	38
2.2.	Mikrobiologische Methoden .....	39
2.2.1.	Herstellung von Medien für die <i>E. coli</i> Kultivierung.....	39
2.2.2.	Kultivierung von Hefezellen ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ).....	39
2.2.3.	Bestimmung der optischen Dichte von Bakterien- und Hefekulturen.....	39
2.2.4.	Herstellung und Lagerung von Bakterienkulturen .....	39
2.2.5.	Herstellung und Lagerung von Hefekulturen .....	39
2.2.6.	Herstellung elektrokompenter Zellen .....	40
2.2.7.	Transformation in <i>E. coli</i> mittels Elektroporation.....	41
2.2.8.	Chemische Transformation in Hefezellen des Stammes L40ccua .....	41
2.3.	Molekularbiologische Methoden.....	42
2.3.1.	Agarose-Gelelektrophorese .....	42
2.3.2.	Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	42
2.3.3.	DNA-Aufreinigung mit dem PCR-Purification Kit.....	42
2.3.4.	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> .....	43
2.3.5.	Präparation von Plasmid-DNA aus Hefezellen .....	43
2.3.6.	Messung der DNA-Konzentration im NanoDrop 1000 Spektralphotometer ...	43
2.3.7.	Polymerase-Kettenreaktion PCR.....	44
2.3.8.	Restriktionsverdau .....	47
2.3.9.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	47
2.3.10.	Ethanolpräzipitation.....	48
2.3.11.	Sequenzierung.....	48
2.4.	Zellbiologische Methoden.....	49
2.4.1.	Kultivierung von Säugetierzellen .....	49
2.4.2.	Transfektion von Säugetierzellen mit dem Effectin Kit von Qiagen .....	49

2.4.3.	Fluoreszenzmikroskopie .....	50
<b>3.</b>	<b>Resultate.....</b>	<b>51</b>
3.1.	Screening und Validierung funktioneller Intrabodies .....	51
3.1.1.	Phagen-Display und Screening in der Hefe.....	51
3.1.2.	Validierung von Hefekandidaten.....	52
3.2.	Initiale Validierung im Inhibitionsassay von 73 <i>E. coli</i> -Subklonen .....	53
3.3.	Identifizierung von individuellen Intrabodies .....	55
3.4.	Übersicht der 37 individuellen scFv-Intrabodies .....	55
3.5.	Auswahl der Topkandidaten.....	59
3.6.	Fluoreszenzmikroskopie.....	61
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>65</b>
4.1.	Downstream-Evaluation .....	65
4.1.1.	Initialer Inhibitionsassay von 73 zufällig gewählten <i>E. coli</i> -Subklonen .....	65
4.1.2.	Identifizierung von individuellen Intrabodies .....	66
4.1.3.	Lokalisationsstudien von Ataxin 2 in oxidativ gestressten HEK-Zellen.....	66
4.2.	Vergleich der Kombinierten Anwendung zu ausschließlicher .....	
	<i>in-vivo</i> bzw. <i>in-vitro</i> -Selektion.....	67
4.3.	Optimierte Selektion funktioneller Intrabodies .....	68
<b>5.</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>69</b>
<b>6.</b>	<b>Eigenständigkeitserklärung .....</b>	<b>74</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>75</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>76</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ABTS	2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diammonium Salz
AD	Aktivierungsdomäne (eines Transkriptionsfaktors)
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
A2BP1	<i>Ataxin 2 binding protein 1</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
CDR	Komplementaritätsbestimmende Regionen
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DBD	DNA-Bindedomäne
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i> -Subklon	<i>E. coli</i> -Klon nach Transformation der DNA aus einem Hefekandidaten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ("Ethylenediaminetetraacetic acid")
eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ELISA	<i>Emzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
Fv	<i>Fragment variable</i>
g	Gramm
h	Stunde
Hefekandidat	Hefeklon, der beim Inhibitionsscreen nicht oder vermindert auf der Selektionsplatte wächst und damit potentiell die Interaktion inhibiert
HMMF	<i>Hogness Modified Freezing Medium</i>
Ig	Immunglobulin

Interaktionsklon	Hefeklon, mit den Plasmide die Bait- und Prey-Proteine exprimieren
Inhibitionsassay	Nach Transformation eines Intrabodies in einen Interaktionsklon werden vier Inhibitionsklone eingerührt und durch Replikaplattierung auf die Kontroll- und die Selektionsplatte übertragen
Inhibitionsklon	Hefeklon, nach Transfektion eines Intrabodies in einen Interaktionsklon
Inhibitionsscreen	Inhibitionsassay einer Bibliothek bzw. Selektierten Subbibliothek zum Identifizieren von Hefekandidaten
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
Lsm	<i>Like Sm domain</i>
LsmAD	<i>Lsm-associated domain</i>
M	Molar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei x nmWellenlänge
PABC	C-terminale Domäne des Poly-(A)-Bindeproteins
PABP	Poly-(A)-Bindeprotein
PAM2	<i>PABP-interacting motif 2</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate buffered saline</i> + Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglycol
PTM	<i>Phosphate buffered saline</i> + Tween 20 + Milchpulver
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz

rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SBM1	<i>SH3 domain binding motif 1</i>
SBM2	<i>SH3 domain binding motif 2</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
scFv	<i>single chain fragment variable</i>
SD-Medium	<i>Synthetic defined-Medium</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
SG	<i>Stress Granule</i>
SH3	<i>Src-homology-3 domain</i>
SH3GL2	<i>SH3-containing GRB2-like protein 2</i>
SH3GL3	<i>SH3-containing GRB2-like protein 3</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween® 20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
U	<i>Unit</i>
üN	Über Nacht
V <sub>H</sub>	Variable Domäne der schweren Kette
V <sub>L</sub>	Variable Domäne der leichten Kette
YPD	<i>Yeast extract-peptone-dextrose</i>
Y2H	Yeast two-Hybrid
2xYT-Medium	2x Hefeextrakt-Trypton-Medium

# **1. Einleitung**

## **1.1. Neurodegenerative Krankheiten**

Aufgrund der höheren Lebenserwartung und der damit verbundenen Zunahme älterer Menschen stellen neurodegenerative Erkrankungen (griechisch νέυρο-, néuro-, „Nerv[en]“- und lateinisch dēgenerāre, „aus-“ oder „entarten“) eine medizinische Herausforderung dar. Gemeinsam ist allen unterschiedlichen Formen der fortschreitende Untergang von Neuronen im zentralen Nervensystem. Obwohl das krankheitsverursachende Gen bzw. Protein oft bekannt ist, gibt es nur Hypothesen der Pathogenese. Einige Formen wie Morbus Huntington sind erblich. Andere Formen wie Morbus Alzheimer treten scheinbar sporadisch auf. Typische neurologische Symptome sind Demenz und Bewegungsstörungen. Histologische Schnitte der Verstorbenen haben für jede Krankheit charakteristische Schädigungsmuster im Gehirn, beispielsweise Fibrillen oder Plaques. Obwohl neurodegenerative Krankheiten in jedem Alter auftreten können, erhöht zunehmendes Alter die Präferenz zu erkranken.

## **1.2. Polyglutaminerkrankungen**

Polyglutaminerkrankungen sind eine Gruppe von erblichen, neurodegenerativen Krankheiten, mit unterschiedlicher Pathogenese. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit sind neun dieser Krankheiten bekannt. Es handelt sich dabei um Huntington, Spinocerebelläre Ataxie Typ 1, 2, 3, 6, 7 und 17 sowie Dentato-rubrale Pallido-Luysische Atrophie und Spinobulbäre Muskelatrophie (Bauer and Nukina 2009). Gemeinsam ist allen diesen Krankheiten die Antizipation, d. h. die Länge der Polyglutaminbereich nimmt von einer Generation zur nächsten zu, was zu immer früherem Krankheitsbeginn mit drastischeren Verläufen führt (Schols et al. 2004). Die Hypothese, dass die Aggregation von fehlgefaltenden Proteinen dem Pathomechanismus zu Grunde liegt ist weiterhin gültig (Bates et al. 1997). Allerdings scheint die Pathogenese mit einer proteolytischen Spaltung, aus der ein toxisches Fragment hervorgeht, das die Polyglutaminbereich enthält, assoziiert zu sein (Lunkes et al. 2002; Gardian et al. 2004). Welche Population von Aggregaten (Oligomere, Profibrillen oder Fibrillen) zytotoxisch wirken ist unbekannt. Die Aggregate können dysfunktional wirken auf die Neuronen und können zur Apoptose der Neuronen führen (Yang et al. 1999; Li et al. 2000). Obwohl die mutierten Proteine ubiquitär exprimiert werden, wirken sie nur in bestimmten Zellen des ZNS cytotoxisch. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit gibt es keine kausal wirksamen Therapeutika. Aus diesem Grund sind verschiedene therapeutische Strategien in der Entwicklung, die die

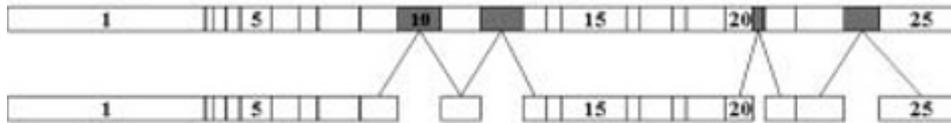
schädigende Wirkung des Proteins verhindern sollen. Beispielsweise wird RNAi eingesetzt, um die Translation des krankheitsverursachenden Proteins zu inhibieren. (Bonini and La Spada 2005) Außerdem werden „small molecules“ wie Kongorot verwendet, um die Aggregation des krankheitsverursachenden Proteins zu verhindern (Sanchez et al. 2003).

### **1.3. Spinocerebelläre Ataxie Typ 2**

Die Spinocerebelläre Ataxie 2 (SCA2) wurde zuerst in Indien beschrieben (Wadia and Swami 1971). Sie ist eine Unterform der SCAs, einer Gruppe ähnlich verlaufender neurodegenerativer Krankheiten des Menschen. Cerebelläre Ataxie ist die gestörte Bewegungskoordination als Folge der Verkümmern von Neuronen des Kleinhirns. Es gibt zahlreiche neurologische Krankheiten, bei denen Ataxie als Krankheitssymptom auftreten kann, wie z. B. Kleinhirninfarkte, Kleinhirntumoren oder Multiple Sklerose. Es werden über 30 genetische Unterformen unterschieden. Für 12 dieser Unterformen wurden das krankheitsbedingte Gen und die ursächliche Mutation identifiziert. SCA 2 gehört zu einer der drei Untergruppen der autosomal-dominanten cerebellären Ataxien (ADCA). Bei ADCA Typ 1 können neben der Ataxie zusätzliche Symptome wie eine Degeneration der Sehnerven (Opticusatrophie), Schluckstörung (Dysphagie), Spastik mit Steifigkeit und gesteigerten Reflexen, parkinsonähnliche Symptome (Akinese, Rigor), Blasenfunktionsstörungen, Gefühlsstörungen, Missempfindungen, Muskelkrämpfe oder Muskelschwund und in seltenen Fällen auch ein Nachlassen der geistigen Kräfte (Demenz) auftreten. Es kommt zum starken Verlust von Purkinje-Zellen, von Neuronen der Substantia nigra und der Olivae inferiores, von Zellen des cerebellären Kortex, sowie weiterer Hirnareale (Schols et al. 2000). Das Auftreten der ersten Symptome variiert stark. Das Durchschnittsalter bei Erkrankungsbeginn beträgt etwa 30 Jahre. In Mitteleuropa beträgt die Häufigkeit des Auftretens aller SCAs 2-3 auf 100000 Einwohner. SCA2 tritt bei 10-15% der SCA-Patienten auf und lässt sich durch molekularbiologische Untersuchungen eindeutig feststellen. Das krankheitsverursachende Gen wurde 1996 unabhängig von drei Gruppen identifiziert (Nechiporuk et al. 1996; Sanpei et al. 1996; Stevanin et al. 1996).

### 1.3.1. Das Gen SCA2

#### Ataxin-2 cDNA



#### Ataxin-2 protein



Abbildung 1-1: SCA2 und Ataxin 2 (Lastres-Becker et al. 2008)

Das SCA2-Gen liegt auf dem Chromosom 12q24.1 und umfasst 130 kb mit 25 Exons. Das Genprodukt, Ataxin 2, ein Protein weitgehend unbekannter Funktion und enthält einen Bereich aus den drei Nukleotiden Cytosin, Adenin und Guanin (CAG), die wiederholend hintereinander stehen. Während man bei 32-34 CAG-Wiederholungen (normalerweise 14-32 Wiederholungen) ist man in einem Graubereich, in dem es bereits zur Auslösung von SCA2 kommen kann bricht die Krankheit bei mehr als 34 Wiederholung sicher aus (Schols et al. 2000). Es sind Expansionen mit mehr als 200 Wiederholungen möglich (Lastres-Becker et al. 2008). Die expandierten CAG-Wiederholungen werden meist nicht mehr von CAA-Codons unterbrochen (Nechiporuk et al. 1996).

### 1.3.2. Das Protein Ataxin 2

Wie in der Abbildung 1-1 zu sehen ist, handelt es sich bei Ataxin um ein aus 1313 AS bestehendes Protein (ca. 140 kDa), dass über zwei saure Domänen („Like Sm Domäne“; AS 254-345) und der LsmAD-Domäne („Lsm-associated domain“; AS 353-475) mit einer Vielzahl negativ geladener AS verfügt. Die Polyglutaminbereich befindet sich im N-terminalen Bereich des Proteins. Außerdem besitzt es ein PAM2-Motiv, das als Bindungsstelle für das Poly(A)- Bindeprotein PABP dient. Es handelt sich um ein stark basisches cytoplasmatisches Protein, dessen Aggregationsneigung im Vergleich zu anderen Polyglutaminerkrankung eher gering ist (Saunders and Bottomley 2009).

### 1.3.3. Funktionen und Interaktionen von Ataxin 2

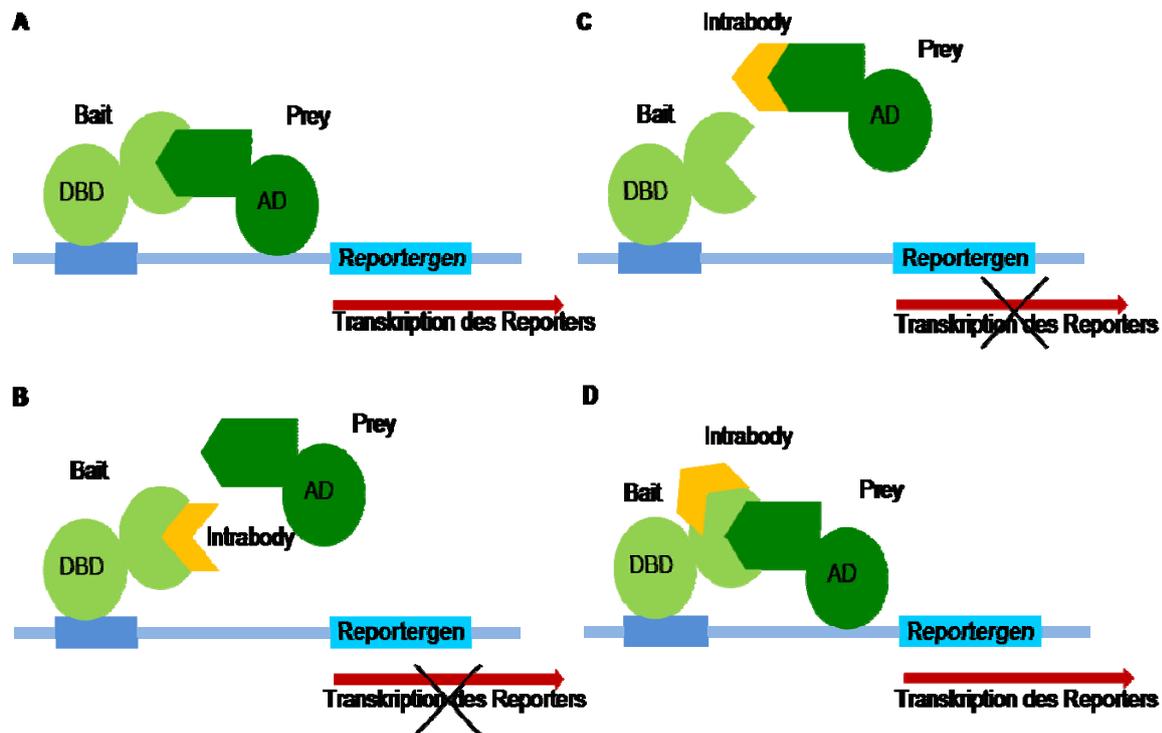
Ataxin 2 kommt ubiquitär außer in Neuronen vor allem in Herz, Leber, Skelettmuskeln, Pankreas und Plazenta vor (Albrecht et al. 2004). Im Gehirn wird es vorwiegend im

Hippocampus, in den Basalganglien, im Mittelhirn, in der Substantia nigra und im Kleinhirn exprimiert. Auf der Proteinebene scheint Ataxin 2 eine Rolle beim RNA-Processing (Shibata et al. 2000) und beim Membrantransport (Nonis et al. 2008) zu spielen. In den bisher durchgeführten Interaktionsstudien konnten Interaktionen mit A2BP1 (Ataxin 2 bindendes Protein 1, (Shibata et al. 2000), Polyribosomen (Satterfield and Pallanck 2006), der RNA-Helikase DDX6 (Nonhoff et al. 2007) sowie Endophilin-A1 (SH3G12; SH3-containing GRB2-like protein 2) und Endophilin-A3 (SH3GL3; SH3-containing GRB2-like protein 3; (Ralser et al. 2005) nachgewiesen werden. Endophiline spielen bei der Endozytose eine entscheidende Rolle und besitzen eine SH3-Domäne, die prolinreiche Regionen, die auch Ataxin 2 besitzt, bindet.

#### **1.4. Identifizierung interferierender Liganden mit der Yeast-two-Hybrid-Technologie**

Es hat sich gezeigt, dass dysfunktionale Protein-Protein-Interaktionen als Ursache von Krankheiten wie Krebs oder Neurodegenerativen Erkrankungen von entscheidender Bedeutung sind. Krankheiten können sich sowohl durch fehlende Interaktionen als auch durch neue Interaktionen manifestieren. Daher ist die Erforschung von Protein-Protein-Interaktionen für das Verständnis von Krankheiten und ihrer Ursachen von großem wissenschaftlichen und medizinischen Interesse. Ein wichtiges und weit verbreitetes System zur Untersuchung dieser Interaktionen ist das Yeast-2-Hybrid-System, das 1989 eingeführt wurde (Fields and Song 1989) und auf der Expression von zwei Fusionsproteinen in der Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) beruht, deren Interaktion über die Aktivität eines Reportergens detektiert wird. Die verwendeten Fusionsproteine bestehen zu einem Teil aus einer von zwei Domänen eines Transkriptionsfaktors die mit einem von zwei Proteinen bzw. Proteinfragmenten fusioniert sind, die man untersuchen möchte. Die sequenzspezifische DNA-Bindedomäne (DBD) mit dem Protein für das Interaktionspartner gesucht werden wird „Bait“ (Köder) genannt. An die Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD), die die RNA-Polymerase II aktiviert, ist ein Protein fusioniert, dass auf Interaktion getestet wird („Prey“, Beute). Beide Fusionsproteine werden über Plasmide in die Hefe transformiert und führen ohne Interaktion nicht zur Aktivierung des Reporters. Wenn, wie in Abbildung 1-2A gezeigt, Bait und Prey interagieren, kommt es zur räumlichen Nähe und faktischen Rekonstitution des Transkriptionsfaktors und damit zur Aktivierung des oder der Reportergene, z. B. *HIS3*, *LEU2* oder *LacZ* (Fashena et al. 2000; McAllister-Henn et al.1999; Inglis et al. 1999). Durch zahlreiche Variationen wurde die Grundidee weiterentwickelt und so für verschiedene Fragestellungen optimiert. Beim Reverse-Y2H Screen werden Reportergene eingesetzt, deren

Gen-Produkte cytotoxisch oder zytostatisch wirken. Die Hefe wächst daher nur, wenn Bait und Prey nicht interagieren (Li and Fields 1993). Neben Protein-Protein-Interaktionen können auch Protein-DNA- (Li and Herskowitz 1993; Wang and Reed 1993), Protein-RNA (SenGupta et al. 1996; Wang et al. 1996) sowie Protein-Drug-Interaktionen (Licitra and Liu 1996) untersucht werden.



**Abbildung 1-2: Verwendung der Y2H-Technologie für den Inhibitionsassay.** (A): Wenn Bait- and Preyproteine interagieren wird der Reporter transkribiert, (B): Der Intrabody bindet das Baitprotein und verhindert die Interaktion. (C): Der Intrabody bindet das Preyprotein und verhindert die Interaktion. (D): Intrabody bindet das Baitprotein, verhindert aber die Interaktion nicht.

Um Liganden zu finden, die in Interaktionsnetzwerken eingreifen, kann ein Screening mit unterschiedlichen chemischen und biologischen Verbindungen eingesetzt werden. Dazu screent man Bibliotheken chemischer Verbindungen oder transformiert ein weiteres Plasmid, das für den potenziellen Inhibitor kodiert, und prüft, ob die Interaktion inhibiert wird, d.h. das Reporter-Gen nicht mehr transkribiert (siehe schematisch Abbildung 1-2 B+C für einen Intrabody als interferierender Ligand; Ralser et al. 2005; Taussig et al. 2007).

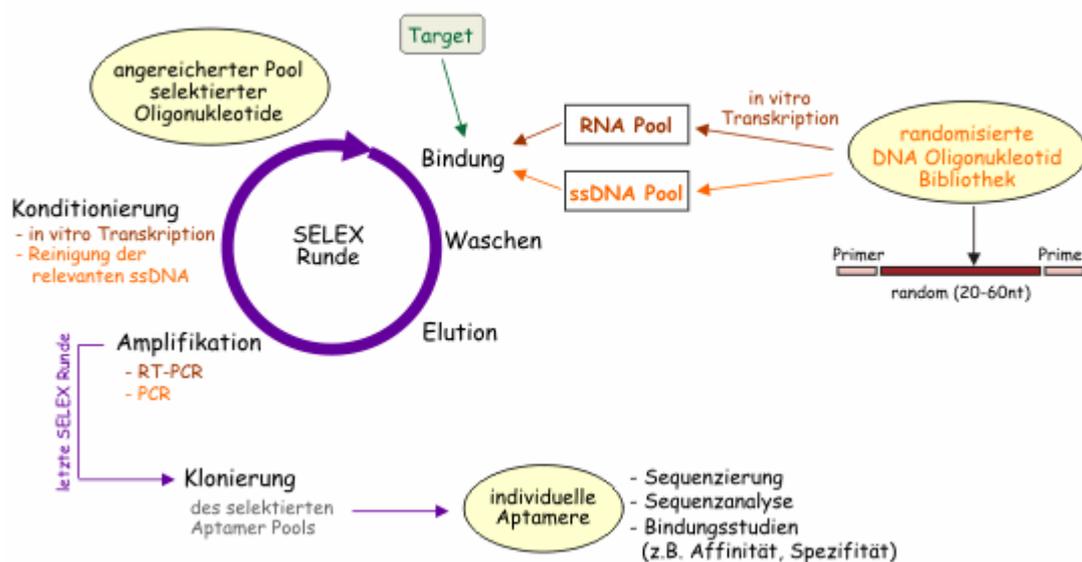
#### 1.4.1. Chemische Verbindungen (small molecules)

Unter „small molecules“ versteht man unterschiedliche Moleküle, mit geringem molekularem Gewicht (<800 Da), die Biomoleküle wie Proteine, Zuckern oder DNA und RNA binden können. Dabei handelt es sich meist um synthetische Derivate von „natürlichen“

Verbindungen, die oft eine höhere Aktivität zeigen. Häufig können diese Moleküle durch Zellmembranen diffundieren, was sie als mögliches Therapeutikum auszeichnet. Meist werden Bibliotheken zum Screening verwendet die aus mehreren Tausend unterschiedlichen Verbindungen bestehen (Luesch et al. 2006).

#### 1.4.2. Aptamere

Aptamere sind kurze ssDNA oder RNA-Moleküle - (Ellington and Szostak 1990; Tuerk and Gold 1990) mit einer randomisierten Sequenz. Diese werden als Bibliothek mit  $10^{14}$ - $10^{15}$  unterschiedlichen Sequenzen hergestellt. Anschließend werden Aptamere mit der SELEX-Methode (Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung) hoch spezifisch angereichert. Dabei binden gefaltete Ribonukleinsäuren an ein immobilisiertes Target. Ungebundene Aptamere werden gewaschen. An die definierten Enden können Primer binden und die gebundenen Aptamere mittels PCR amplifizieren. Der Zyklus aus Bindung und Amplifikation wird durchschnittlich 5-15 Mal wiederholt (Dausse et al. 2009) und anschließend wird die selektierte, hochspezifisch bindende Subbibliothek umkloniert (siehe Abbildung 1-3). Aptamere können durch Fusion mit Proteinen oder Einsatz von modifizierten Nukleotiden modifiziert werden. Wenn Aptamere im Inneren von Zellen wirksam sind, spricht man von Intrameren, die potentiell als Therapeutikum einsetzbar sind (Famulok et al. 2001).



**Abbildung 1-3: Prinzip des Selex (Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung).** Abbildung von Regina Stoltenburgn vom Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung ([www.ufz.de/index.php?de=13024](http://www.ufz.de/index.php?de=13024))

#### 1.4.3. Peptid-Aptamere

Bei Peptid-Aptameren handelt es sich um kurze Peptide, die an ein Scaffoldprotein fusioniert sind. Durch Beschaffenheit von Peptid und Scaffoldprotein bilden Peptid-Aptamere eine definierte dreidimensionale Struktur (Hoppe-Seyler and Butz 2000). Sie werden hauptsächlich eingesetzt um *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen zu inhibieren (Crawford et al. 2003). Dazu werden Bibliotheken aus mRNA gewonnen (Hoppe-Seyler et al. 2004) und im Y2H-System zur Selektion einer interferierenden Liganden eingesetzt

#### 1.4.4. Herstellung rekombinanter Antikörperfragmente

Rekombinante Antikörperfragmente werden rekombinant von natürlich vorkommenden Antikörpern gewonnen. Meist werden Bibliotheken durch Klonierung aus cDNA von B-Lymphozyten verschiedener Organismen gewonnen. Wird die Bibliothek nicht weiter modifiziert, spricht man von natürlichen Antikörperfragmentbibliotheken, ansonsten handelt es sich um eine semisynthetische Bibliothek (Schmiedl and Dübel 2004). Zusätzlich gibt es auch Bibliotheken mit randomisierten CDR-Regionen, die ausschließlich synthetisch sind und daher als vollsynthetische Antikörperfragmentbibliotheken bezeichnet werden (Ohage and Steipe 1999; Ohage et al. 1999). Bereits vor Aufkommen der Herstellung rekombinanter Antikörperfragmente wurden an Immunglobulin G (IgG) genetische Manipulationen vorgenommen (Janeway and Travers 1997). Daher begann die Herstellung von rekombinanten Antikörpernfragmenten, die von mit IgG abgeleitet sind. Andere Formate wie IgD oder IgM werden ebenfalls verwendet (Loset et al. 2005).

#### 1.4.5. Formate rekombinanter Antikörperfragmente

Es gibt unterschiedlich Formate, die aus IgG abgeleitet werden können (Abbildung 1-4). Die kleinste funktionelle Einheit ist das Fv (Fragment variable), welches das Epitop, d. h. den Bereich, der das Antigen bindet, beinhaltet. Es ist ein Heterodimer, das aus den hypervariablen Regionen der leichten und schweren Kette des Antikörpers besteht. Um die Stabilität des Fvs zu erhöhen, können die Fragmente von schwerer und leichter Kette mit einem Serin-Glycin-Peptid-Linker verbunden (scFv, *single chain fragment variable*, Whittington et al. 1998) werden. Ebenfalls möglich ist die Verwendung von Fab-Fragmenten (*fragment antigen-binding*), welche zusätzlich zu den variablen Regionen die C<sub>H1</sub>-Domänen von schwerer und leichter Kette besitzen. Der Vorteil liegt hierbei in der höheren Stabilität im

Vergleich zum scFv. Allerdings benötigen FAB-Fragmente aufgrund der Disulfidbrücke ein oxidierendes Milieu um die beiden Ketten zu assoziieren.

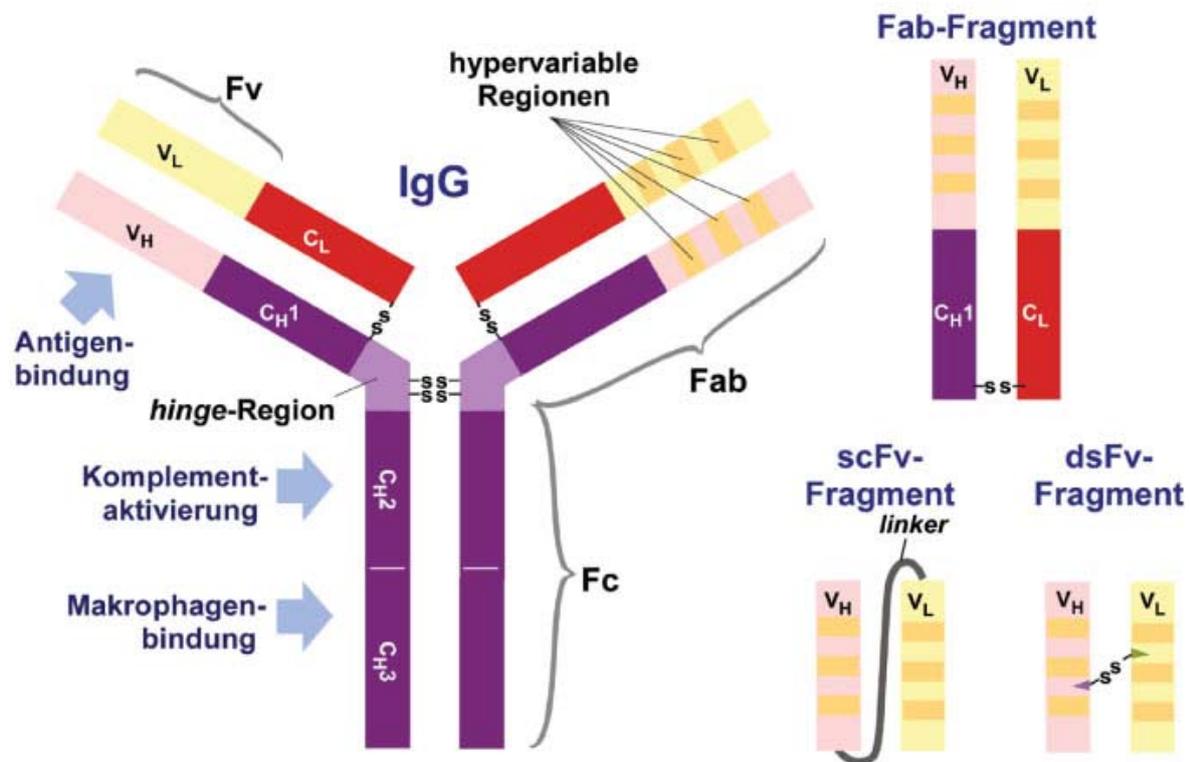


Abbildung 1-4: Schematische Abbildung von IgG sowie von verschiedenen davon abgeleiteten Antikörperfragmenten, die als Intrabody wirken können (Janeway and Travers 1997).

Ein neueres Format ist das scFAB (*single chain fragment antigen-binding*), bei dem ähnlich zum scFv ein allerdings längerer Serin-Glycin-Linker vorhanden ist (Hust et al. 2007). Rekombinante Antikörper können in verschiedenen prokaryontischen und eukaryontischen Expressionssystemen hergestellt werden (Dübel et al. 2004). Standardmäßig werden scFAB-Fragmente in *E. coli* exprimiert und mit einem Signalpeptid ausgestattet werden, dass die Sekretion in den periplasmatischen Raum ermöglicht, aus dem die Antikörperfragmente präpariert werden können (Better et al. 1988; Skerra and Pluckthun 1988; zu Putlitz et al. 1998).

#### 1.4.6. Selektion rekombinanter Antikörperfragmente

Proteine, insbesondere Antikörperbibliotheken, können mit verschiedenen Methoden einer *in-vitro*-Selektion unterworfen werden. Dabei lassen sich die die Bedingungen für die Bindung (Temperatur, pH-Wert) bedarfsweise anpassen. Entscheidend bei diesen Methoden ist, den zu selektierenden Phänotyp (Protein) mit seinem Genotyp (DNA) direkt (Fusion) oder

indirekt (z. B. Phage) zu koppeln (Abbildung 1-5; Lin and Cornish 2002). Dazu steht eine Reihe von Methoden, wie z.B. Ribosomen-Display (Morfill et al. 2007), Bakterien-Display (Daugherty 2007), Mikrobead-Display (Nord et al. 2003) oder mRNA-Display (Cho et al. 2000) zur Verfügung. Für die Selektion von Antikörperfragmentbibliotheken hat sich das Phagen-Display durchgesetzt (Schmiedl and Dübel 2004).

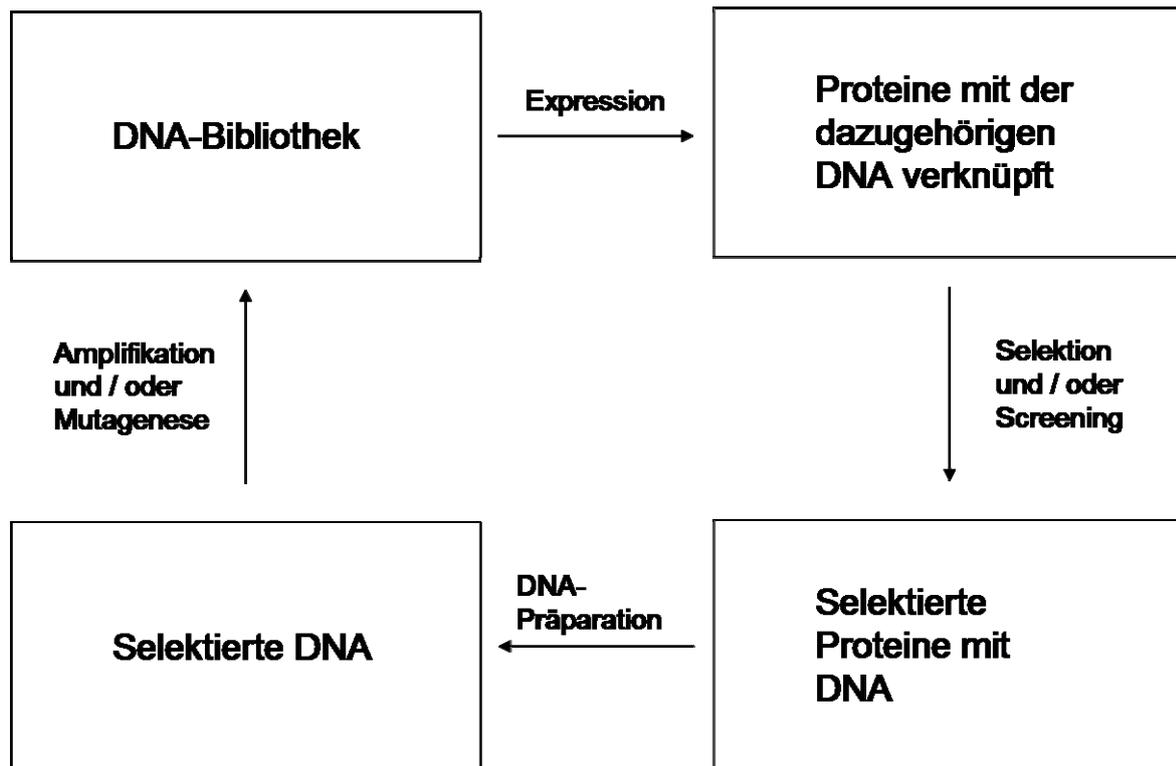


Abbildung 1-5: Allgemeine Strategie von Screening- und Selektionssystemen (nach Lin and Cornish 2002)

Phagen-Display ist eine Methode, mit der Proteine, wie rekombinante Antikörperfragmente, die an ein Target binden *in-vitro* selektiert und identifiziert werden können. Die Bibliothek wird so in ein Phagemid kloniert, dass die Antikörperfragmente in *E. coli* N-terminal an das M13-Phagenhüllprotein pIII fusioniert exprimiert werden (McCafferty et al. 1990; Clackson et al. 1991). Das Phagemid wird in *E. coli* transformiert, die anschließend von M13-Helferphagen infiziert werden. Die präparierten Phagen präsentieren das an das Hüllprotein pIII fusionierten Antikörperfragment (Hust and Dubel 2005; Konthur et al. 2005). Je größer die Bibliothek desto höher sind die potentiellen Bindungsaffinitäten der selektierten Proteine. Die Diversität, d. h. die Anzahl unterschiedlicher Proteine, die auf den Phagen präsentiert werden, liegt bei bis zu  $10^{10}$  (Kersten et al. 2002). Die präparierten Phagen mit den verpackten Phagemiden (Genotyp) und dem präsentierten Proteinen (Phänotyp) werden, in

einem als *Panning* bezeichneten Vorgang, zu immobilisierten Targets gegeben. Phagen mit bindenden Proteinen binden das Target und werden so immobilisiert. Anschließend werden nicht-bindende Phagen mittels Waschschriffen weggewaschen. Nach der Elution des Phagen werden neue *E. coli* infiziert, Phagen präpariert und die Selektion mehrmals (3-5x) wiederholt. Abschließend wird die Antikörperfragment-DNA aus Einzelklonen präpariert (Abbildung 1-6; Schmiedl and Dübel 2004)

#### 1.4.7. Intrabodies

Rekombinante Antikörperfragmente, die im Inneren der Zelle wirksam sind, d. h. intrazelluläre Targets binden können, (schematisch in Abbildung 1-2 B-D), werden als Intrabodies bezeichnet (Dübel et al. 2004). Die Bindung kann in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle, wie Zytoplasma oder Endoplasmatisches Retikulum (Biocca and Cattaneo 1995) stattfinden. Um funktionelle Intrabodies zu gewinnen, werden rekombinante Antikörperbibliotheken *in-vivo* auf Interaktion mit einem Protein gescreent. Dabei handelt es sich meist um kleine Formate wie scFv, die im Cytoplasma eine dreidimensionale Struktur, auch ohne passende Chaperone, einnehmen können und keine Disulfidbrücke benötigen, weil deren Bildung im reduzierenden Milieu des Cytoplasma nicht möglich ist.

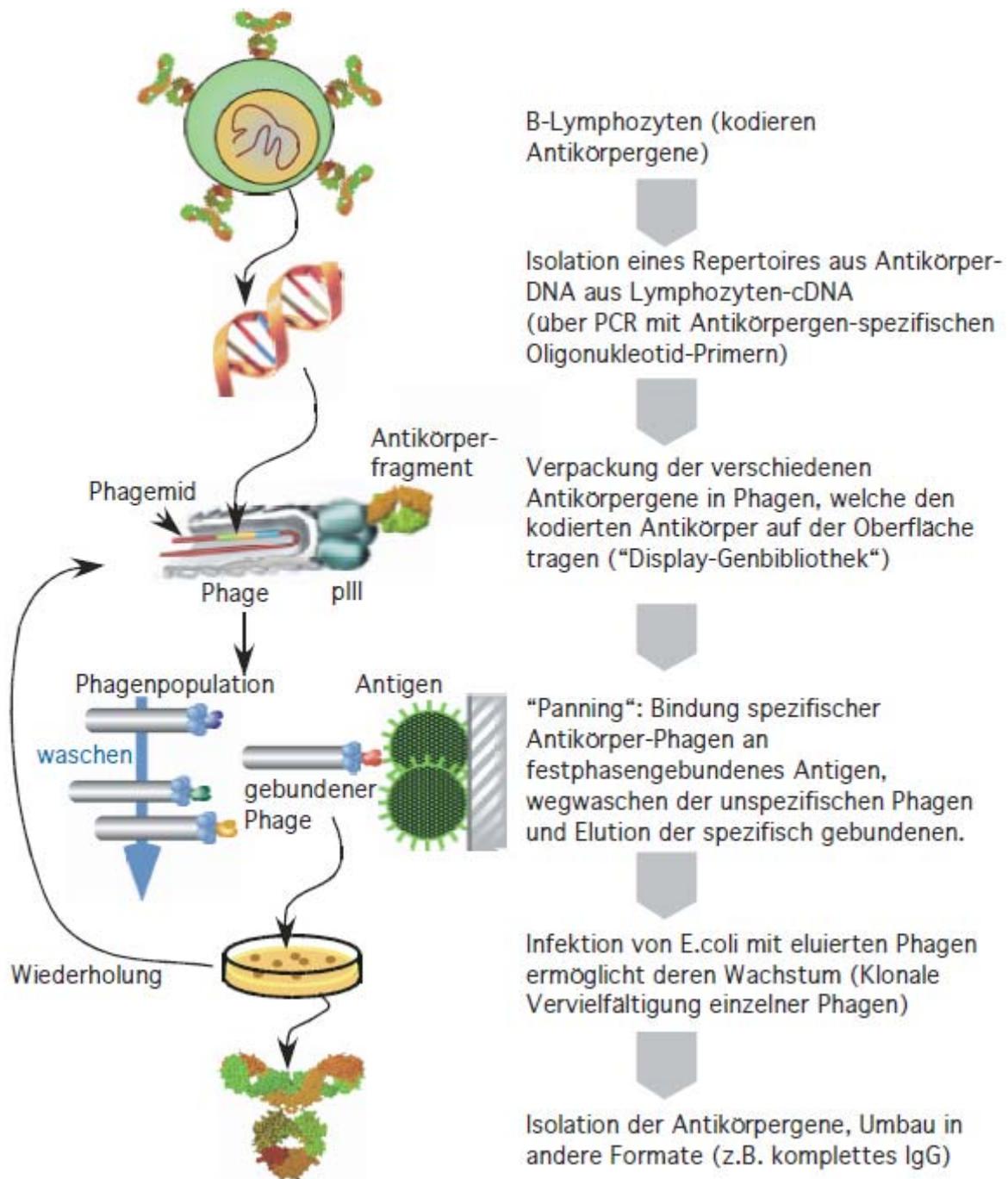
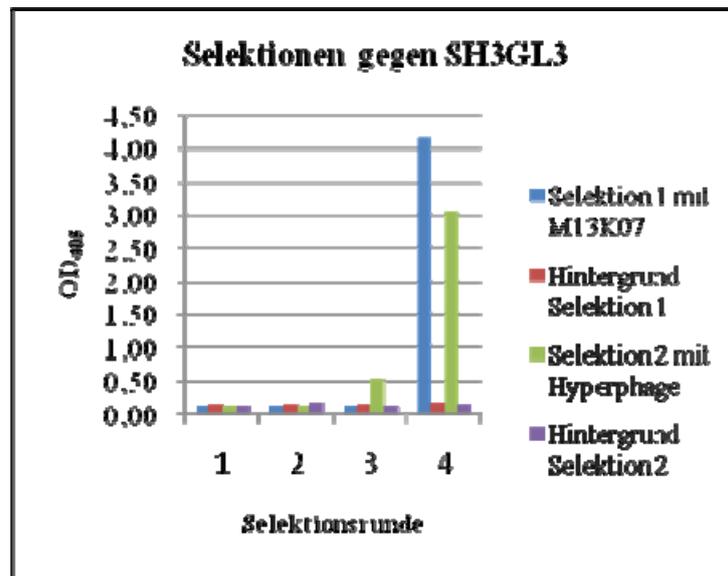


Abbildung 1-6: schematische Darstellung eines Phagendisplay zur Selektion von rekombinanten Antikörperfragmenten (Schmiedl and Dübel 2004)

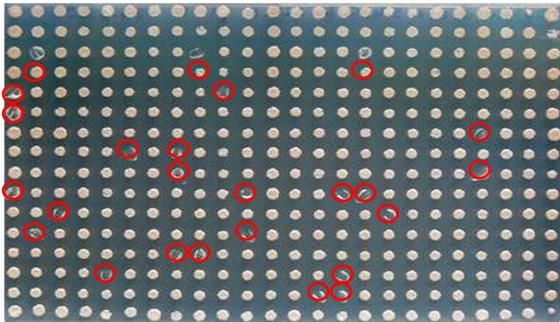
## 1.5. Vorarbeiten

Die Grundlage dieser Arbeit lieferte der Inhibitionsscreen, den Susanne Weber im Rahmen ihrer Bachelorarbeit (TU-Braunschweig 2009) mit dem Titel „Identifizierung funktioneller Intrabodies für die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in SCA2“ im Jahr 2009 durchgeführt hat. Im Rahmen ihrer Arbeit wurden durch Phagen-Display angereicherte scFv-Fragmente in einen Yeast-Two-Hybrid Assay hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung der Interaktion von bait- und prey-Protein untersucht. Die Anreicherung wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Theam Soon Lim mit dem Titel „Parameters affecting phage display library design for improved generation of human antibodies“ (FU Berlin 2009) aus der Tomlinson I Bibliothek durchgeführt. Beim *Panning* wurde das Protein Endophilin A3 (SH3GL3) als Target verwendet. Die Anreicherung wurde im ELISA mit polyklonalen Phagen (siehe Abbildung 1-7) überprüft. Nach Umklonierung in einen Hefvektor und Transformation in Hefe wurden Einzelklone zufällig gepickt und auf ihre inhibitorische Wirkung hin untersucht (Abbildung 1-8).

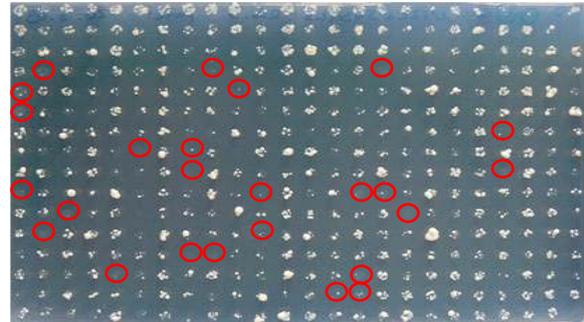


**Abbildung 1-7: Ergebnisse der Anreicherung spezifisch bindender Phagen im polyklonalen Phagen-ELISA.** Die Phagen wurden im Selektionsprozess entweder in allen Runden mit M13K07-Helferphagen (Selektion 1) oder initial mit Hyperphagen und in den weiteren Runden mit M13K07-Helferphagen (Selektion 2) hergestellt. Bei der Selektion gegen SH3GL3 ergab sich eine Anreicherung Antigen-spezifischer Phagen bei Selektion 1 in Runde 4 und bei Selektion 2 in den Runden 3 und 4. (Diplomarbeit Weber TU Braunschweig 2009)

384-well-Hefekontrollplatte



384-well-Hefeselektionsplatte



**Abbildung 1-8: 384-well-Platten des Inhibitionsscreen zwischen Ataxin 2 und SH3GL3 als repräsentatives Beispiel für das *in-vivo* Screening im Yeast-2-Hybrid-System.** Die roten Kreise zeigen die Hefekandidaten, die zwar auf der Kontrollplatte, aber nicht auf der Selektionsplatte wachsen. Diese Hefekandidaten dienen als Hefekandidaten für die Validierung (Diplomarbeit Weber TU Braunschweig 2009).

## 1.6. Zielsetzung der Arbeit

Die innovative Idee der Gewinnung funktioneller Intrabodies aus einer scFv-Bibliothek in einen 2-Stufen *in-vivo* / *in-vitro* Selektionsverfahren sollte in dieser Diplomarbeit validiert werden. In der Bachelorarbeit von Susanne Weber wurden potentielle Hefekandidaten gefunden, in denen die Intrabodies das Wachstum der Hefe inhibieren. Jedoch wurden diese Hefekandidaten keiner systematischen Validierung unterzogen. Diese Diplomarbeit soll sich mit der Frage beschäftigen, ob die in einem derartigen Screen gefundenen Hefekandidaten, *in vivo* Protein-Protein-Interaktion inhibieren und wie die Validierung der Intrabodies optimiert werden muss um Binder dieser Art zu erhalten. Am Beispiel der gefundenen anti-SH3GL3 Hefekandidaten des *in-vivo* Screen gegen die Interaktion von SH3GL3 mit Ataxin 2, sollen die nötigen Schritte einer Downstream-Evaluation optimiert werden. Ein besonderes Augenmerk gilt dabei der Oligoklonalität der Hefe, da eine Hefezelle mehr als ein Plasmid (auch unterschiedlicher Natur) enthalten kann. Des weiteren sollen von den identifizierten Intrabodies die DNA-Sequenz ermittelt werden und ausgewählte Kandidaten in einen Säugerexpressionsvektoren umklontiert werden. Anschließend soll der Einfluss der Expression von Intrabodies auf die Formation von *Stress granules* nach oxidativen Stress fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Laborgeräte und Zubehör

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose-Gelkammern mit Kämmen	MPI für molekulare Genetik
Assayplatten	Nunc, Roskilde, Dänemark; Genetix, Hampshire, UK
Digitales pH-/ mV-/ Thermometer	Greisinger, Regenstauf
Electrophoresis Power Supply EPS 200, 300, 301, 600	Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektroporator Micro Pulser™	BioRad, München
Erlenmeyerkolben 250 ml, 500 ml, 1000 ml	Schott, Mainz
Flockeneisbereiter AF20	Scotsman, Vernon Hills, USA
Geldokumentation GeldDoc 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
Glasflaschen 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml	Schott, Mainz
SDS Gel Färbekammer	

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
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
Brutschrank Heraeus B6200	Heraeus, Hanau
CO <sub>2</sub> -Inkubator für die Zellkultur Cytoperm2	Heraeus, Hanau
Inkubationsschüttler Innova™ 4430 (37 °C oder 30°C)	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kühlbrutschrank IPP 500 (37 °C)	Memmert, Schwabach
Mikrotiterplattenschüttler ThermoShaker PST- 60HL-4	Lab4You, Berlin
Mikroskop Leica DMIL	Leica, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop LSM 700 meta	Zeiss, Oberkochen
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

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Magnetrührer MR3001	Heidolph, Schwabach
Roller TRM-V	IDL, Nidderau
Schüttler	Gerhardt, Königswinter
Thermomixer comfort 5355	Eppendorf, Hamburg
Wipptisch Rocky	Fröbel, Lindau
Sterilwerkbank Microflow Laminar Flow Workstation	Kendro, Langenselbold
Sterilwerkbank Heraguard HPH 18	Heraeus, Hanau
Sterilwerkbank Hera Safe HSP 12	Heraeus, Hanau
Anlage zur Herstellung von bidestilliertem Wasser	
Werner Reinstwassersystem NANOpure Diamond	Barnstead, Dubuque, USA
Zentrifuge 5810 R (mit Kühlsystem)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Cryo-Röhrchen mit Schraubverschluss	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deckgläschen	Carl Roth, Karlsruhe
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
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 Maxisorb	Nunc, Roskilde, Dänemark
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

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
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

<b>Lösung / Puffer</b>	<b>Zusammensetzung bzw. Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
PBS 1x; pH 7,4  Stock 10x	2,5g/l Kaliumchlorid  80g/l Natriumchlorid  14,3 g/l Dinatriumhydrogenphosphat  2,5 g/l Kaliumdihydrogenphosphat	alle 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>Lösung / Puffer</b>	<b>Zusammensetzung bzw. Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose	0,6 - 1,2 g Agarose / 100 ml 0,5x TBE)	Invitrogen, Carlsbad, USA
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
Substratpuffer 50 mM Citratpuffer, pH 4,3	50 mM Trinatriumcitrat 50 mM Zitronensäure	Alle Merck, Darmstadt
TE-Puffer pH 7,7	10 mM Tris-Hydrochlorid 1 mM EDTA pH 8,0	Sigma, Steinheim
Hefe-Transformations- mix 1	100 mM Lithiumacetat 1 M Sorbitol 5 mM TE-Puffer	Sigma, Steinheim Sigma, Steinheim
Hefe-Transformations- mix 2	100 mM Lithiumacetat 40 % PEG 3350 5 mM TE-Puffer	Sigma, Steinheim Sigma, Steinheim
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
Lysispuffer nativ; pH 8,0	50 mM Natriumdihydrogen- phosphat 300 mM Natriumchlorid 10 mM Imidazol	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, München

<b>Lösung/ Puffer</b>	<b>Zusammensetzung bzw. Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
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  300 mM Natriumchlorid  250 mM Imidazol	Merck, Darmstadt  Merck, Darmstadt  Sigma-Aldrich, München
MES-Laufpuffer 1x	Stock 20x in H <sub>2</sub> O 1 M MES 1 M Tris-Base 69,3 mM SDS 20,5 mM EDTA	Sigma, Steinheim Merck, Darmstadt Carl Roth, Karlsruhe Sigma, Steinheim
Laemmli-Puffer 4x	0,2 M Tris-Hydrochlorid pH 6,8 8 % SDS 40 % (w/v) Glycerol 0,004 % Bromphenolblau 5 % β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt Carl Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt
Coomassie-Färbelösung	1,25 g Coomassie Brilliant Blue R- 250  225 ml Ethanol technisch 225 ml H <sub>2</sub> O 50 ml Eisessig	Sigma, Steinheim  Merck, Darmstadt  Carl Roth, Karlsruhe
Entfärbelösung	10 % Essigsäure 20 % Ethanol 70 % H <sub>2</sub> O	Carl Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt

<b>Lösung/ Puffer</b>	<b>Zusammensetzung bzw. Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Blotting-Puffer	3 g/l Tris-Base 14 g/l Glycin	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt
NEB Puffer Nr. 2 und 3, 10x		New England Biolabs, Frankfurt am Main
Taq Polymerase Puffer, 10x		MPI für Molekulare Genetik
Ligase Puffer, 10x		New England Biolabs, Frankfurt am Main
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
EXGene 500 (Polyethylenimin)		Fermentas, St. Leon-Rot
Glycerol	87 %	Merck, Darmstadt
Harnstoff	p. A.	AppliChem, Darmstadt
Heringssperma-DNA		Sigma, Steinheim
Immersionsöl 518F		Zeiss, Oberkochen

<b>Lösung/ Puffer</b>	<b>Zusammensetzung bzw. Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
IS Mountung Medium	Zusatz von 0,1 % Natriumazid	Dianova, Hamburg
Methanol	100 %	Merck, Darmstadt
Natrium-meta-Arsenit	p. A.	Merck, Darmstadt
Nickel-NTA-Agarose		Qiagen, Hilden
Paraformaldehyd	16 %	Polysciences, Warrington, USA
2-Propanol	100 %	Merck, Darmstadt
Salzsäure	37 %	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA Lösung		Biochrom, Berlin
Wasserstoffperoxid	30 %	Merck, Darmstadt

#### 2.1.4. Medien und Zusätze

<b>Medium/ Zusatz</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller</b>
2xYT Medium	16 g/l Trypton  10 g/l Hefeextrakt  5 g/l Natriumchlorid	Becton, Dickinson and Co., New Jersey  Becton, Dickinson and Co., New Jersey  Merck, Darmstadt

<b>Medium/ Zusatz</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller</b>
2xYT-Agar	16 g/l Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l Natriumchlorid 15 g/l Agar	Becton, Dickinson and Co., New Jersey Becton, Dickinson and Co., New Jersey Merck, Darmstadt
YPD-Medium	20 g/l Bacto™ Trypton 10 g/l Bacto™ Hefeextrakt 20 g/l Glukose (17 g/l Bacto™ Agar für Festmedium)	Becton, Dickinson and Co., New Jersey Becton, Dickinson and Co., New Jersey Merck, Darmstadt Becton, Dickinson and Co., New Jersey, USA
SD -htlua-Medium	6,78 g/l Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren 20 g/l Glukose (20 g/l Bacto™ Agar für Festmedium)	Difco, Lawrence, USA  Merck, Darmstadt Becton, Dickinson and Co., New Jersey, USA
SD +hua-Medium	6,78 g/l Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren 20 g/l Glukose 0,2 g/l Adenin 0,2 g/l Histidin 0,2 g/l Uracil (20 g/l Bacto™ Agar für Festmedium)	Difco, Lawrence, USA  Merck, Darmstadt Sigma, Steinheim Sigma, Steinheim Sigma, Steinheim Becton, Dickinson and Co., New Jersey, USA

<b>Medium/ Zusatz</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller</b>
SD +hu-Medium	6,78 g/l Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren  20 g/l Glukose  0,2 g/l Histidin  0,2 g/l Uracil  (20 g/l Bacto™ Agar für Festmedium)  6,78 g/l Yeast Nitrogen Base  ohne Aminosäuren	Difco, Lawrence, USA  Merck, Darmstadt  Sigma, Steinheim  Sigma, Steinheim  Becton, Dickinson and Co., New Jersey, USA  Difco, Lawrence, USA
SD +hu-Einfriermedium	20g/l Glukose 1 M Betain 1 % Glycerol 0,2 g/l Histidin 0,2 g/l Uracil	Merck, Darmstadt Sigma, Steinheim Merck, Darmstadt Sigma, Steinheim Sigma, Steinheim
Adenin 100x	20 g/l in 0,1 M Natriumhydroxid	Sigma, Steinheim
Histidin 100x	20 g/l (w/v) in H <sub>2</sub> O	Sigma, Steinheim
Uracil 100x	20 g/l in 0,1 M Natriumhydroxid	Sigma, Steinheim
Ampicillin	Stock: 50 mg/ml in 50 % Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Stock: 34 mg/ml in 50 % Ethanol	Böhringer Mannheim
Glukoselösung	D-(+)-Glukosemonohydrat Stock: 40 % (w/v) in H <sub>2</sub> O	Alpha Aesar, Karlsruhe; Merck, Darmstadt

Medium/ Zusatz	Zusammensetzung	Hersteller
HMFM; pH 7,0	4 mM Magnesiumsulfat 15 mM Trinatriumcitrat 68 mM Ammoniumsulfat 36% Glycerol 130 mM Kaliumdihydrogenphosphat 270 mM Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt
IPTG	Stock: 1 M in H <sub>2</sub> O	Fermentas, St. Leon-Rot

### 2.1.5. Mikroorganismen

Mikroorganismus / Stamm	Genotyp	Anbieter/Herkunft
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F-mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 recA1 endA1 araD139 $\Delta$ (ara leu) 7697 galU galK rpsL nupG $\lambda$ -	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Escherichia coli</i> HB2151	ara $\Delta$ (lac-proAB) thi/F' pro A+B lacIq lacZ $\Delta$ M15	MPI für molekulare Genetik
<i>Escherichia coli</i> TG1	supE thi-1 $\Delta$ (lac-proAB) $\Delta$ (mcrB-hsdSM)5(rK- mK- )[F'traD36 proAB lacIqZ $\Delta$ M15]	Stratagene, La Jolla, USA
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) Star	F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm rne131 (DE3)	MPI für molekulare Genetik
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> L40ccua	MATa HIS3 $\Delta$ 200 TRP1-901 LEU2-3,112 LYS2::(lexAop)4- HIS3 URA3::(lexAop) 8-lacZ ADE2::KanMX4-(lexAop)8- URA3 GAL4 gal80 can1 cyh2	MPI für molekulare Genetik

### 2.1.6. Plasmide und Phagemide

Plasmid	Verwendung	Herkunft
pACT4-1b	“Prey”-Plasmid für den “Intrabody” Screen	AG Krobitch, Max Planck Institut für molekulare Genetik
pBTM116, pBTM117c, pBTM 118c	“Bait”-Plasmide für den “Intrabody” Screen	AG Krobitch, 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	Phagemid für die scFv- Expression in <i>E. coli</i>	Medical Research Council Cambridge
pRARE3	Helferplasmid für die Protein- expression (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	Herkunft
GPD 574f	5'-GATTGTAATTCTGTAAATC-3'	Sequenzier- primer	Invitrogen, Carlsbad, USA
5'scFv_HindIII _ pFLAG	5'-GAATTC AAGCTT GCCAC CATGGAGGTGCAGCTGTTG GAGTCT-3'	PCR-Primer	Invitrogen, Carlsbad, USA

<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Herkunft</b>
3'scFv_pFLAG	5' -AGGGGTACCGTGATGGT GATGATGATGTGCGGC-3'	PCR-Primer	Invitrogen, Carlsbad, USA
M13 REV	5'-CAGGAAACAGCTATGAC C-3'	Sequenzier- primer	MPI für molekulare Genetik
T7 Promotor Primer	5'-TAATACGACTCACTATA GGG-3'	Sequenzier- primer	MPI für molekulare Genetik
VH-tom-NcoI_f	5'-ACATGCCATGGCCGAGG TGCAGC-3'	PCR-Primer	Invitrogen, Carlsbad, USA
VL-tom- NotI_rev	5'-AAGGAAAAAAGCGGCC GCCCGTTTGATTTC-3'	PCR-Primer	Invitrogen, Carlsbad, USA

### 2.1.8. Enzyme

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
. Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Taq Polymerase	Max Planck Institut für molekulare Genetik
Phusion Taq Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Lysozym	Sigma, Steinheim

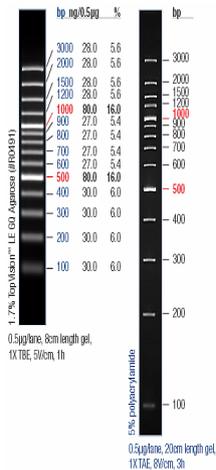
### 2.1.9. Antikörper und Nachweisreagenzien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Alexa 488-anti-Maus IgG	1:500	Invitrogen, Carlsbad, USA

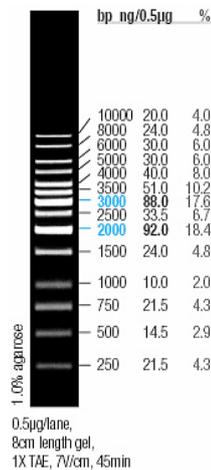
Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller
anti-ATXN2 (Maus)	1:200	BD Bioscience, San Jose, USA
anti-FLAG (Kaninchen)	1:500	Sigma-Aldrich, München
Alexa 656-anti-Kaninchen IgG	1:500	Dianova, Hamburg
Streptavidin-HRP	1:2500	Thermo Science, Bonn

### 2.1.10. DNA- und Proteinstandards

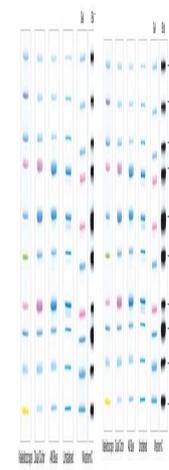
#### GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder



#### GeneRuler 1 kb DNA Ladder (alt)



#### Precision Plus Protein All Blue Standards



### 2.1.11. Kit-Systeme

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
Name	Verwendung	Hersteller
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Plasmidpräparation aus Bakterien	Peqlab, Erlangen

<b>Name</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller</b>
peqGOLD X Change Plasmid Maxi 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
Qiagen Effectene Transfection Reagent	Transformation in Säugetierzelllinien	Qiagen, Hilden

#### 2.1.12. Software und Webtools

<b>Bezeichnung</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Anbieter</b>
Axio Vision Release 4.7	Bildbearbeitung	Zeiss
LSM 700 meta	Fluoreszenzaufnahmen	Zeiss
Microsoft Office	Textverarbeitung, Bildbearbeitung und Tabellenkalkulation etc.	Microsoft
Photo Plus 6	Bildbearbeitung	Serif
Softmax Pro 4.8	ELISA-Auswertung	MindVision Software
Vector NTI Advance 10	Sequenzauswertung	Invitrogen
DNA Star Lasergene 8	Sequenzauswertung	Lasergene
ProtParam	Ermittlung der Proteinstabilität	<a href="http://www.expasy.ch">http://www.expasy.ch</a>
abdb	LIMS, Klon- und Mikrotiterplatten-Verwaltung	Eigenentwicklung der Arbeitsgruppe (V. Sievert)

## 2.2. Mikrobiologische Methoden

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

*E. coli*-Zellen wurden in 2xYT-Nährmedien kultiviert. Für Flüssigmedien wurden 31g/l 2xYT-Fertigmix in Pulverform in ddH<sub>2</sub>O eingerührt und autoklaviert. Für Festmedium wurden 46 g/l 2xYT-Agar-Fertigmix in ddH<sub>2</sub>O eingerührt und autoklaviert. Je nach Resistenz des Vektors wurden dem Medium 100 µg/ml Ampicillin oder 17 µg/ml Chloramphenicol zugesetzt. Für die Kultivierung von Expressionsklonen wurde 2% Glucose zugegeben.

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

Der für die Y2H-Versuche verwendete Hefestamm L40ccua wurde in YPD-Vollmedium kultiviert. Für Versuche in denen Intrabodies gescreent oder die inhibierende Wirkung validiert werden sollte wurden die Hefezellen in verschiedenen Selektionsmedien (SD-Medien) kultiviert.

### 2.2.3. Bestimmung der optischen Dichte von Bakterien- und Hefekulturen

*E. coli*- oder Hefezellen in Kultur wurden bis zu einer für das Experiment erforderlichen optischen Dichte inkubiert. Zur Überprüfung wurde im Photometer die Extinktion bei einer Wellenlänge von 600nm in Referenz zum sterilen Medium gemessen (OD<sub>600</sub>).

### 2.2.4. Herstellung und Lagerung von Bakterienkulturen

Für die Langzeitlagerung von Bakterien wurden Gefrierkulturen angesetzt. Dafür wurden *E. coli*-Kulturen entweder 1:1 mit 50%igem Glycerol vermischt oder direkt in Medium mit 10% HMFM A und 2,5% HMFM B angezüchtet. Die Lagerung erfolgte in beiden Fällen bei -80°C. Zur Reaktivierung wurde mit einer kleinen Menge der noch gefrorenen Kultur frisches 2xYT-Medium angeimpft und bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator inkubiert.

### 2.2.5. Herstellung und Lagerung von Hefekulturen

Die Hefezellen des Stammes L40ccua wurden bei 30°C ca. 24h im Hefegefrüermedium inkubiert und anschließend bei -80°C gelagert. Zur erneuten Kultivierung wurden Zellen aus der gefrorenen Stammkultur entnommen und auf YPD- oder entsprechendem SD-Agar

ausplattiert und die Platte bei 30 °C für drei Tage inkubiert. Anschließend wurde ein Einzelklon in entsprechende Flüssigkultur übernommen und ebenfalls bei 30 °C für 24-48h im Schüttelinkubator inkubiert.

#### 2.2.6. Herstellung elektrokompetenter Zellen

Bei der Elektroporation, einer Methode zum Permeabilisieren von Zellmembranen um DNA in prokaryotische Zellen (Transformation) oder eukaryotische Zellen (Transfektion) einzuschleusen, benötigt man Zell- und Plasmid-DNA-Lösungen, die frei von Salzen und anderen Verunreinigungen sind. Aus diesem Grund werden die Zellen mit mehreren Waschschritten gewaschen und aufkonzentriert. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Zellen während der gesamten Zeit auf zwischen 0°C und 4°C gekühlt bleiben um eine möglichst große Kompetenz zu erreichen. Für einen Vorrat von etwa 80 Tubes elektrokompetente *E. coli* in Aliquots á 50µl wurde eine Vorkultur von 50ml 2xYT-Medium mit 2% Glukose in einem 250ml Erlenmeyerkolben mit Bakterien aus einem Glycerol-Stock angeimpft. Die Bakterien wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Alle benötigten Materialien wie Zentrifugengefäße, Falcontubes und Millipore-Wasser wurden vor Beginn der Präparation bereits bei 4°C vorgekühlt. Mit der gesamten Vorkultur wurden am darauf folgenden Tag zwei 2l-Erlenmeyerkolben mit je 500ml auf 37°C vorgewärmtem 2xYT-Medium mit 2% Glukose angeimpft und für ca. eine Stunde bis  $OD_{600}=0,25-0,35$  bei 37°C im Inkubationsschüttler inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten  $OD_{600}$  wurde der Erlenmeyerkolben für 30 Minuten unter gelegentlichem Schütteln auf Eis abgekühlt. Die Kulturen wurden in zwei vorgekühlte Zentrifugenbecher überführt und für 15 Minuten bei 4°C und 3200 g im Ausschwingrotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in 250ml eiskaltem Millipore-Wasser resuspendiert und für 15min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 3200 g, wurde jedes Zellpellet erneut in 100ml eiskaltem Millipore-Wasser resuspendiert, in zwei Falcontubes überführt und für 15min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 3200 g wurde jedes Pellet mit 25ml eiskaltem 10%igen Glycerol resuspendiert und für 15min auf Eis inkubiert. Nach der letzten Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 3200 g wurden alle Zellpellets zusammen in 2,5ml eiskaltem 10%igen Glycerol resuspendiert. Es wurden 50µl Aliquots in 0,5ml Eppendorfgefäßen hergestellt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

### 2.2.7. Transformation in *E. coli* mittels Elektroporation

1-5 µl der Plasmid-DNA bzw. der Ligationsansätze wurden zu 50 µl elektrokompenten Zellen (meist *E. coli* des Stamms DH10B) gegeben. Falls die DNA aus Hefezellen präpariert wurde, wurden 2 µl für die Elektroporation verwendet. Der Ansatz wurde durchgemischt und in eine auf Eis vorgekühlte 0,1cm Küvette überführt. Es wurde mit dem Programm Ec1 im MicroPulser (BioRad) elektroporiert. Bei erfolgreicher Transformation (ca. 5ms Puls) wurde 1000 µl 2xYT-Medium mit 2% Glukose zu dem Ansatz gegeben, gemischt und in ein frisches 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden 100 µl des Ansatzes auf eine 2xYT-Agarplatte mit 2% Glukose und entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Der restliche Transformationsansatz wurde bei 3000rpm für 3min bei RT zentrifugiert, und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde im verbliebenen Medium resuspendiert und komplett auf eine andere 2xYT-Agarplatte ausgestrichen. Nach einer Inkubation von 18-24h bei 37°C können Einzelklone weiterverwendet werden.

### 2.2.8. Chemische Transformation in Hefezellen des Stammes L40ccua

Mit einem frisch ausgestrichenen Klon des Hefestamms L40ccua wurde eine 3ml üN-Kultur (YPD-Medium) angeimpft und für ca. 18h bei 30°C inkubiert. Die Vorkultur wurde am anschließend in 30 ml YPD-Medium überführt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 inkubiert. Nach der Zentrifugation (5min, 3200 g, RT) wurde das Zellpellet mit TE-Puffer gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5min, 3200g, RT) wurden das Zellpellet in 1ml Hefetransfektionsmix 1 resuspendiert und 10min bei RT inkubiert. 40µl der vorbereiteten Hefezellen wurden zu jeweils 500ng der Plasmid-DNA (max. 12 µl), 5 µl Heringssperma-DNA (10 µg/µl) und 230 µl Hefetransfektionsmix 2 hinzugegeben und anschließend für 30min bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von 30µl DMSO wurde mit den Transfektionsansätze für 7min ein Heat-Shock bei 42 °C im Wasserbad durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen (5min, 3200g, RT) zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 50µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und auf SD II-Agarplatten ausplattiert und für drei Tage bei 30°C inkubiert. Falls Intrabodyplasmide (pIB NLS Ade) in einen Klon transformiert wurden der bereits bart- und prey-Plasmid enthielt wurde, die Inhibitionskompetenz validiert indem vier Klone auf SD+hu-Platten ausplattiert oder direkt in SD +hu Einfriermedium in einer 96-well-Platte eingerührt wurden. Diesen Klone wurden auf SD +hu- (Kontrollplatte) und SD -htlua-Agarplatten (Selektionsplatte) replikaplattiert. Die

Platten wurden für 3-6 Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend das Wachstum der Kolonien (siehe Resultate) analysiert.

## **2.3. Molekularbiologische Methoden**

### 2.3.1. Agarose-Gelelektrophorese

Um Plasmide oder DNA-Fragmente ihrer Größe und Konformation entsprechend aufzutrennen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden Agarosegele mit 0,5x TBE-Puffer und 0,0005 % Ethidiumbromid hergestellt. Die DNA wurde mit Ladepuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und die Auftrennung für 25 min bei 100V durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte mittels CCD-Kamera bei 306nm in der GelDoc 2000 Anlage. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und macht sie unter UV-Strahlung durch Fluoreszenz sichtbar. Zur Größenbestimmung wurden verschiedene Marker verwendet, die DNA bestimmter Größe und Konformation beinhalten und daher eine Größenabsätzung möglich machen.

### 2.3.2. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nach der Elektrophorese restringierter Plasmide oder von PCR-Fragmenten wurden die Banden der gewünschten Größe unter UV-Strahlung detektiert und mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein 2ml Eppendorfgefäß überführt. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben. Die DNA wurde nach der Säulenaufreinigung in 32 µl auf 37°C vorgewärmten ddH<sub>2</sub>O von der Anionenaustauschersäule eluiert.

### 2.3.3. DNA-Aufreinigung mit dem PCR-Purification Kit

Um Plasmide oder DNA-Fragmente nach einem Restriktionsverdau oder einer PCR aufzureinigen wurde das peqGOLD Cycle Pure Kit von Peqlab verwendet. Die Aufreinigung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA wurde in 32 µl auf 37°C vorgewärmten ddH<sub>2</sub>O von der Anionenaustauschersäule eluiert.

#### 2.3.4. Plasmidpräparation aus *E. coli*

Für die Plasmidpräparation stehen verschiedene Kit-Systeme zur Verfügung. Zur parallelen Präparation größerer Mengen an Samples wurde das Plasmid Miniprep Kit I von Peqlab verwendet. Für high-copy-Plasmide wurden dafür 4-5ml Übernachtskultur verwendet. für low-copy-Plasmide waren 9-10ml erforderlich. Die Präparation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die DNA mit 50µl auf 37°C vorgewärmten ddH<sub>2</sub>O von der Anionenaustauschersäule eluiert. Zur Präparation der DNA einzelner Klone in größerer Ausbeute und besserer Qualität fand der peqGOLD X Change Plasmid Maxi Kit Verwendung. Dazu wurden bei high-copy-Plasmiden mit 100ml Bakterienkultur und bei low-copy-Plasmiden 500ml Bakterienkultur verwendet. Abweichend von den Herstellerangaben wurde die Zentrifugationsschritte bei 3200 g für eine längere Zeit durchgeführt. Die Klärung des Lysats erfolgte mittels zweier Zentrifugationsschritte. Die pelletierte Plasmid-DNA wurde in 200µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und die Konzentration im Nanodrop bestimmt.

#### 2.3.5. Präparation von Plasmid-DNA aus Hefezellen

Je nach Plasmid wurden 5ml YPD oder SD-Medium mit einer Einzelkolonie oder mit etwas gefrorener Kultur angeimpft und für 48 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Hefezellen des Stammes L40ccua wurden bei 3000 rpm für 3min bei RT zentrifugiert und der komplette Überstand entfernt. Anschließend wurde das Zellpellet mit 1ml TE-Puffer gewaschen und wie bei 3000 rpm für 3min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 100 µl Zymolyase-Puffer resuspendiert und die Ansätze bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von P2-Puffer wurde erneut für 30 min bei RT inkubiert, bevor mit Trockeneis oder flüssigem Stickstoff die Ansätze schockgefroren wurden. Nachdem die Ansätze bei RT aufgetaut wurden, folgte die Zugabe von 500 µl N3 Puffer sowie 50 µl RNase A Lösung. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 4°C wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 14000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde auf eine DNA-Bindesäule des Plasmid Miniprep Kit I von Peqlab gegeben. Das weitere Vorgehen erfolgte nach Herstellerangaben. Nach Elution des Plasmids in 50 µl ddH<sub>2</sub>O von der Anionenaustauschsäule wurde die Konzentration der DNA im Nanodrop bestimmt.

#### 2.3.6. Messung der DNA-Konzentration im NanoDrop 1000 Spektralphotometer

Zur Messung der DNA-Konzentration wurde das NanoDrop 1000 Spectrophotometer nach Herstellerangaben verwendet. Es wurde in der beiliegenden Software die Messung von

„Nucleic Acids“ eingestellt (Messung bei der Wellenlänge 260nm). Anschließend wurde das Gerät mit ddH<sub>2</sub>O kalibriert. Als Referenz diente ddH<sub>2</sub>O oder der genutzte Elutionspuffer. Die Messung der Proben und der Referenzen erfolgte indem man 1,25 µl direkt auf die Messoberfläche pipettiert, so dass ein gut sichtbarer Tropfen entsteht. Die Messung wird mit Hilfe der mitgelieferten Steuerungs- und Analysesoftware gestartet. Die Software gibt die Konzentration sowie ein Spektrum zur Analyse der Qualität der Probe aus.

### 2.3.7. Polymerase-Kettenreaktion PCR

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden PCRs durchgeführt. Bei dieser Reaktion wird das gewünschte DNA-Fragment von zwei Primern flankiert und anschließend in einer zyklischen enzymatischen Reaktion vervielfältigt. Die PCR-Reaktionen wurden im Peltier Thermal Cycler PTC200 durchgeführt.

Für Standardanwendungen wurde die hauseigene Taq-Polymerase (Zusammensetzung und Beispielprogramm (siehe Tabelle 2-1 und Tabelle 2-2) verwendet.

Für Präparationen bei denen es auf Genauigkeit der Fragmente ankam wurde Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase von NEB verwendet, die sich durch hohe Genauigkeit, Stabilität sowie einen „Hot Start“ auszeichnet. die Phusion Taq enthält einen inerten Inhibitor, der bei niedrigen Temperaturen reversibel blockiert, während er bei Temperaturerhöhung auf 98°C abgelöst wird. Da es sich um eine andere Polymerase handelt sind Programm sowie Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (siehe Tabelle 2-3 und Tabelle 2-4) modifiziert.

**Tabelle 2-1: Pipetierschema eines PCR-Ansatzes**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen 1x</b>
Taq-Polymerase Puffer (10x)	5
dNTPs (2,5 mM)	4
Primer „forward“ (10 µM)	1
Primer „reverse“ (10 µM)	1
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5
ddH <sub>2</sub> O	37,5
Template	1
Gesamtvolumen	50

**Tabelle 2-2: Beispielprogramm einer Standard-PCR**

<b>Schritt</b>	<b>T in °C</b>	<b>Zeit</b>	<b>Schritt</b>
1	95	5 min	Denaturierung
2	95	30 s	Denaturierung
3	53-60	30 s	Primerannealing
4	72	45 s	Elongation
5	go to 2	15-30x	Zykluswiederholung
6	72	4 min	Finale Elongation
7	4	unendlich	Lagerung

**Tabelle 2-3: Pipetierschema eines Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase -Ansatzes**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen 1x</b>
Phusion-Polymerase Puffer (5x)	10
dNTPs (2,5 mM)	4
Primer “forward” (10 µM)	1
Primer “reverse” (10 µM)	1
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5
ddH <sub>2</sub> O	32,5
Template	1
Gesamtvolumen	50

**Tabelle 2-4: Programm einer Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase PCR**

<b>Schritt</b>	<b>T in °C</b>	<b>Zeit</b>	<b>Schritt</b>
1	98	1 min	Denaturierung
2	98	15 s	Denaturierung
3	>60	30 s	Primerannealing
4	72	15 s	Elongation
5	go to 2	15-30x	Zykluswiederholung
6	72	4 min	Finale Elongation
7	4	?	Lagerung

### 2.3.8. Restriktionsverdau

Um DNA-Fragmente miteinander ligieren zu können müssen diese kompatible Überhänge bzw. Enden ohne Überhänge besitzen. Dies erreicht man, in dem man die Fragmente mit geeigneten Restriktionsendonukleasen (Ansatz siehe Tabelle 2-5) verdaut. Diese „schneiden“ DNA durch Spaltung der Phosphordiesterbindung an Erkennungssequenzen, die für jede Endonuklease spezifisch ist. Dabei handelt es sich meist um palindromische Sequenzen, d. h. beide Stränge haben in einer Richtung z. B. 3'-5' die gleiche Sequenz. Der Erfolg des Restriktionsverdau wurde mit einem Agarosegel überprüft.

**Tabelle 2-5: Restriktionsverdau mit zwei Enzymen**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
ddH <sub>2</sub> O	32,5
100 x BSA	0,5
10 x NEB-Puffer	5
Plasmid	10
Enzym 1	1
Enzym 2	1
Gesamtvolumen	50

### 2.3.9. Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden eingesetzt, um ein DNA-Fragment bzw. eine Bibliothek an DNA-Fragmenten mittels kompatiblen Enden in einen Vektor zu integrieren. Dazu wurde die T4 DNA Ligase verwendet, die unter ATP-Verbrauch die DNAs unter Bildung eines anorganischen Esters zwischen den Phosphatresten der Desoxyribose verknüpft. Es wurde ein molares Insert-Vektorverhältnis von 1:3 verwendet, um eine mögliche Religation des Vektor möglichst gering zu halten. Die Ligationen wurden meist über Nacht bei 4°C durchgeführt oder 4h bei RT. Anschließend wurde eine Ethanolpräzipitation durchgeführt, um die DNA für die Transformation aufzureinigen und aufzukonzentrieren.

**Tabelle 2-6: Ligationsansatz für die Integration eines Inserts in einen Vektor im molaren Verhältnis 3:1**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen in <math>\mu\text{l}</math></b>
T4 Ligase Puffer (10x)	1
T4 Ligase	0,7
„Insert 700 bp“ 21ng	x
„Vektor 4600 bp“ 50ng	y
ddH <sub>2</sub> O	8,3-x-y
Gesamtvolumen	10

### 2.3.10. Ethanolpräzipitation

Bei der Ethanolpräzipitation wird die DNA durch Ausfällen aufgereinigt und anschließend durch Verwendung von geringem Volumen ddH<sub>2</sub>O aufkonzentriert. Die Ethanolpräzipitation wurde auf Eis durchgeführt. Zur Probe wurde 1/10 des Volumen 7,5M Ammoniumacetatlösung, das 2,5-fache Volumen auf -20 °C vorgekühlter 100% Ethanol und 2  $\mu\text{l}$  Glycoblue hinzugegeben. Das Glycoblue erhöht durch Glykogen die Fällungseffizienz und erleichtert die Sichtbarkeit des DNA-Pellets. Die Probe wurde für 30min bei -20°C gelagert und anschließend mit 20000 g bei 4 °C für mindestens 30 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstand wurde das DNA-Pellet mit 200 $\mu\text{l}$  auf -20 °C vorgekühlten 70% Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (20000 g bei 4 °C für 30 Minuten) wurde der Überstand komplett mit einer Pipette abgenommen, das DNA-Pellet für 20-30 Minuten luftgetrocknet und anschließend je nach gewünschter Konzentration und Anwendung in 2-10 $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und für weitere Anwendungen verwendet.

### 2.3.11. Sequenzierung

Es wurde durch Replikaplattierung eine 384-*well*-Platte mit 2xYT-Einfriermedium angeimpft und für 18-24h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde in der Service Abteilung des Max Planck Instituts für molekulare Genetik die Plasmidpräparation sowie die Sequenzierung mit dem Sanger-Verfahren durchgeführt.

## 2.4. Zellbiologische Methoden

### 2.4.1. Kultivierung von Säugetierzellen

Für Lokalisationsstudien wurde die Zelllinie HEK (**H**uman **E**mbrionic **K**idney; menschliche embryonale Nierenzellen) verwendet. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium (DMEM mit 10 % FKS (**F**etales **K**älberserum) und einem Antibiotika-Mischung aus Penicillin (0,05U/ml) und Streptomycin (0,5 µg/ml) im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurden diese alle drei bis fünf Tage mit sterilem 1x PBS gewaschen , anschließend mit 1 ml 5x Trypsin/EDTA-Lösung von der Kulturflasche abgelöst und verdünnt in eine neue Kulturflasche mit frischem Medium überführt.

### 2.4.2. Transfektion von Säugetierzellen mit dem Effectin Kit von Qiagen

Die Zellen wurden vor der Transfektion auf Deckgläschen (in 1 ml Medium / *well* in Zellkultur-Testplatten) mit einer Konfluenz von 30-50 % ausgesät und anschließend für 24 h im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden, wie in Tabelle 2-7 angegeben gezeigt, die Transfektionsansätze mit dem Effectin-Kit von Qiagen nach Herstellerangaben vorbereitet und auf die Zellen transferiert.

**Tabelle 2-7: Pipettierschema zum Ansetzen eines Transfektionsansatzes für 12-*well*-Mikrotiterplatten**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
DNA (0,3µg)	2-10 µl
Enhancer aus Kit	2,4 µl
EC-Puffer	75 µl
Effectin	6 µl
Medium mit Zusätzen	ca. 810 ml
Gesamtvolumen	ca. 900 ml

Zellen die oxidativen Stress ausgesetzt werden sollen, wurden mit frischem Medium, das 5 µl 100 mM Natrium-meta-Arsenit beinhaltet, versetzt und anschließend für 1 h im Brutschrank inkubiert.

### 2.4.3. Fluoreszenzmikroskopie

Die transient transformierten Zellen wurden ca. 18h nach der Transfektion zur Analyse mit dem Fluoreszenzmikroskop vorbereitet. Die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen und anschließend 10 min bei RT mit 0,5 ml 2 % Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen werden für 10 min in 0,5 ml eiskaltem Methanol / *well* inkubiert, was zur Permeabilisierung der Zellwände führt. Dann wurden die Zellen 30 min mit 0,5 ml 3% BSA blockiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Primärantikörpern (200 µl anti-ATXN2 1:200 und anti-FLAG 1: 500 verdünnt in 3 % BSA). Die Ansätze wurden zwei Stunden bei RT inkubiert und anschließend mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde bei RT mit den fluorochrom gekoppelten Sekundärantikörpern Alexa 488-anti-Maus IgG und Alexa 658-anti-Kaninchen IgG (beide 1:500 verdünnt in 3 % BSA) inkubiert. Nach drei Waschschritten mit 1x PBS erfolgte die Färbung der Zellkerne durch 20 sec Inkubation mit Hoechst (Bisbenzimid, 200 µl, 1 µl Hoechst in 500 µl 1x PBS). Anschließend wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Präparate mit je 5 µl Mountingmedium eingedeckelt. Das Mountingmedium unterstützt eine gleichmäßigere Fluoreszenz und verhindert ein schnelles Verblässen. Die Mikroskopie wurde mit dem Laser-Scanning-Mikroskop LSM-700 von Zeiss und dem Objektiv Plan-Apochromat2 63x/1,40 Oil DIC unter Ölimmersion durchgeführt. Die Aufnahmen wurden anschließend mit dem Programm Axio Vision Release 4.7 bearbeitet.

### 3. Resultate

#### 3.1. Screening und Validierung funktioneller Intrabodies

##### 3.1.1. Phagen-Display und Screening in der Hefe

Das Vorgehen zur Gewinnung funktioneller Intrabodies ist schematisch in Abbildung 3-1 zu sehen. In dieser Arbeit wurden Intrabodies selektiert, die die Interaktion zwischen Ataxin 2 und Endophilin A3 inhibieren. Zu diesem Zwecke wurde aus der Tomlinson I Bibliothek, einer scFv-Bibliothek, mittels Phagendisplay Subbibliotheken hergestellt. Es wurden Phagen hergestellt, die in mehreren Panning-Runden gegen unterschiedliche immobilisierte Targets selektiert wurden. Die Subbibliotheken wurden in den Hefevektor pIB NLS Ade umklontiert und in Hefezellen transformiert. Von den unterschiedlichen Transformationen (siehe Tabelle 3-1) wurde in dieser Arbeit nur Hefekandidaten verwendet, die die Interaktion zwischen den N-terminalen Fragment von Ataxin 2 (LexA-ATXN2(Q22)<sub>1-396</sub> und SH3GL3 (Gal4AD-SH3GL3) inhibieren, da diese Interaktion beim Screening die größte Anzahl an Hefekandidaten hatte, die auf der Selektionsplatte nicht gewachsen sind.

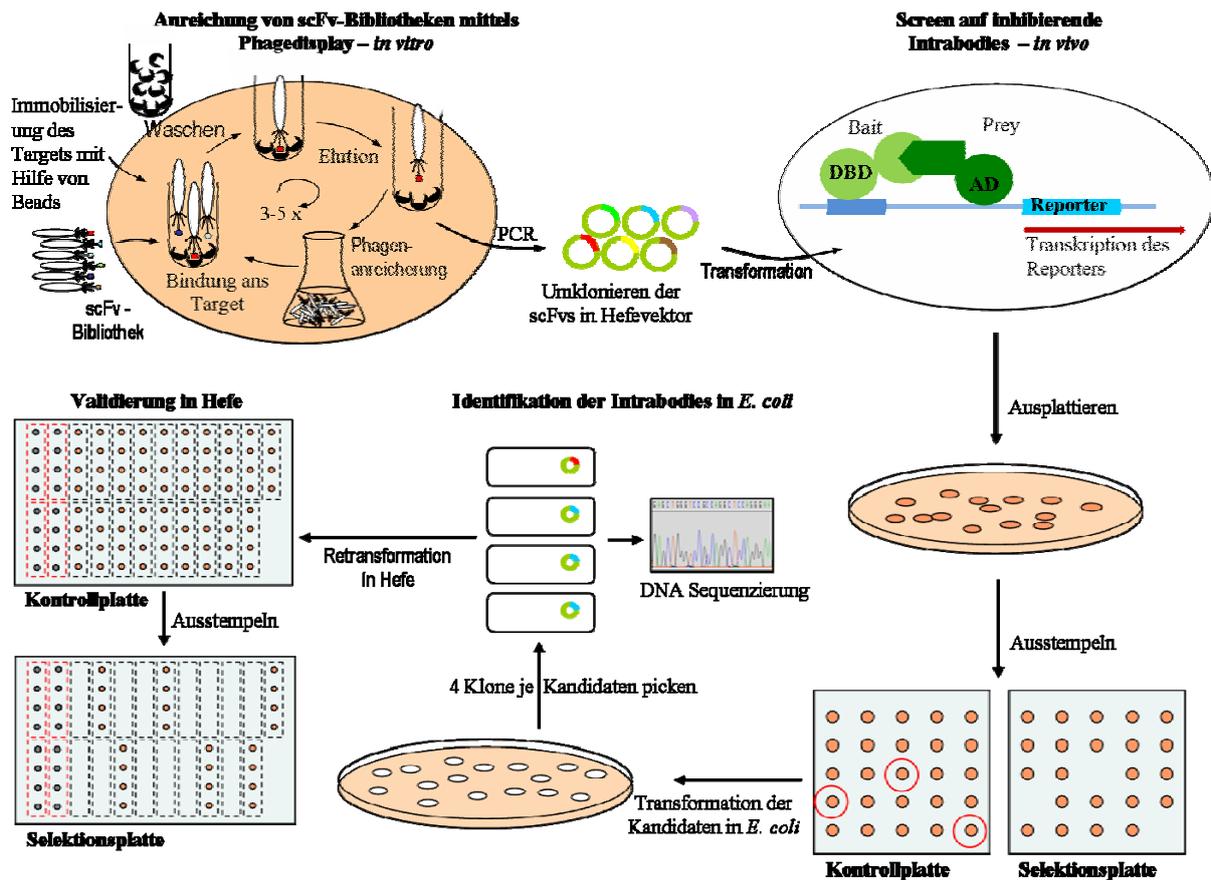
**Tabelle 3-1: Transformationen für den Inhibitionsscreen in der Hefe, die im Rahmen der Bachelorarbeit von Susanne Weber durchgeführt wurden.** In der linken Spalte sind die Fusionsproteine angegeben, deren Inhibition der Interaktion im Screen durch die potentiellen Intrabodies getestet wird. Von Ataxin 2 wurden drei verschiedene Fragmente verwendet. Die Bibliotheken bzw. Subbibliotheken, die gescreent wurden sind auf der rechten Seite angegeben. Es wurden jeweils 1152 Klone gepickt und im Inhibitionsscreen getestet.

“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

Die verwendeten Subbibliotheken wurden *in-vitro* gegen Endophilin A3 (SH3GL3) im Phagen-Display angereichert. Aufgrund der Ergebnisse eines ELISAs mit polyklonalen Phagen wurden die Subbibliotheken der dritten und vierten Selektionsrunde, in denen initial das Hyperphagensystem verwendet wurde sowie die Subbibliothek nach der vierten Selektionsrunde in denen ausschließlich M13K07-Phagen verwendet wurden für den *in-vivo*-Inhibitionsassay in der Hefe eingesetzt. Je Subbibliothek wurden 1152 Klone gepickt und getestet. Es konnten insgesamt 103 Kandidaten identifiziert werden (2,98%), die kein bzw. vermindertes Wachstum auf der Selektionsplatte zeigten. Außerdem wurden auch 1152 Klone der nativen Bibliothek getestet wobei hier sieben Kandidaten (0,61%) gefunden wurden.

### 3.1.2. Validierung von Hefekandidaten

Von den 110 Hefekandidaten, die im Inhibitionsscreen kein bzw. minimales Wachstum auf der Selektionsplatte zeigten, wurden für diese Arbeit 45 Hefekandidaten verwendet. Davon stammen fünf Hefekandidaten aus der *naiven* Bibliothek. 26 Hefekandidaten stammen aus der Subbibliothek nach der dritten Runde und 14 aus der Subbibliothek nach der vierten Runde im Phagendisplay in denen initiativ Hyperphagen eingesetzt wurden. Da ein Hefekandidat mehrere Plasmide enthalten kann, also potentiell oligoklonal ist, wurden von jedem Hefekandidat mehrere *E. coli*-Subklone hergestellt. Dafür wurde die Plasmid-DNA aus der Hefe präpariert und in *E. coli* transformiert (siehe 2.3.5 und 2.2.7). Von der Agarplatte wurden vier *E. coli*-Kolonien gepickt und je eine Kolonie in ein *well* einer 96-*well*-Platte mit Gefriermedium transferiert und bei -80°C gelagert. Die Positionen der 96-*well*-Platten wurden mit der abdb-Datenbank verwaltet. Jeder *E. coli*-Subklon, der auf diese Weise hergestellt wurde, wurde anschließend zwei Mal replikaplatziert und sequenziert (siehe 3.3). Für die anschließende Hefevalidierung (siehe 3.2) wurde DNA von 73 zufällig gewählten *E. coli*-Subklonen durch chemische Transformation in Hefeinteraktionsklone retransformiert. Jeweils vier Inhibitionsklone wurden gepickt und in je ein *well* einer 96-*well*-Platte mit Hefegefriermedium transferiert. Die Platten YIBS 1-4 wurde anschließend sowohl auf Kontroll- als auch auf Selektionsplatten replikaplatziert und mehrere Tage bei 30°C inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-2 zu sehen. Aus den Ergebnissen des Inhibitionsassay und der quantitativen Auswertung der Sequenzierung Tabelle 3-6 wurden die aussichtsreichsten Intrabodies gewählt, die in weiteren zellbiologischen Assay analysiert werden.



**Abbildung 3-1: Schematisches Vorgehen zur Selektion und Validierung interferierender Intrabodies:** Es wurden *in-vitro* Subbibliotheken der Tomlinson I Bibliothek im Phagen-Display selektiert und in einem *in-vivo*-Inhibitionsassay auf potentiell interferierende Intrabodies gescreent. Positive Hefekandidaten wurde in *E. coli* transformiert und jeweils vier Klone wurden sequenziert. Die Validierung erfolgte wiederum in der Hefe.

### 3.2. Initiale Validierung im Inhibitionsassay von 73 *E. coli*-Subklonen

Es erfolgte eine Validierung von 73 *E. coli*-Subklonen, die zufällig gewählt wurden. Dazu wurden die Plasmide in Interaktionshefeklone transformiert, die Bait- und Prey-fusionsproteine exprimieren. Es wurden jeweils vier Hefeinhibitionshefeklone je *E. coli*-Subklon getestet, die sowohl auf der Kontroll- als auch auf der Selektionsplatten replikaplattiert wurden (siehe Abbildung 3-2). Wenn kein bzw. nur ein Hefeinhibitionsklon auf der Selektionsplatte gewachsen ist, wie dies bei 53 *E. coli*-Subklonen der Fall war, wurde der Intrabody als inhibierend eingestuft. Waren es zwei oder mehr gewachsene Hefeinhibitionsklone auf der Selektionsplatte wurde der Intrabody dagegen als nicht inhibierend eingestuft, was bei den verbliebenen 20 *E. coli*-Subklonen der Fall war.



### 3.3. Identifizierung von individuellen Intrabodies

Von den 45 Hefekandidaten wurden in der Regel vier *E. coli*-Subklone hergestellt. Jeder der insgesamt 183 *E. coli*-Subklonen wurde je zwei Mal sequenziert. Alle 366 Sequenzen wurden im Bedarfsfall einzeln editiert um evtl. Lesefehler auszugleichen, translatiert und die gefundenen Variablen Regionen der Antikörperfragmente tabellarisch dokumentiert. Insgesamt waren 241 von 366 (65,8%) DNA-Sequenzen auswertbar. Dadurch konnten 139 *E. coli*-Subklone (76,0%) einer von 37 unterschiedliche Intrabodies zugeordnet werden. Es zeigt sich, dass die *E. coli*-Subklonen der selektierten Subbibliotheken sich prozentual öfter auswerten ließen (bei 81,3%) als dies bei der *naiven* Tomlinson I Bibliothek der Fall ist, wo nur 35% der *E. coli*-Subklonen auswertbare Sequenzen enthielten (Fließschema siehe Tabelle 3-2).

**Tabelle 3-2: Fließschema der Validierung.** Von 110 Hefekandidaten unterschiedlicher Selektionsrunden wurden 45 Klone in *E. coli* transformiert, weil sie im Screening kein bzw. minimales Wachstum auf der Selektionsplatte zeigten. Insgesamt wurden 183 Klone in doppelter Ausführung sequenziert. Es konnten 139 Klone ausgewertet werden. Bei 48 *E. coli*-Subklonen waren beide Sequenzen sehr kurz bzw. nur auf wenigen Positionen lesbar und daher nicht auswertbar. Die Klone aus der 4. Selektionsrunde zeigten den größten Anteil an auswertbaren Klonen (82,1%), gefolgt von den Klonen aus der 3. Selektionsrunde (80,4%). Dahingegen waren von den 20 Klonen der Naiven Bibliothek nur sieben Klone auswertbar (35%).

	<i>Naive</i>	Kandidaten aus der 3. Selektionsrunde	Kandidaten aus der 4. Selektionsrunde	Gesamtanzahl
<b>Hefe-Kandidaten</b>	7	63	40	<b>110</b>
<b>Transformationen in <i>E. coli</i></b>	5	26	14	<b>45</b>
<b>sequenzierte <i>E. coli</i>-Subklone</b>	<b>20</b>	<b>107</b>	<b>56</b>	<b>183</b>
davon ausgewertet	7	86	46	139
davon nicht auswertbar	13	21	10	44
<b>Sequenzierungen</b>	<b>40</b>	<b>214</b>	<b>112</b>	<b>366</b>
davon ausgewertet	13	149	79	241
davon nicht auswertbar	27	65	33	125

### 3.4. Übersicht der 37 individuellen scFv-Intrabodies

Aus den Sequenzinformationen aller *E. coli*-Subklone (Tabelle 8-2) konnten 37 individuelle scFv-Intrabodies identifiziert werden (siehe Tabelle 3-3). Sie wurden nach der Proteinsequenz in der CDR2-Region der schweren Kette sortiert: Intra 1 (AIDAYGNNTSYADSVKG) bis Intra 37 (YITSNGYDTTYADSVKG).

Es gibt Intrabodies die nur in einem einzelnen *E. coli*-Subklon gefunden wurden (Intra 12, Intra 16, Intra 25 usw.) und einen Intrabody, der in 20 *E. coli*-Subklonen (Intra. 22) gefunden wurde. Insgesamt 13 Intrabodies wurden in *E. coli*-Subklonen von mind. drei verschiedenen Hefekandidaten gefunden

Wenn ein Intrabody oft vorkommt wurde er demnach auch öfter im Inhibitionsassay mit zufällig gewählten *E. coli*-Subklonen auf Inhibition getestet. Intrabodies die in sieben oder mehr *E. coli*-Subklonen gefunden wurden, zeigten dabei eine höheren Anteil an inhibierenden Klone (96,0% gegenüber einem Durchschnitt aller Intrabodies von 72,6%). Dem gegenüber zeigten die Klone von Intrabodies die ausschließlich in einem Hefekandidaten gefunden wurden nur zu 46,2% eine inhibierende Wirkung. Es wurden ebenfalls neun Klone getestet, die keinem Intrabody zugeordnet werden konnten. Von diesen zeigten 44,4% eine inhibierende Wirkung.

**Tabelle 3-3 (nächste Seite): Übersicht der 37 individuellen Intrabodies, die beim Validieren von 45 Hefekandidaten aus dem Screening identifiziert werden konnten.** Zufällig gewählte Klone wurden im Inhibitionsassay getestet. Dabei wurden 53 inhibierende und 20 nicht inhibierende Klone gefunden. Von jedem Kandidaten wurden vier *E. coli* Einzelklone gepickt und sequenziert. Dabei wurden je Klone zwei Sequenzierungen angefertigt. Insgesamt konnten 241 Sequenzen von 139 verschiedenen Klonen ausgewertet werden. „\*“ repräsentiert die möglichen veränderlichen Positionen der CDRs

Intrabody	Anzahl der Hefekandidaten	absolue Anzahl der Klone in denen Intrabody gefunden wurden	absolue Anzahl der Sequenzen in denen Intrabody gefunden wurden	variable Regionen der schweren Kette			variable Regionen der leichten Kette			im Intrabody-Inhibitionsassay	
				CDR 1	CDR 2	CDR 3	CDR 1	CDR 2	CDR 3	positiv getestet	negativ getestet
					* * * * *	****		* *	**** *		
Konsensus				SYAMS	-I---G--T-YADSVKG	----FDY	RASQSISSYLN	-AS-LQS	QQ----P-		
alle Intra	45	139	241							53	20
Intra 01	3	5	8	SYAMS	AIDAYGNNTSYADSVKG	GTSSFYD	RASQSISSYLN	NASSLQS	QQSNDAPS	0	0
Intra 02	2	4	5	SYAMS	AIDNNGYDTTYADSVKG	TTTDFDY	RASQSISSYLN	AASDLQS	QQGCATPT	1	0
Intra 03	1	2	4	SYAMS	AINYSGDSTDYADSVKG	TTSTFDY	RASQSISSYLN	SASALQS	QQSTNSPT	1	0
Intra 04	1	2	2	SYAMS	AISC... YADSVKG	SGAGFDY	RASQSISSYLN	NASTLQS	QQYGYAPT	0	0
Intra 05	8	13	20	SYAMS	AISSTGSDTDYADSVKG	YSAFDY	RASQSISSYLN	DASSLQS	QQYGNAPD	7	0
Intra 06	1	2	2	SYAMS	AIYXG DATGYADSVKG	DAANFDY	RASQSISSYLN	TASALQS	QQTANSPT	0	1
Intra 07	4	4	5	SYAMS	AIYGYGDSTTYADSVKG	SDDNFDY	RASQSISSYLN	GASSLQS	QQSSTTPD	4	0
Intra 08	1	2	4	SYAMS	DISACGSTTYADSVKG	NYADFDY	RASQSISSYLN	AASNLQS	QQGDSAPX	0	1
Intra 09	1	1	2	SYATS	DISSSGTSTDYADSVKG	TYDSFDY	RASQSISSYLN	SASALQS	QQTSDNPS	0	0
Intra 10	3	6	9	SYAMS	DITTDGSGTNYADSVKG	SSSAFDY	RASQSISSYLN	TASDLQS	QQDADAPA	2	0
Intra 11	2	3	4	SYAMS	DITY... YADSVKG	DSTAFDY	RASQSISSYLN	SASNLS	QQSYSAPT	2	0
Intra 12	1	1	1	SYAMS	GIAASGDSTTYADSVKG	TYNAFDY	RASQSISSYLN	YASTLQS	QQSDYSPG	0	0
Intra 13	4	9	14	SYAMS	GISNAGSTTYADSVKG	SYTAFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPY	5	0
Intra 14	1	2	4	SYAMS	NIYDSGDNTAYADSVKG	NYAGFDY	RASQSISSYLN	NASTLQS	QQASGTPG	1	0
Intra 15	2	4	7	SYAMS	NIYSTGAGTYADSVKG	NSYAFDY	RASQSISSYLN	SASCLQS	QOSTYGPT	0	0
Intra 16	1	1	1	SYAMS	SI... TTAYADSVKG	ASGCFDY	RASQSISSYLN	DASSLQS	QQSTTTPS	0	0
Intra 17	2	4	7	SYAMS	SIGDSGGNTTYADSVKG	YSAFDY	RASQSISSYLN	DASSLQS		0	0
Intra 18	1	1	2	SYAMS	SIGDGDSTNYADSVKG	CDDSFYD	RASQSISSYLN	TASSLQS	QQGGTPD	1	0
Intra 19	3	7	12	SYAMS	SINASGDSTSYADSVKG	ASGDFDY	RASQSISSYLN	SASKLQS	QQSTNAPC	2	0
Intra 20	1	2	2	SYAMS	SINSDGGATSFAXSVKG	CATTLDY	RASQSISSYLN	NASNLS	QQSASYPY	0	0
Intra 21	4	6	11	SYAMS	SINYNGCCTTYADSVKG	GYDNFDY	RASQSISSYLN	DASGLQS	QQSASTPS	1	0
Intra 22	9	20	30	SYAMS	SINYSGSYTAYADSVKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPY	8	1
Intra 23	3	4	7	SYAMS	SINYSGYTTYADSVKG	SNTAFDY	RASQSISSYLN	SASNLS	QQGSAAPA	2	0
Intra 24	3	5	8	SYAMS	SISAYGNNTGYADSVKG	SASTFDY	RASQSISSYLN	YASYLQS	QQSSSYPT	0	1
Intra 25	1	1	2	SYAMS	SISSSGSYAYADSVKG	SADNFDY	RASQSISSYLN	AASNLS	QQSAAYPY	1	0
Intra 26	5	7	9	SYAMS	SIITNGGSTDYADSVKG	DTASFDY	RASQSISSYLN	SASSLQS	QQTANAPS	2	0
Intra 27	2	3	5	SYAMS	SIYSTGAATTYADSVKG	GSTSFYD	RASQSISSYLN	SASSLQS	QQNNDTPS	1	1
Intra 28	1	4	7	SYAMS	TIAAAGYTTYXDSVKG	TSTAFDY	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSNTNPS	2	1
Intra 29	3	5	8	SYAMS	TIGSTGYSTSYADSVKG	SCGSFDY	RASQSISSYLN	TASSLQS	QQTITGPG	2	0
Intra 30	2	3	3	SYAMS	TIGTTGYXTXYADSVKG	NCGSFDY	RASQSISSYLN	XASNLS	QQTITXPX	0	2
Intra 31	1	3	4	SYAMS	TINYGGTYTAYADSVKG	NGDYFDY	RASQSISSYLN	SASTLQS	QQGTAGPC	0	1
Intra 32	2	4	5	SYAMS	TISXNGDATGYADSVKG	DAGXFDY	RASQSISSYLN	XASXLQS	QQTATSPA	1	2
Intra 33	1	1	2	SYAMS	TITAGGYATDYADSVKG	TYDSFDY	RASQSISSYLN	SASTLQS	QQDTATPT	0	0
Intra 34	2	5	9	SYAMS	TIYAGGNNTNYADSVKG	SNDSFDY	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSGTDPN	1	1
Intra 35	1	2	3	SYAMS	YIDSSGSDTYADSVKG	TSYAFDY	RASQSISSYLN	YASSLQS	QQSASYPY	0	2
Intra 36	1	2	4	SYAMS	YISG... YADSVKG	GASAFDY	RASQSISSYLN	SASYLQS	QQYAADPS	0	1
Intra 37	3	6	9	SYAMS	YITSNGYDTTYADSVKG	YSNSFDY	RASQSISSYLN	GASSLQS	QQADAAPT	2	0
-	-	-	-			keine Sequenz	///	keine Sequenz		4	5

Es wurde festgestellt, dass die meisten der 45 Hefekandidaten tatsächlich oligoklonal waren. Insgesamt 31 Hefekandidaten zeigten in den untersuchten vier *E. coli*-Subklonen zwei oder mehr unterschiedliche Intrabodies. Elf Hefekandidaten wurden als monoklonal (z. B. Intra 06 siehe Abbildung 3-3) identifiziert und bei drei Hefekandidaten, wurde in allen vier untersuchten *E. coli* Subklonen keine scFv-Sequenz gefunden.

		variable Regionen der schweren Kette			variable Regionen der leichten Kette		
		CDR 1	CDR 2	CDR 3	CDR 1	CDR 2	CDR 3
		* **	** *	****	* *	**** *	
Kandidat	Intrabody	SYAMS	-I---G--T-YADSVKG	----FDY	RASQSISSYLN	-AS-LQS	QQ----P-
06-1	Intra 19	SYAMS	SINASGDSTSYADSVKG	ASGDFDY	RASQSISSYLN	SASKLQS	QQSTNAPC
06-2	Intra 19	SYAMS	SINASGDSTSYADSVKG	ASGDFDY	RASQSISSYLN	SASKLQS	QQSTNAPC
06-3	Intra 19	SYAMS	SINASGDSTSYADSVKG	ASGDFDY	RASQSISSYLN	SASKLQS	QQSTNAPC
06-4	Intra 19	SYAMS	SINASGDSTSYADSVKG	ASGDFDY	RASQSISSYLN	SASKLQS	QQSTNAPC
11-1	Intra 21	SYAMS	SINYNGCCTTYADSVKG	GYDNFDY	RASQSISSYLN	DASGLQS	QQSASTPS
11-2	Intra 21	SYAMS	SINYNGCCTTYADSVKG	GYDNFDY	RASQSISSYLN	DASGLQS	QQSASTPS
11-3	Intra 21	SYAMS	SINYNGCCTTYADSVKG	GYDNFDY	RASQSISSYLN	DASGLQS	QQSASTPS
11-4	Intra 37	SYAMS	YITSNGYDTTYADSVKG	YNSFDY	RASQSISSYLN	GASTLQS	QQBANAPT
14-1	Intra 21	SYAMS	SINYNGCCTTYADSVKG	GYDNFDY	RASQSISSYLN	DASGLQS	QQSASTPX
14-2	Intra 25	SYAMS	SISSSGSYTRAYADSVKG	SADNFDY	RASQSISSYLN	AASNLQS	QQSARYPA
14-3	Intra 33	SYAMS	TITAGGYATDYADSVKG	TYDSEFY	RASQSISSYLN	SASTLQS	QQDTATPT

**Abbildung 3-3: Auswertung von drei der 46 Ergebnisse der Sequenzierung der 45 validierten Hefekandidaten.** Kandidat 6 enthält in allen vier Klonen (6-1 – 6-4) den gleichen Intrabody (Intra 19) und wird daher als monoklonaler Hefeklon bezeichnet. In Kandidat 11 findet sich zwar der Intrabody Intra 11 in drei der vier Klone. Allerdings beinhaltet Klon 11-4 einen anderen Intrabody (Intra 37). Bei Kandidat 14 ist jeder der drei gefundenen Intrabodies (Intra 21, 25 und 33) in nur einem Klon vorhanden. Bei einem der vier Klone waren die Ergebnisse der Sequenzierung nicht auswertbar. Bei den Hefekandidaten 11 und 14 handelt es sich nachweislich um oligoklonale Hefeklone.

Aus der Übersicht der individuellen Intrabodies können die unterschiedlichen Subbibliotheken miteinander verglichen werden. In Tabelle 3-4 ist angegeben, in wie vielen *E. coli*-Subklonen der jeweiligen Subbibliothek wie viele unterschiedliche Intrabodies gefunden wurden. In Tabelle 3-5 ist angegeben in wie vielen *E. coli*-Subklonen der Intrabody gefunden wurde, der in dem jeweiligen Hefekandidaten am öftesten gefunden wurde. Beide Tabellen sind Zusammenfassungen von Tabelle 8-1, die im Anhang zu finden ist.

**Tabelle 3-4: Analyse I der Sequenzierung unterteilt nach Subbibliotheken.** Angeben ist die Anzahl der individuellen Intrabodies in einem Hefekandidaten. Um möglichst alle individuellen potentiell inhibierenden Intrabodies zu erhalten, war es notwendig mehrere *E. coli*-Subklonen von einem Hefekandidaten zu untersuchen. Wenn nur ein Intrabody gefunden wurde handelt es sich um einen der 11 monoklonalen Hefekandidaten.

<b>gefundene individuelle Intrabodies je Hefekandidat</b>	<b>1 Intrabody</b>	<b>2 Intrabodies</b>	<b>3 Intrabodies</b>	<b>4 Intrabodies</b>	<b>keine Klone</b>	<b>Gesamtanzahl</b>
<i>Naive Bibliothek</i>	2	0	1	0	2	5
<b>Subbibliothek nach drei Selektionsrunden</b>	6	14	4	1	1	26
<b>Subbibliothek nach vier Selektionsrunden</b>	3	6	5	0	0	14
<b>insgesamt</b>	<b>11</b>	<b>21</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>45</b>

**Tabelle 3-5: Analyse II der Sequenzierung unterteilt nach Subbibliotheken.** Angeben ist die Anzahl der Klone die die am meisten vorhandene scFv-Sequenz vorweisen. Wenn ein Intrabody identifiziert wurde trat er in 40 von 43 Hefekandidaten in mind. zwei *E. coli*-Subklonen auf. Die Anzahl der *E. coli*-Subklonen lässt auf die Bedeutung des Intrabodies schließen. Je öfter ein Intrabody vorkommt, desto aussichtsreicher ist dieser als Kandidat.

<b>Anzahl der Subklone, die den gleichen Intrabody beinhalten</b>	<b>4 Klone</b>	<b>3 Klone</b>	<b>2 Klone</b>	<b>1 Klon</b>	<b>keine Klone</b>	<b>Gesamtanzahl</b>
<i>Naive Bibliothek</i>	0	0	3	0	2	5
<b>Subbibliothek nach drei Selektionsrunden</b>	3	12	7	3	1	26
<b>Subbibliothek nach vier Selektionsrunden</b>	2	4	7	1	0	14
<b>insgesamt</b>	<b>5</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>45</b>

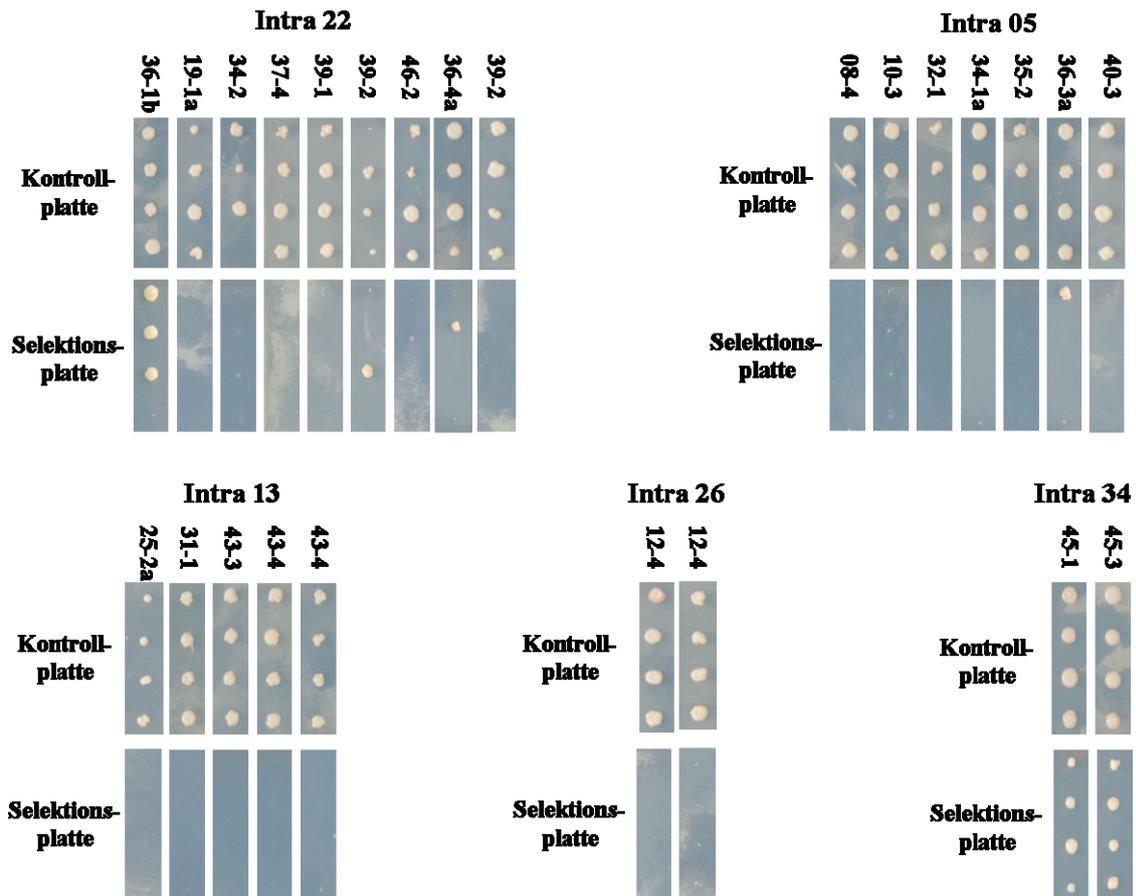
### 3.5. Auswahl der Topkandidaten

Für die weitere Validierung wurde die Anzahl der untersuchten scFv-Intrabodies reduziert. Die Auswahl der Intrabodies, mit denen weiter gearbeitet wurde, erfolgte hauptsächlich nach zwei Kriterien. Erstens wurden Intrabodies bevorzugt, die in möglichst vielen verschiedenen Hefekandidaten und möglichst vielen *E. coli*-Subklonen gefunden wurden. Diese Intrabodies zeigten bereits im Screening eine Vielzahl inhibierender Hefeinhibitionsklone. Zweitens wurden Intrabodies bevorzugt, die auch beim initialen Inhibitionsassay als inhibierend getestet wurden.

**Tabelle 3-6: Auswahl der Topkandidaten zur zielgerichteten Validierung.** Diese Tabelle zeigt einen Auszug der Übersicht der 37 Intrabodies nach der Anzahl der Hefekandidaten geordnet, in denen der Intrabody gefunden werden konnte. Als zweites Kriterium diente das Ergebnis des initialen Inhibitionsassays (siehe rechte Spalten). Die Intrabodies mit denen weiter gearbeitet wurde sind gelb markiert.

	Intra-body	Anzahl der Hefekandidaten in denen Intrabody gefunden wurde	absolute Anzahl der Subklone in denen Intrabody gefunden wurden	absolute Anzahl der Sequenzen in denen Intrabody gefunden wurden	positiv getestet	negativ getestet
	alle Intra	45	139	241	53	20
<b>Top 01</b>	Intra 22	9	20	30	8	1
<b>Top 02</b>	Intra 05	8	13	20	7	0
<b>Top 03</b>	Intra 26	5	7	9	2	0
<b>Top 04</b>	Intra 13	4	9	14	5	0
<b>Top 05</b>	Intra 07	4	4	5	4	0
<b>Top 06</b>	Intra 21	4	6	11	1	0
<b>Top 07</b>	Intra 10	3	6	9	2	0
<b>Top 08</b>	Intra 19	3	7	12	2	0
<b>Top 09</b>	Intra 23	3	4	7	2	0
<b>Top 10</b>	Intra 29	3	5	8	2	0

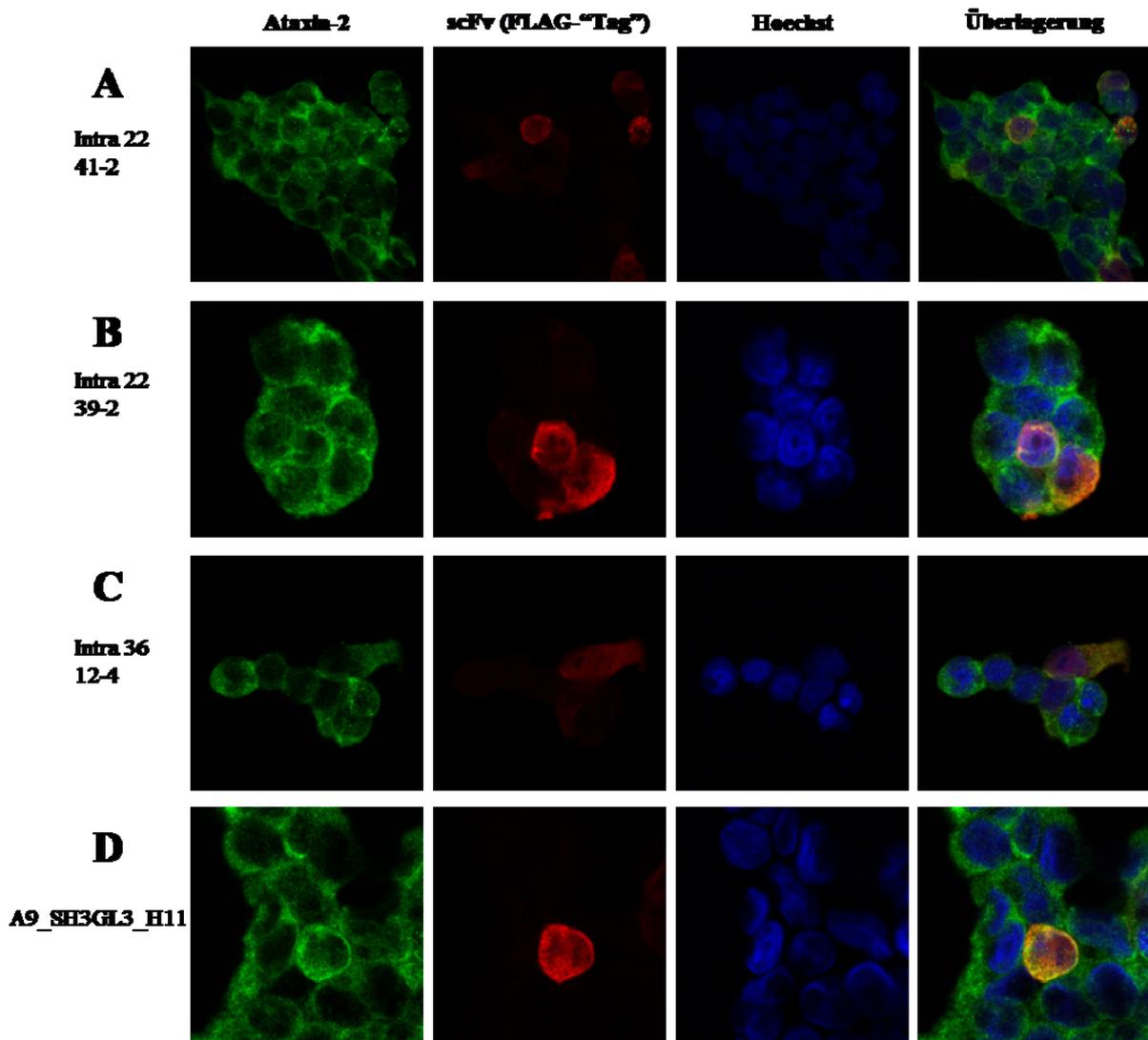
Die Ergebnisse des Inhibition Assays dieser Intrabodies sowie Intra 34, der keine Inhibition zeigt sind in Abbildung 3-4 zusammengefasst.



**Abbildung 3-4: Erstvalidierung getesteter monoklonaler Intrabodies.** Durch die Inhibition der Interaktion durch den Intrabody kann die Hefe nicht auf der Selektionsplatte wachsen. Gezeigt sind alle getesteten *E. coli*-Subklonen, die einen von den Top 4 Intrabodies (Intra 22, Intra 05, Intra 13 und Intra 26) enthalten. Im Gegensatz dazu zeigt Intra 34 keine Inhibition und die Hefe wächst auf der Selektionsplatte.

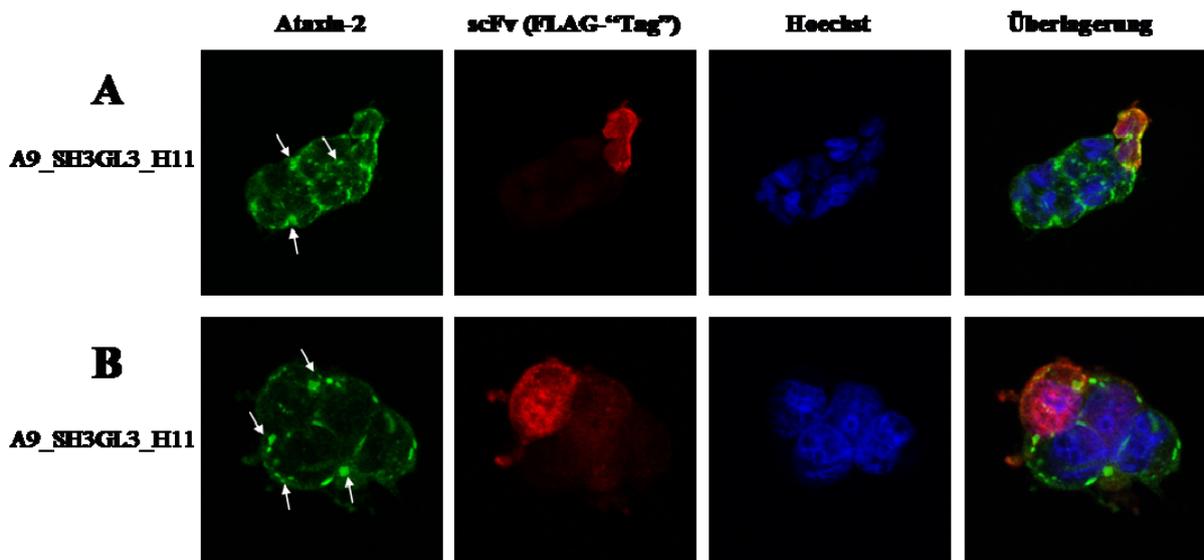
### 3.6. Fluoreszenzmikroskopie

Für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden die Intrabodies Intra 22 (zwei verschiedene *E. coli*-Subklone), Intra 26 und Intra 13 verwendet. Als Kontrolle diente ein scFv (A9\_SH3GL3\_H11), der im Phagen-Display ebenfalls gegen Endophilin A3 selektiert wurde, aber nicht den *in-vivo*-Inhibitionsscreen in der Hefe durchlaufen hat. Die verwendeten HEK-Zellen wurden mit den Intrabodies transfiziert, um zu testen, ob die Intrabodies die endogenen Proteine Ataxin 2 und Endophilin A3 in ihrer Interaktion inhibieren und so die Bildung bzw. die Rekrutierung von Ataxin 2 in *Stress Granules* (SG) als Antwort auf zellulären oxidativen Stress nach Zugabe von Arsenit verhindern. Dadurch kann die Wirkung der Intrabodies durch einen biologischen Effekt sichtbar gemacht werden.



**Abbildung 3-5: HEK-Zellen, 16h nach Transfektion des Intrabodies.** Gezeigt sind die Aufnahmen in drei verschiedenen Kanälen und in der Überlagerung der Kanäle. Im grünen Kanal sieht man Ataxin.2, im roten Kanal sieht man die pFlag-getaggten Intrabodies und im blauen Kanal, die mit Hoechst gefärbten Zellkerne. Für die anschließenden Lokalisationsstudien wurden Aufnahmen angefertigt in denen die Zellen keinen oxidativen Stress ausgesetzt wurden.

Für die Lokalisationsstudien wurden Kontrollen angefertigt in denen die Zellen keinen oxidativen Stress ausgesetzt wurden. In Abbildung 3-5 A-C sieht man das Ergebnis der Transformation von drei der vier getesteten Intrabodies in die HEK-Zellen. In den Aufnahmen sieht man, dass transformierte und nicht transformierte Zellen die gleiche Verteilung von Ataxin 2 aufweisen. Dies trifft ebenfalls für den Kontrollintrabody zu (siehe Abbildung 3-5 D)



**Abbildung 3-6: HEK-Zellen 16h nach Transfektion des Kontroll-Intrabody's in zuvor mit Arsenit oxidativen Stress ausgesetzt wurden.** Bei A und B sieht man in allen Zellen, egal ob erfolgreich transfiziert oder nicht, die Stress Granules (SG). Zur Verdeutlichung zeigen Pfeile auf einzelne SGs.

Durch die Zugabe von Arsenit wurde oxidativer Stress ausgelöst und man konnte Lokalisationsstudien durchführen. In Abbildung 3-6 und in Abbildung 3-7 sind alle Zellen durch Zugabe von Arsenit oxidativen Stress ausgesetzt. Es wurde die Lokalisation von Ataxin 2 beobachtet. Das Ataxin 2 in SG lokalisiert ist, sieht man das durch die Aggregation von Ataxin 2, wie dies in allen untransfizierten Zellen der Fall ist. Die SG sind in Abbildung 3-6 mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. In der Abbildung sieht man, dass die Transfektion des Kontroll-Intrabodies keine sichtbare Veränderung hervorruft. Auch in den transfizierten Zellen ist Ataxin 2 in Stress Granules (SG) lokalisiert.

In Abbildung 3-7 sind Aufnahmen der Intrabodies zu sehen, die auf Inhibition der Interaktion auch in-vivo selektiert wurden. Bei A-D, sieht man in den Zellen, die Intrabodies exprimieren, dass Ataxin nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß in SG lokalisiert ist. Allerdings konnte dies nicht bei allen Intrabodies beobachtet werden. Bei E, wo wie bei Abbildung 3-7 D Intra 26 transformiert wurde, sowie bei F, in der Intra 13 transformiert wurde, konnte keine Veränderung der Lokalisation von Ataxin 2 im Vergleich zu untransformierten Zellen festgestellt werden. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich, dass nur Intra 22, nicht aber Intra 13 und Intra 26 in allen getesteten Zellen mit der Interaktion zwischen SH3GL3 und Ataxin 2 interferiert.

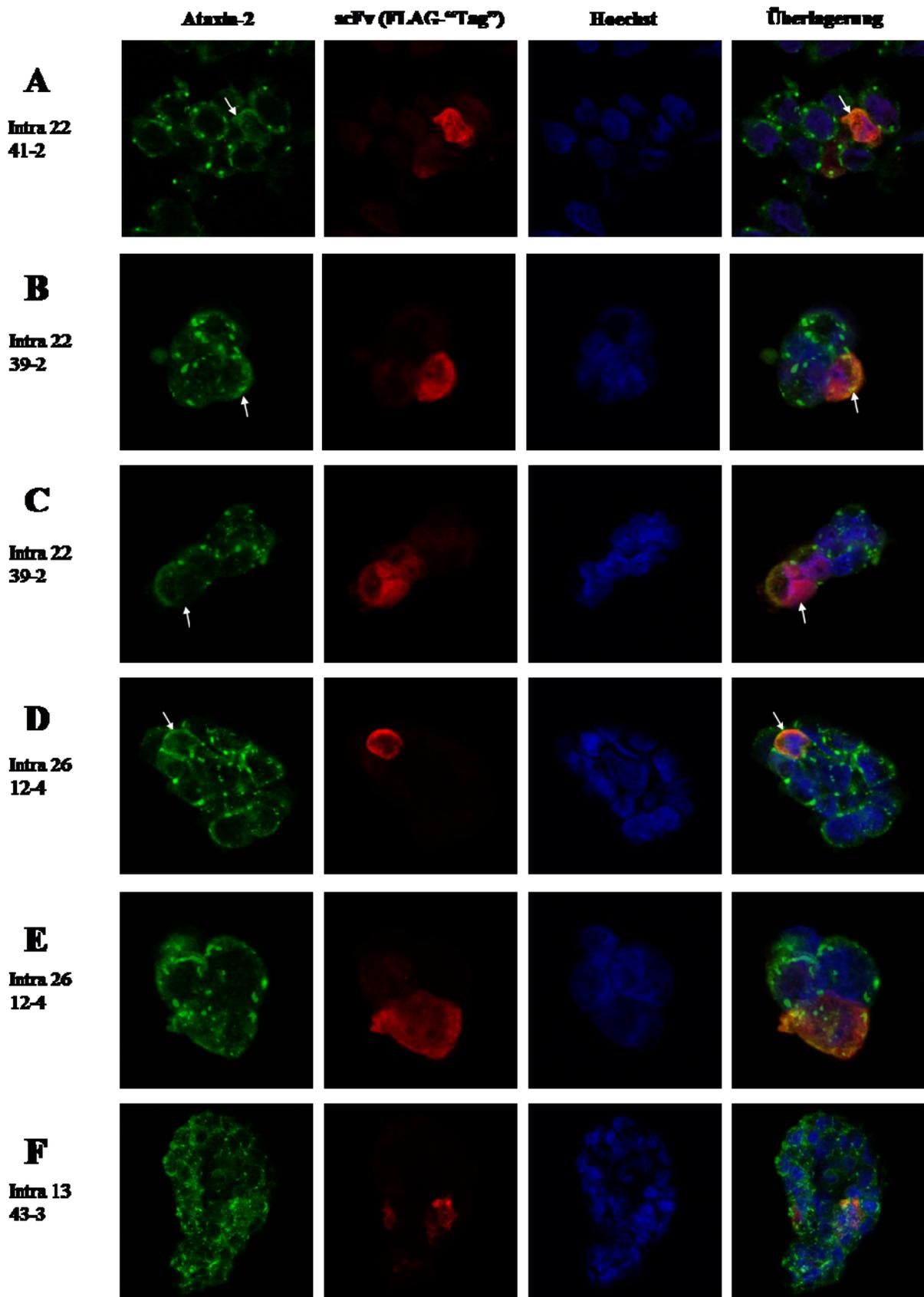


Abbildung 3-7: HEK-Zellen 16h nach Transfektion der Intrabodies, die zuvor mit Arsenit oxidativen Stress ausgesetzt worden sind. In den mit Pfeilen gekennzeichneten Zellen wurde die Bildung bzw. die Rekrutierung von Ataxin 2 in *Stress Granules* durch Transfektion des Intrabodies verhindert.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit habe ich mich mit der Frage beschäftigt, ob es möglich ist neuartige Binder (Intrabodies) zu selektieren die *in-vivo* Protein-Protein-Interaktion inhibieren. Zu diesem Zweck sollte eine kombinierte *in-vitro* / *in-vivo* Methode zum Einsatz kommen (siehe Abbildung 3-1). Des Weiteren sollte untersucht werden, wie diese Selektion optimiert werden kann, um in Zukunft interferierende Binder für beliebige Interaktionen erhalten zu können. Ausgangspunkt meiner Arbeit waren 45 Hefekandidaten von 110 Hefekandidaten, die möglicherweise die Interaktion zwischen Ataxin 2 und SH3GL3 inhibieren. Für die Downstream-Evaluation wurden 183 *E. coli*-Subklone generiert und sequenziert (siehe Tabelle 3-3).

### 4.1. Downstream-Evaluation

#### 4.1.1. Initialer Inhibitionsassay von 73 zufällig gewählten *E. coli*-Subklonen

Beim initialen Inhibitionsassay zur Validierung von 73 zufällig gewählten *E. coli*-Subklonen (siehe Abbildung 3-2) wurden 53 Intrabodies als inhibierend eingestuft, weil das Wachstum von mindestens drei der vier gepickten Hefeinhibitionsklone auf der Selektionsplatte gehemmt wurde. 20 Intrabodies wurden als nicht inhibierend eingestuft, weil mindestens zwei der vier getesteten Hefeinhibitionsklone gewachsen sind. Die getesteten *E. coli*-Subklone der Top 4-Kandidaten wurden bis auf eine Ausnahme als inhibierend eingestuft (siehe Abbildung 3-4). Es konnte im Inhibitionsassay gezeigt werden, dass die Mehrheit, jedoch nicht alle Intrabodies, eine inhibierende Wirkung zeigen. Ein möglicher Grund für dieses Ergebnis ist die potentielle Oligoklonalität der Hefe. In den getesteten Hefekandidaten könnten mehrere Plasmide vorliegen, von denen einige keinen funktionellen Intrabody exprimieren, da sie z. B. leer sind, bzw. die Intrabodies die Interaktionspartner nicht binden.

Einige Ergebnisse schränken die Aussagekraft des Inhibitionsassay möglicherweise ein. Es wurde in vier der neun getesteten *E. coli*-Subklonen, die keinem Intrabody zugeordnet werden konnten, eine Inhibition des Wachstums der Hefe auf der Selektionsplatte nachgewiesen. Falls keine Fehler bei der Sequenzierung vorlagen, würde dies bedeuten, dass auch andere Faktoren dazu führen können, dass Wachstum auf der Selektionsplatte zu verhindern.

#### 4.1.2. Identifizierung von individuellen Intrabodies

Insgesamt 42 der 45 untersuchten Hefekandidaten konnte nach der Sequenzierung von jeweils vier *E. coli*-Subklonen mindestens einer der 37 individuellen Intrabodies zugeordnet werden. In der Mehrheit der Hefekandidaten konnten mehrere Intrabodies identifiziert werden, wodurch gezeigt werden konnte, dass mehrere *E. coli*-Subklonen eines Hefekandidaten untersucht werden müssen, um potentielle funktionelle Intrabodies bei diesem Schritt nicht zu verlieren. Ein weiterer Vorteil der Analyse mehrerer *E. coli*-Subklone ist die dadurch ermöglichte quantitative Auswertung zur Bestimmung der aussichtsreichsten Intrabodies für weiterführende Experimente. Da viele Sequenzen nicht auswertbar waren, bzw. durch die Sequenzierung verursachte scheinbare Frameshifts aufwiesen, konnte kein Alignment durchgeführt werden um die Intrabodies zu identifizieren. Daher wurden alle Sequenzen einzeln analysiert und tabellarisch aufgelistet.

#### 4.1.3. Lokalisationsstudien von Ataxin 2 in oxidativ gestressten HEK-Zellen

Ziel der Lokalisationsstudien (siehe Abbildung 3-7) war es, zu beobachten ob Zellen, die Intrabodies exprimieren eine Veränderung hinsichtlich der Lokalisation von Ataxin 2 im Vergleich zu untransfizierten Zellen aufweisen. Daraus ließe sich Rückschließen, dass die Intrabodies die Interaktion zwischen den endogen exprimierten Proteinen Ataxin 2 und SH3GL3 inhibieren, was dazu führt, dass Ataxin 2 nicht in SG lokalisiert ist, die als Reaktion auf oxidativen Stress entstehen. Als Kontrollen wurden scFv-Fragmente verwendet, die nicht in-vivo selektiert worden sind. In Abbildung 3-6 A und B sieht man zwei repräsentative Aufnahmen. HEK-Zellen, die A9\_SH3GL3\_H11 exprimieren, sind an Hand der Verteilung von Ataxin 2 nicht von den untransfizierten Zellen zu unterscheiden. Ataxin 2 ist in SGs lokalisiert. Sieht man sich die Verteilung von Ataxin 2 in den HEK-Zellen an, die Intra 22 exprimieren (siehe Abbildung 3-7 A-C) sieht man deutliche Unterschiede. Es sind keine SG bzw. deutlich kleinere und weniger Akkumulationen von Ataxin 2 zu sehen, die als SG interpretiert werden können. Für Intra 13 (siehe Abbildung 3-7 D und E) wurden Zellen gefunden in denen Ataxin 2-mal in SG lokalisiert ist und mal nicht. Hier ist das Ergebnis nicht eindeutig. In allen HEK-Zellen, in denen Intra 26 exprimiert wird (siehe Abbildung 3-7 F) ist Ataxin 2 in SG lokalisiert. Aus den Lokalisationsstudien lässt sich ableiten, dass nur Intra 22 die Interaktion von Ataxin 2 und SH3GL3 inhibiert. Für Intra 13 und Intra 26 konnte dagegen keine Inhibition nachgewiesen werden, obwohl sie in Inhibitionsassays das Wachstum der Hefen auf den Selektionsplatten hemmten und in verschiedenen Hefekandidaten gefunden

worden sind. Daraus lässt sich ableiten, dass aus der Inhibition der Intrabodies in der Hefe nicht direkt auf die Inhibitionsfähigkeit in Säugerzellen geschlossen werden kann. Es ist gelungen ein biologisches Readout für die Inhibitionsfähigkeit von Intrabodies einzuführen, in denen in Säugerzellen die Wirksamkeit der Intrabodies getestet werden kann. Allerdings sollte das Experiment wiederholt werden und wirksame Kontrollen wie Intrabodies gegen GFP (sollte nicht in Säugerzellen wirken) eingesetzt werden sowie auch andere Zelllinien wie Hela-Zellen eingesetzt werden.

#### **4.2. Vergleich der Kombinierten Anwendung zu ausschließlicher *in-vivo* bzw. *in-vitro*-Selektion**

Die durchgeführte Validierung in dieser Arbeit.(siehe Abbildung 3-1) zeigte, dass Subbibliotheken, die durch mehrere Runden eines Phagen-Display generiert wurden, bessere Ergebnisse im Inhibitionsscreen in der Hefe zeigten als die zuvor unselektierte (*naive*) Bibliothek. Dies wird insbesondere dadurch untermauert, dass in den selektierten Bibliotheken im Vergleich zur nativen Bibliothek prozentual deutlich mehr Subklone mit Intrabodies identifiziert werden konnten (siehe Tabelle 3-2). Von den wenigen Intrabodies die beim *in-vivo*-Selektions-Screen der nativen Bibliothek identifiziert werden konnten (Intra 05, Intra 10, Intra 29, Intra 30, Intra 34) gehörte nur Intra 05 zu den Topkandidaten (siehe Tabelle 3-6 ). Allerdings war Intra 05 nur in einem von 80 sequenzierten *E. coli*-Subklonen vorhanden. Außerdem konnten zwei der fünf getesteten Hefekandidaten kein Intrabody identifiziert werden.

Ebenfalls wichtig ist es den *in-vivo*-Selektions-Screen durchzuführen. Verwendet man scFvs die ausschließlich im Phagen-Display selektiert wurden, wie dies in dieser Arbeit durch die Verwendung des scFv A9\_SH3GL3\_H11 getan worden ist, kann keine biologische Wirksamkeit beobachtet werden, d. h. Ataxin 2 ist auch nach Transfektion des scFvs in den SGs lokalisiert. Der Einsatz von ausschließlich *in-vivo* selektierten scFvs führte ebenfalls in der Bachelorarbeit von Susanne Weber zu dem gleichen Ergebnis. Eine *in-vitro* Selektion reicht demnach nicht aus um Intrabodies zu erhalten, die im zellulären Milieu eine bestimmte Funktion des Antigens wie die Interaktionsfähigkeit mit einem anderen Protein inhibieren.

### 4.3. Optimierte Selektion funktioneller Intrabodies

Obwohl gezeigt werden konnte, dass, mit Intra 22, ein interferierende Binder aus einer Bibliothek an scFv-Intrabodies selektiert werden kann, der sowohl in der Hefe (siehe Abbildung 3-4), als auch in Lokalisationsstudien in HEK-Zellen (siehe Abbildung 3-7) interferierende Wirkungen zeigt sind einige Verbesserungen möglich um die Effizienz der Validierung wirksamer Intrabodies gegen beliebige Interaktion zu erhöhen.

Die Grundlage einer erfolgreichen Selektion ist eine Bibliothek, die möglichst divers ist. Je größer die Diversität desto wahrscheinlicher ist der Erfolg der Selektion, da mehr mögliche Binder zur Verfügung stehen. Die Tomlinson I Bibliothek, die in dieser Arbeit eingesetzt, genügt dieser Anforderung. Als erstes wird *in-vitro*, mit mehreren *Panning*-Runden eines Phagendisplay gegen eines oder beide Proteine bzw. Proteinfragmente der Interaktion, eine selektierte Subbibliotheken generiert. Nach der 3. und 4. *Panning*-Runde werden diese Subbibliotheken im polyklonalen Phagen-ELISA auf die Anreicherung getestet. Bei positiven Ergebnissen werden die Subbibliotheken in Interaktionsklone in großem Maßstab für den *in-vivo*-Inhibitionsassay transformiert. Dabei sollten mehrere Interaktionsklone gewählt werden, die vorher darauf validiert worden sind, dass sie ohne Zugabe von Intrabodies auf der Selektionsplatte wachsen. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass ein Großteil der Hefekandidaten oligoklonal ist und man mehrere Subklone benötigt um keinen Verlust an potentiellen Intrabodies zu erleiden, werden für jeden positiven Hefekandidaten vier *E. coli*-Subklone generiert und anschließend doppelt sequenziert. Es sollten mindestens 48, oder sogar mehr, Hefekandidaten getestet werden, um die Aussagekraft der anschließenden quantitativen Auswertung zu erhöhen. Diejenigen Intrabodies, die in viele Hefekandidaten und Subklonen gefunden wurden werden ausgewählt und in mind. 20 individuellen Interaktionsklone transformiert um die Inhibitionsfähigkeit in der Hefe zu quantitativ zu validieren. Intrabodies, die in der Hefe inhibieren, werden anschließend im Säugersystem in verschiedenen Methoden, wie Lokalisationsstudien und Immunpräzipitation untersucht. Erst wenn in mehreren Systemen die Inhibitionsfähigkeit gezeigt wurde, lässt sich mit Sicherheit sagen, dass ein funktionaler Intrabody identifiziert werden konnte.

## 5. Referenzen

Albrecht, M., M. Golatta, et al. (2004). "Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3." Eur J Biochem **271**(15): 3155-3170.

Bates, G. P., L. Mangiarini, et al. (1997). "Transgenic models of Huntington's disease." Hum Mol Genet **6**(10): 1633-1637.

Bauer, P. O. and N. Nukina (2009). "The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies." J Neurochem **110**(6): 1737-1765.

Better, M., C. P. Chang, et al. (1988). "Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment." Science **240**(4855): 1041-1043.

Biocca, S. and A. Cattaneo (1995). "Intracellular immunization: antibody targeting to subcellular compartments." Trends Cell Biol **5**(6): 248-252.

Bonini, N. M. and A. R. La Spada (2005). "Silencing polyglutamine degeneration with RNAi." Neuron **48**(5): 715-718.

Cho, G., A. D. Keefe, et al. (2000). "Constructing high complexity synthetic libraries of long ORFs using in vitro selection." J Mol Biol **297**(2): 309-319.

Clackson, T., H. R. Hoogenboom, et al. (1991). "Making antibody fragments using phage display libraries." Nature **352**(6336): 624-628.

Crawford, M., R. Woodman, et al. (2003). "Peptide aptamers: tools for biology and drug discovery." Brief Funct Genomic Proteomic **2**(1): 72-79.

Daugherty, P. S. (2007). "Protein engineering with bacterial display." Curr Opin Struct Biol **17**(4): 474-480.

Dausse, E., S. Da Rocha Gomes, et al. (2009). "Aptamers: a new class of oligonucleotides in the drug discovery pipeline?" Curr Opin Pharmacol **9**(5): 602-607.

Dübel, S., P. Rohrbach, et al. (2004). "Rekombinante Antikörper." Biol. Unserer Zeit **34. Jahrgang 2004 Nr. 6**: 372-379.

Ellington, A. D. and J. W. Szostak (1990). "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands." Nature **346**(6287): 818-822.

- Famulok, M., M. Blind, et al. (2001). "Intramers as promising new tools in functional proteomics." Chem Biol **8**(10): 931-939.
- Fashena, S. J., I. G. Serebriiskii, et al. (2000). "LexA-based two-hybrid systems." Methods Enzymol **328**: 14-26.
- Fields, S. and O. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." Nature **340**(6230): 245-246.
- Gardian, G., L. Yang, et al. (2004). "Neuroprotective effects of phenylbutyrate against MPTP neurotoxicity." Neuromolecular Med **5**(3): 235-241.
- Hoppe-Seyler, F. and K. Butz (2000). "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine." J Mol Med **78**(8): 426-430.
- Hoppe-Seyler, F., I. Crnkovic-Mertens, et al. (2004). "Peptide aptamers: specific inhibitors of protein function." Curr Mol Med **4**(5): 529-538.
- Hust, M. and S. Dubel (2005). "Phage display vectors for the in vitro generation of human antibody fragments." Methods Mol Biol **295**: 71-96.
- Hust, M., T. Jostock, et al. (2007). "Single chain Fab (scFab) fragment." BMC Biotechnol **7**: 14.
- Inglis, G. D., L. J. Yanke, et al. (1999). "The influence of bacterial inoculants on the microbial ecology of aerobic spoilage of barley silage." Can J Microbiol **45**(1): 77-87.
- Janeway, C. and P. Travers (1997). Immunologie. 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Kersten, B., L. Burkle, et al. (2002). "Large-scale plant proteomics." Plant Mol Biol **48**(1-2): 133-141.
- Konthur, Z., M. Hust, et al. (2005). "Perspectives for systematic in vitro antibody generation." Gene **364**: 19-29.
- Lastres-Becker, I., U. Rub, et al. (2008). "Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2)." Cerebellum **7**(2): 115-124.
- Li, B. and S. Fields (1993). "Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system." Faseb J **7**(10): 957-963.

Li, H., S. H. Li, et al. (2000). "Amino-terminal fragments of mutant huntingtin show selective accumulation in striatal neurons and synaptic toxicity." Nat Genet **25**(4): 385-389.

Li, J. J. and I. Herskowitz (1993). "Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system." Science **262**(5141): 1870-1874.

Licitra, E. J. and J. O. Liu (1996). "A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 12817-12821.

Lin, H. and V. W. Cornish (2002). "Screening and selection methods for large-scale analysis of protein function." Angew Chem Int Ed Engl **41**(23): 4402-4425.

Loiset, G. A., I. Lobersli, et al. (2005). "Construction, evaluation and refinement of a large human antibody phage library based on the IgD and IgM variable gene repertoire." J Immunol Methods **299**(1-2): 47-62.

Luesch, H., S. K. Chanda, et al. (2006). "A functional genomics approach to the mode of action of apratoxin A." Nat Chem Biol **2**(3): 158-167.

Lunkes, A., K. S. Lindenberg, et al. (2002). "Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions." Mol Cell **10**(2): 259-269.

McCafferty, J., A. D. Griffiths, et al. (1990). "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains." Nature **348**(6301): 552-554.

Morfill, J., K. Blank, et al. (2007). "Affinity-matured recombinant antibody fragments analyzed by single-molecule force spectroscopy." Biophys J **93**(10): 3583-3590.

Nechiporuk, A., I. Lopes-Cendes, et al. (1996). "Genetic mapping of the spinocerebellar ataxia type 2 gene on human chromosome 12." Neurology **46**(6): 1731-1735.

Nonhoff, U., M. Ralser, et al. (2007). "Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules." Mol Biol Cell **18**(4): 1385-1396.

Nonis, D., M. H. Schmidt, et al. (2008). "Ataxin-2 associates with the endocytosis complex and affects EGF receptor trafficking." Cell Signal **20**(10): 1725-1739.

Nord, O., M. Uhlen, et al. (2003). "Microbead display of proteins by cell-free expression of anchored DNA." J Biotechnol **106**(1): 1-13.

- Ohage, E. and B. Steipe (1999). "Intrabody construction and expression. I. The critical role of VL domain stability." J Mol Biol **291**(5): 1119-1128.
- Ohage, E. C., P. Wirtz, et al. (1999). "Intrabody construction and expression. II. A synthetic catalytic Fv fragment." J Mol Biol **291**(5): 1129-1134.
- Ralser, M., H. Goehler, et al. (2005). "Generation of a yeast two-hybrid strain suitable for competitive protein binding analysis." Biotechniques **39**(2): 165-166, 168.
- Ralser, M., U. Nonhoff, et al. (2005). "Ataxin-2 and huntingtin interact with endophilin-A complexes to function in plastin-associated pathways." Hum Mol Genet **14**(19): 2893-2909.
- Sanchez, I., C. Mahlke, et al. (2003). "Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders." Nature **421**(6921): 373-379.
- Sanpei, K., H. Takano, et al. (1996). "Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT." Nat Genet **14**(3): 277-284.
- Satterfield, T. F. and L. J. Pallanck (2006). "Ataxin-2 and its Drosophila homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes." Hum Mol Genet **15**(16): 2523-2532.
- Saunders, H. M. and S. P. Bottomley (2009). "Multi-domain misfolding: understanding the aggregation pathway of polyglutamine proteins." Protein Eng Des Sel **22**(8): 447-451.
- Schmiedl, A. and S. Dübel (2004). Rekombinante Antikörper & Phagen-Display. Molekulare Biotechnologie. M. Wink, Wiley-VCH: 511-542.
- Schols, L., P. Bauer, et al. (2004). "Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis." Lancet Neurol **3**(5): 291-304.
- Schols, L., S. Szymanski, et al. (2000). "Genetic background of apparently idiopathic sporadic cerebellar ataxia." Hum Genet **107**(2): 132-137.
- SenGupta, D. J., B. Zhang, et al. (1996). "A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8496-8501.
- Shibata, H., D. P. Huynh, et al. (2000). "A novel protein with RNA-binding motifs interacts with ataxin-2." Hum Mol Genet **9**(9): 1303-1313.

- Skerra, A. and A. Pluckthun (1988). "Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli." Science **240**(4855): 1038-1041.
- Stevanin, G., Y. Trottier, et al. (1996). "Screening for proteins with polyglutamine expansions in autosomal dominant cerebellar ataxias." Hum Mol Genet **5**(12): 1887-1892.
- Taussig, M. J., O. Stoevesandt, et al. (2007). "ProteomeBinders: planning a European resource of affinity reagents for analysis of the human proteome." Nat Methods **4**(1): 13-17.
- Tuerk, C. and L. Gold (1990). "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase." Science **249**(4968): 505-510.
- Wadia, N. H. and R. K. Swami (1971). "A new form of heredo-familial spinocerebellar degeneration with slow eye movements (nine families)." Brain **94**(2): 359-374.
- Wang, M. M. and R. R. Reed (1993). "Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast." Nature **364**(6433): 121-126.
- Wang, Z. F., M. L. Whitfield, et al. (1996). "The protein that binds the 3' end of histone mRNA: a novel RNA-binding protein required for histone pre-mRNA processing." Genes Dev **10**(23): 3028-3040.
- Whittington, H. A., L. J. Ashworth, et al. (1998). "Recombinant adenoviral delivery for in vivo expression of scFv antibody fusion proteins." Gene Ther **5**(6): 770-777.
- Yang, Q., Y. Hashizume, et al. (1999). "Neuropathological study of cerebellar degeneration in prion disease." Neuropathology **19**(1): 33-39.
- zu Putlitz, J., A. Skerra, et al. (1998). "Cloning, bacterial synthesis, and characterization of immunoglobulin variable regions of a monoclonal antibody specific for the hepatitis B virus X protein." Gene **221**(1): 143-149.

## **6. Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass die hier vorliegende Arbeit von mir selbstständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Tonio Schütze, Berlin 2010

## **7. Danksagung**

Ich danke Prof. Dr. Hans Lehrach und Prof. Dr. Werner Reutter für die freundliche Übernahme des Haupt- und Korreferats meiner Arbeit.

Ich möchte mich sehr herzlich bei Dr. Sylvia Krobitch und Dr. Zoltán Konthur für die freundliche Begleitung vom Bewerbungsgespräch bis zur Abgabe bedanken. Genauso wie die fachliche Hilfe und Diskussionen, hat mir das ein- oder andere Schulterklopfen in meiner Arbeit und persönlich vorangebracht.

Aus den Arbeitsgruppen möchte ich mich besonders bei Linda Hallen bedanken, ohne die, die fluoreszenzmikroskopischen Bilder nicht so schön geworden wären. Für die gesamten Hefearbeiten war Silke Wehrmeyer eine unersetzliche Hilfe. Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Carola Stochek, die vom ersten bis zum letzten Tag auf jede Frage eine Antwort wusste. Dr. Volker Sievert möchte für die praktische Betreuung und für seine ständige Bereitschaft sowie sein fleißiges Korrekturlesen danken. Yuliya, Susanna, Flo und Steo möchte ich für die schöne Arbeitsatmosphäre danken. Dejan war nicht nur für mein leibliches Wohl wichtig, sondern ein sehr angenehmer Diplomandenkollege.

Ohne meine Familie und meine Freunde wäre diese Arbeit ebenfalls nicht möglich gewesen. Ich möchte besonders Marcel, Antje, Jana sowie meine Mitbewohner hervorheben und mich herzlich für die Unterstützung in all den Jahren bedanken.

## 8. Anhang

**Tabelle 8-1: Auswertung der Sequenzierung der 46 validierten Hefekandidaten.** Es ist angegeben wie viele Klone die am meisten vorhandenen Intrabody tragen (max. 4). Außerdem ist angegeben wie viele unterschiedliche Intrabodies in den vier *E. coli*-Subklonen des Hefekandidaten gefunden wurden. Wenn dies nur ein einziger Intrabody war, war es ein monoklonaler Hefekandidatenklon und dies wurde fett markiert. Bei zwei bis vier Intrabodies handelt es sich um oligoklonale Hefekandidatenklone. *E. coli*-Subklone bei denen beide Sequenzen nicht auswertbar waren sind in der letzten Spalte angegeben

Hefe-Kandidat	Klone mit gleichem Intrabody	individuelle Intrabodies	Klone ohne auswertbare Sequenz	Hefe-Kandidat	Klone mit gleichem Intrabody	individuelle Intrabodies	Klone ohne auswertbare Sequenz
1	2	1	2	24	4	2	0
2	0	0	4	25	3	3	1
3	2	3	1	26	2	1	2
4	0	0	4	27	2	4	0
5	2	1	2	28	2	2	1
6	4	1	0	29	3	1	1
7	0	0	4	30	3	2	1
8	3	2	0	31	2	2	1
9	3	1	1	32	3	2	0
10	2	3	0	33	1	2	2
11	3	2	0	34	3	3	0
12	3	2	0	35	4	1	0
13	3	2	0	36	3	3	0
14	1	3	1	37	2	3	0
15	2	2	2	38	2	2	1
15	2	2	1	39	2	3	1
17	2	2	0	40	2	3	1
18	3	2	0	41	3	1	1
19	3	3	0	42	2	2	1
20	2	2	1	43	4	1	0
21	4	1	0	44	2	2	1
22	1	2	2	45	2	3	0
23	1	1	3	46	3	2	1

Tabelle 8-2 Übersicht aller Subklone der 45 Hefekandidaten

					variable Regionen der schweren Kette			variable Regionen der leichten Kette		
					CDR 1	CDR 2	CDR 3	CDR 1	CDR 2	CDR 3
						* * * * *	****		* *	**** *
Intrabody	Kandidat	Datenbankname	Datenbankname Hefekandidat	Hefekandidat	SYAMS	-I---G--T-YADSVKG	---FDY	RASQSISSYLN	-AS-LQS	QQ----P-
Intra 10	01-1	MST.0005.0003_A5 & B5	NT22+SH3GL3_NLSnaive_B2	Naive pl 2 B 02	SYAMS	DITTDGSGTNYADSVKG	SSSAFDY	RASQSISSYLN	TASDLQS	QQDADAPA
Intra 10	01-2	MST.0005.0004_A7 & B7	NT22+SH3GL3_NLSnaive_B2	Naive pl 2 B 02	SYAMS	DITTDGSGTNYADSVKG	SSSAFDY	RASQSISSYLN	TASDLQS	QQDADAPA
///	2	keine sequenzierten Klone!	NT22+SH3GL3_NLSnaive_C14	Naive pl 2 C 14						
///	2-1	MST.0005.0014_C03	NT22+SH3GL3_NLSnaive_C14	Naive pl 2 C 14						
Intra 29	03-1a	MST.0005.0010_A19	NT22+SH3GL3_NLSnaive_C22	Naive pl 2 C 22	SYAMS	TIGSTGYSTSYADSVKG	SCGSFDY	RASQSISSYLN	TASSLQS	QQTTTGP
Intra 30	03-1b	MST.0005.0010_B19	NT22+SH3GL3_NLSnaive_C22	Naive pl 2 C 22	SYAMS	TIGTTGYNTNYADSVKG	XCGSFDY			
Intra 29	03-2a	MST.0005.0011_A21	NT22+SH3GL3_NLSnaive_C22	Naive pl 2 C 22	SYAMS	TIGSTGYSTSYADSVKG	SCGSFDY	RASQSISSYLN	TASSLQS	QQTTTGP
Intra 05	03-2b	MST.0005.0011_B21	NT22+SH3GL3_NLSnaive_C22	Naive pl 2 C 22	SYAMS	AISSTGSDTDYADSVKG	YSAFDY	RASQSISSYLN	DASSLQS	QQYGNAPD
Intra 30	03-3	MST.0005.0009_B17	NT22+SH3GL3_NLSnaive_C22	Naive pl 2 C 22	SYAMS	TIGTTGYXTXYADSVKG	NCGSFDY	RASQSISSYLN	XASNLQS	QQTTTTPX
///	4	keine sequenzierten Klone!	NT22+SH3GL3_NLSnaive_E16	Naive pl 2 E 16						
Intra 34	05-1	MST.0005.0017_C9 & D9	NT22+SH3GL3_NLSnaive_P12	Naive pl 3 P 12	SYAMS	TIYAGGNNTNYADSVKG	SNDSFDY	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSGTDP .
Intra 34	05-2	MST.0005.0018_C11 & D11	NT22+SH3GL3_NLSnaive_P12	Naive pl 3 P 12	SYAMS	TIYAGGNNTNYADSVKG	SNDSFDY	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSGTDP .
///	05-3	MST.0005.0019_C13	NT22+SH3GL3_NLSnaive_P12	Naive pl 3 P 12						
Intra 19	06-1	MST.0003.0182_K10 & L10	NT22+SH3GL3_HypR3_pl2_G_22	R 3 pl 2 G 22	SYAMS	SINASGDSTSYADSVKG	ASGDFDY	RASQSISSYLN	SASKLQS	QQSTNAPC
Intra 19	06-2	MST.0003.0183_K12 & L12	NT22+SH3GL3_HypR3_pl2_G_22	R 3 pl 2 G 22	SYAMS	SINASGDSTSYADSVKG	ASGDFDY	RASQSISSYLN	SASKLQS	QQSTNAPC
Intra 19	06-3	MST.0003.0184_K14 & L14	NT22+SH3GL3_HypR3_pl2_G_22	R 3 pl 2 G 22	SYAMS	SINASGDSTSYADSVKG	ASGDFDY	RASQSISSYLN	SASKLQS	QQSTNAPC
Intra 19	06-4	MST.0003.0185_K16 & L16	NT22+SH3GL3_HypR3_pl2_G_22	R 3 pl 2 G 22	SYAMS	SINASGDSTSYADSVKG	ASGDFDY	RASQSISSYLN	SASKLQS	QQSTNAPC
///	7	keine sequenzierten Klone!	NT22+SH3GL3_HypR3_pl2_H 09	R 3 pl 2 H 09						
///	07-1	MST.0005.0027_E5 & F5	NT22+SH3GL3_HypR3_pl2_H 09	R 3 pl 2 H 09						

///	07-2	MST.0003.0186_L18	NT22+SH3GL3_HypR3_pl2_H 09	R 3 pl 2 H 09						
Intra 05	08-1	MST.0005.0021_C17 und D17	NT22+SH3GL3_HypR3_pl2_H 23	R 3 pl 2 H 23	SYAMS	AISSTGSDTDYADSVKG	YYSAFDY	RASQSISSYLN	DASSLQS	QQYGNAPD
Intra 29	08-2	MST.0005.0022_D19 & C19	NT22+SH3GL3_HypR3_pl2_H 23	R 3 pl 2 H 23	SYAMS	TIGSTGYSTSYADSVKG	SCGSFDY	RASQSISSYLN	TASSLQS	QQTTTGPG
Intra 05	08-3	MST.0005.0023_C21 & D21	NT22+SH3GL3_HypR3_pl2_H 23	R 3 pl 2 H 23	SYAMS	AISSTGSDTDYADSVKG	YYSAFDY	RASQSISSYLN	DASSLQS	QQYGNAPD
Intra 05	08-4	MST.0005.0024_D23	NT22+SH3GL3_HypR3_pl2_H 23	R 3 pl 2 H 23	SYAMS	AISSTGSDTDYADSVKG	YYSAFDY	RASQSISSYLN	DASSLQS	QQYGNAPD
Intra 34	09-1	MST.0005.0029_E9 & F9	NT22+SH3GL3_HypR3_pl2_I_12	R 3 pl 2 I 12	SYAMS	TIYAGGNNTNYADSVKG	SNDSFDY	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSGTDPN
Intra 34	09-2	MST.0005.0031_F13	NT22+SH3GL3_HypR3_pl2_I_12	R 3 pl 2 I 12	SYAMS	TIYAGGNNTNYADSVKG	SNDSFDY	RASQSISSYLN	AASSLQS	
Intra 34	09-3	MST.0005.0032_E15 & F15	NT22+SH3GL3_HypR3_pl2_I_12	R 3 pl 2 I 12	SYAMS	TIYAGGNNTNYADSVKG	SNDSFDY	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSGTDPN
Intra 01	10-1	MST.0005.0035_E21 & F21	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_F 04	R 3 pl 3 F 04	SYAMS	AIDAYGNNTSYADSVKG	GTSSFDY	RASQSISSYLN	NASSLQS	QQSNDAPS
Intra 01	10-2	MST.0005.0036_E23 & F23	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_F 04	R 3 pl 3 F 04	SYAMS	AIDAYGNNTSYADSVKG	GTSSFDY	RASQSISSYLN	NASSLQS	QQSNDAPS
Intra 05	10-3	MST.0005.0033_E17 & F17	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_F 04	R 3 pl 3 F 04	SYAMS	AISSTGSDTDYADSVKG	YYSAFDY	RASQSISSYLN	DASSLQS	QQYGNAPD
Intra 22	10-4	MST.0005.0034_E19	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_F 04	R 3 pl 3 F 04	SYAMS	SINYSGSYTAYADSMKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA
Intra 21	11-1	MST.0005.0038_G3 & H3	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_F_08	R 3 pl 3 F 08	SYAMS	SINYNGCCTTYADSVKG	GYDNFDY	RASQSISSYLN	DASGLQS	QQSASTPS
Intra 21	11-2	MST.0005.0039_G5 & H5	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_F_08	R 3 pl 3 F 08	SYAMS	SINYNGCCTTYADSVKG	GYDNFDY	RASQSISSYLN	DASGLQS	QQSASTPS
Intra 21	11-3	MST.0005.0040_G7 & H7	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_F_08	R 3 pl 3 F 08	SYAMS	SINYNGCCTTYADSVKG	GYDNFDY	RASQSISSYLN	DASGLQS	QQSASTPS
Intra 37	11-4	MST.0005.0037_H1	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_F_08	R 3 pl 3 F 08	SYAMS	YITSNGYDTTYADSVKG	YNNSFDY	RASQSISSYLN	GASTLQS	QQDANAPT
Intra 01	12-1	MST.0005.0048_G23	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_G_03	R 3 pl 3 G 03	SYAMS	AIDAYGNNTSYADSVKG	GTSSFDY	RASQSISSYLN	NASSLQS	
Intra 26	12-2	MST.0005.0045_G17 & H 17	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_G_03	R 3 pl 3 G 03	SYAMS	SITTINGSTDYADSVKG	DTASFDY	RASQSISSYLN	SASSLQS	QQTANAPS
Intra 26	12-3	MST.0005.0046_H19	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_G_03	R 3 pl 3 G 03	SYAMS	SITTINGSTDYADSVKG	DTASFDY	RASQSISSYLN	SASSLQS	QQTANAPS
Intra 26	12-4	MST.0005.0047_G21 & H21	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_G_03	R 3 pl 3 G 03	SYAMS	SITTINGSTDYADSVKG	DTASFDY	RASQSISSYLN	SASSLQS	QQTANAPS
Intra 15	13-1	MST.0005.0042_H11	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_G_15	R 3 pl 3 G 15	SYAMS	NIYSTGAGTYADSVKG	NSYAFDY	RASQSISSYLN	SASCLQS	QQSTYGPT
Intra 17	13-2	MST.0005.0041_G09 & H09	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_G_15	R 3 pl 3 G 15	SYAMS	SIGDSGGNTTYADSVKG	YYSAFDY	RASQSISSYLN	DASSLQS	
Intra 17	13-3	MST.0005.0042_G13 & H13	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_G_15	R 3 pl 3 G 15	SYAMS	SIGDSGGNTTYADSVKG	YYSAFDY	RASQSISSYLN	DASSLQS	
Intra 17	13-4	MST.0005.0044_G15 & H15	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_G_15	R 3 pl 3 G 15	SYAMS	SIGDSGGNTTYADSVKG	YYSAFDY	RASQSISSYLN	DASSLQS	

Intra 21	14-1	MST.0005.0050_I3 & J3	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_01	R 3 pl 3 I 01	SYAMS	SINYNGCCTTYADSVKG	GYDNFDY	RASQSISSYLN	DASGLQS	QQSASTPX
Intra 25	14-2	MST.0005.0049_I1 & J1	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_01	R 3 pl 3 I 01	SYAMS	SISSSGSYTAYADSVKG	SADNFDY	RASQSISSYLN	AASNLQS	QQSAAYPA
Intra 33	14-3	MST.0005.0051_I5 & J5	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_01	R 3 pl 3 I 01	SYAMS	TITAGGYATDYADSVKG	TYDSFDY	RASQSISSYLN	SASTLQS	QQDTATPT
Intra 09	15-1	MST.0005.0159_K4 & L4	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_02	R 3 pl 3 I 02	SYATS	DISSSGTSTDYADSVKG	TYDSFDY	RASQSISSYLN	SASALQS	QQTSDNPS
Intra 08	15-2	MST.0005.0160_K6 & L6	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_02	R 3 pl 3 I 02	SYAMS	DISACGSTTTYADSVKG	NYADFDY	RASQSISSYLN	AASNLQS	QQGDSAPX
Intra 23	15-3	MST.0003.0190_M2 & N2	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_02	R 3 pl 3 I 02	SYAMS	SINYSGYTTYADSVKG	SNTAFDY	RASQSISSYLN	SASNLQS	QQGSAAPA
Intra 08	15-4	MST.0003.0191_M4 & N4	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_02	R 3 pl 3 I 02	SYAMS	DISACGSTTTYADSVKG	NYADFDY	RASQSISSYLN	AASNLQS	QQGDSAPX
Intra 23	15-5	MST.0003.0193_M8 & N8	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_02	R 3 pl 3 I 02	SYAMS	SINYSGYTTYADSVKG	SNTAFDY	RASQSISSYLN	SASNLQS	QQGSAAPA
Intra 03	17-1	MST.0005.0061_K1 & L1	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_04	R 3 pl 3 I 04	SYAMS	AINYSGDSTDYADSVKG	TTSTFDY	RASQSISSYLN	SASALQS	QQSTNSPT
Intra 03	17-2	MST.0005.0064_K7 & L7	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_04	R 3 pl 3 I 04	SYAMS	AINYSGDSTDYADSVKG	TTSTFDY	RASQSISSYLN	SASALQS	QQSTNSPT
Intra 36	17-3	MST.0005.0062_K3 & L3	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_04	R 3 pl 3 I 04	SYAMS	YISG... YADSVKG	GASAFDY	RASQSISSYLN	SASYLQS	QQYAADPS
Intra 36	17-4	MST.0005.0063_K5 & L5	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_04	R 3 pl 3 I 04	SYAMS	YISG... YADSVKG	GASAFDY	RASQSISSYLN	SASYLQS	QQYAADPS
Intra 15	18-1	MST.0005.0053_I09 & J09	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_10	R 3 pl 3 I 10	SYAMS	NIYSTGAGTYADSVKG	NSYAFDY	RASQSISSYLN	SASCLQS	QQSTYGPT
Intra 15	18-2	MST.0005.0054_I11 & J11	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_10	R 3 pl 3 I 10	SYAMS	NIYSTGAGTYADSVKG	NSYAFDY	RASQSISSYLN	SASCLQS	QQSTYGPT
Intra 15	18-3	MST.0005.0056_I15 & I15	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_10	R 3 pl 3 I 10	SYAMS	NIYSTGAGTYADSVKG	NSYAFDY	RASQSISSYLN	SASCLQS	QQSTYGPT
Intra 19	18-4	MST.0005.0055_I13 & J13	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_10	R 3 pl 3 I 10	SYAMS	SINASGDSTSYADSVKG	ASGDFDY	RASQSISSYLN	SASKLQS	QQSTXAPC
Intra 22	19-1a	MST.0005.0058_I19	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_21	R 3 pl 3 I 21	SYAMS	SINYSGSYTAYADSVKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA
Intra 37	19-1b	MST.0005.0058_J19	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_21	R 3 pl 3 I 21	SYAMS	YITSNGYDTTYADSVKG	YSNSFDY	RASQSISSYLN	GASSLQS	QQADAAPT
Intra 31	19-2a	MST.0005.0059_I21	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_21	R 3 pl 3 I 21	SYAMS	TINYGGTYTAYADSVKG	NGDYFDY	RASQSISSYLN	SASTLQS	QQGTAGPC
Intra 22	19-2b	MST.0005.0059_J21	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_21	R 3 pl 3 I 21	SYAMS	SINYSGSYTAYADSVKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA
Intra 31	19-3	MST.0005.0057_I17 & J17	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_21	R 3 pl 3 I 21	SYAMS	TINYGGTYTAYADSVKG	NGDYFDY	RASQSISSYLN	SASTLQS	QQGTAGPC
Intra 31	19-4a	MST.0005.0060_I23	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_21	R 3 pl 3 I 21	SYAMS	TINYGGTYTAYADSVKG	NGDYFDY	RASQSISSYLN	SASTLQS	QQGTAGPC
Intra 22	19-4b	MST.0005.0060_J23	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_I_21	R 3 pl 3 I 21	SYAMS	SINYSGSYTAYXDSVKG	XAXSFDY	RASQXIXXYLN	SASDLQS	
Intra 16	20-1	MST.0005.0066_L11	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_J_01	R 3 pl 3 J 01	SYAMS	SI... TTAYADSVKG	ASGCFDY	RASQSISSYLN	DASSLQS	QQSTTTPS

Intra 19	20-2	MST.0005.0066_L13	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_J_01	R 3 pl 3 J 01	SYAMS	SINASGDSTSYADSVKG	ASGDFDY	RASQSISSYLN	SASKLQS	QQSTXAPC
Intra 19	20-3	MST.0005.0068_K15	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_J_01	R 3 pl 3 J 01	SYAMS	SINASGDSTSYADSVKG	ASGDFDY	RASQSISSYLN	SASKLQS	
Intra 37	21-1	MST.0005.0069_K17	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_J_16	R 3 pl 3 J 16	SYAMS	YITSNGYDTTYADSVKG	YSNSFDY	RASQSISSYLN	GASSLQS	QQADAAPT
Intra 37	21-2	MST.0005.0070_K19 & L19	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_J_16	R 3 pl 3 J 16	SYAMS	YITSNGYDTTYADSVKG	YSNSFDY	RASQSISSYLN	GASSLQS	QQADAAPT
Intra 37	21-3	MST.0005.0071_K21 & L21	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_J_16	R 3 pl 3 J 16	SYAMS	YITSNGYDTTYADSVKG	YSNSFDY	RASQSISSYLN	GASSLQS	QQADAAPT
Intra 37	21-4	MST.0005.0072_K23 & L23	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_J_16	R 3 pl 3 J 16	SYAMS	YITSNGYDTTYADSVKG	YSNSFDY	RASQSISSYLN	GASSLQS	QQADAAPT
Intra 02	22-1	MST.0005.0076_N7	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_J_24	R 3 pl 3 J 24	SYAMS	AIDNNGYDTTYADSVKG	TTTDFDY	RASQSISSYLN	AASDLQS	QQGCATPT
Intra 18	22-2	MST.0005.0074_M3 & N3	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_J_24	R 3 pl 3 J 24	SYAMS	SIGGDGASTNYADSVKG	CDDSDY	RASQSISSYLN	TASSLQS	QQGGTTPD
Intra 34	23-1	MST.0005.0078_N11	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_J_04	R 3 pl 3 J 04	XYAMS	TIYGYGDSTTYSDSVKG	SDDNFDY	RASXSIXSYLN	GASSLQS	
Intra 28	24-1	MST.0003.0194_M10 & N10	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_K_08	R 3 pl 3 K 08	SYAMS	TIAAAGYTTYXDSVKG	TSTAFDY	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSNTNPS
Intra 28	24-2a	MST.0003.0195_M12	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_K_08	R 3 pl 3 K 08	SYAMS	XIAAAGYTTYAHVKG	TXTAFDY	RASQSISSYLN	AASSLQS	
Intra 97	24-2b	MST.0003.0195_N12	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_K_08	R 3 pl 3 K 08	SYAMS	AIYGYGDSTTYADSVKG	SDDNFDY	RASQSISSYLN	GASSLQS	QQSSTTPD
Intra 28	24-3	MST.0003.0196_M14 & N14	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_K_08	R 3 pl 3 K 08	SYAMS	TIAAAGYTTYXDSVKG	TSTAFDY	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSNTNPS
Intra 28	24-4a	MST.0003.0197_M16	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_K_08	R 3 pl 3 K 08	SYAMS	TIAAAGYTTYXDSVKG	TSTAFDY	RASQSISSYLN	AASSLQS	
Intra 28	24-4b	MST.0003.0197_N16	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_K_08	R 3 pl 3 K 08	SYAMS	TIAAAGYTTYXDSVKG	TSTAFDY	RASQSISSYLN	AASSLQS	
Intra 02	25-1	MST.0005.0084_O7 & P7	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_L_21	R 3 pl 3 L 21	SYAMS	AIDNNGYDTTYADSVKG	TTTDFDY	RASQSISSYLN	AASDLQS	QQGCATPT
Intra 13	25-2a	MST.0005.0082_O3	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_L_21	R 3 pl 3 L 21	SYAMS	GISNAGSTTTYADSVKG	SYTAFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA
Intra 02	25-2b	MST.0005.0082_P3	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_L_21	R 3 pl 3 L 21	SYAMS	XIDNXGYXTTYXSVKG	TXTDFDY	RASQSISSYLN	AASDLQS	QQXCATPT
Intra 02	25-3a	MST.0005.0083_O5	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_L_21	R 3 pl 3 L 21	SYAMS	XIDNNGYDTTYXSVKG	TTTDFDY	RASQSISSYLN	AASXLQS	
Intra 10	25-3b	MST.0005.0083_P5	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_L_21	R 3 pl 3 L 21	SYAMS	XISNAGXTTYXSVKG	SXTXFDY	RASQSISSYLN	TASDLQS	QQXASYPX
Intra 27	26-1	MST.0005.0086_M19 & N19	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_M_04	R 3 pl 3 M 04	SYAMS	SIYSTGAATTYADSVKG	GSTSFY	RASQSISSYLN	SASSLQS	QQNNDTPS
Intra 27	26-2	MST.0005.0087_M21 & N21	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_M_04	R 3 pl 3 M 04	SYAMS	SIYXTGAATTYADSVKG	GSTSFY	RASQSISSYLN	SASNLQS	QQNNDTPS
Intra 06	27-1a	MST.0005.0091_O13	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_M_06	R 3 pl 3 M 06	SYAMS	AISYNGDATXYADSVKG	XAANFDY	RASQSISSYLN	TASALQS	

Intra 07	27-1b	MST.0005.0091_P13	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_M_06	R 3 pl 3 M 06	SYAMS	AIYGYGDSTTYADSVKG	SDDNFDY	RASQSISSYLN	GASSLQS	QQSSTTPD
Intra 06	27-2	MST.0005.0090_P11	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_M_06	R 3 pl 3 M 06	SYAMS	AISYXGDATGYADSVKG	DAANFDY	RASQSISSYLN	TASALQS	QQTANSPS
Intra 23	27-3	MST.0005.0089_P9	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_M_06	R 3 pl 3 M 06	SYAMS	SINYSGYTTYADSVKG	SNTAFDY	RASQSISSYLN	XASNLQS	QQXTAAPA
Intra 32	27-4	MST.0005.0092_O15	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_M_06	R 3 pl 3 M 06	SYAMS	TISTNGNDTGYADSVKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA
Intra 32	27-4	MST.0005.0092_P15	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_M_06	R 3 pl 3 M 06	SYAMS	TISXNGDATGYADSVKG	DAGXFDY	RASQSISSYLN	XASXLQS	QQTATSPA
Intra 04	28-1	MST.0005.0094_O23	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_N_05	R 3 pl 3 N 05	SYAMS	AISC... YADSVKG	SGAGFDY	RASQSISSYLN	NASTLQS	QQYGYAPT
Intra 04	28-2	MST.0005.0095_O17	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_N_05	R 3 pl 3 N 05	SYAMS	AISC... YADSVKG	SGAGFDY	RASQSISSYLN	NASTLQS	QXYGYAPT
Intra 12	28-3	MST.0005.0096_O19	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_N_05	R 3 pl 3 N 05	SYAMS	GIAASGDSTYYADSVKG	TYNAFDY	RASQSISSYLN	YASTLQS	QQSDYSPG
Intra 24	29-1	MST.0005.0110_C4 & D4	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_O_05	R 3 pl 3 O 05	SYAMS	SISAYGNTTGYADSVKG	SASTFDY	RASQSISSYLN	YASYLQS	QQSSSYPT
Intra 24	29-2	MST.0005.0111_C6 & D6	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_O_05	R 3 pl 3 O 05	SYAMS	SISAYGNTTGYADSVKG	SASTFDY	RASQSISSYLN	YASYLQS	QQSSSYPT
Intra 24	29-3	MST.0005.0112_C8 & D8	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_O_05	R 3 pl 3 O 05	SYAMS	SISAYGNTTGYADSVKG	SASTFDY	RASQSISSYLN	YASYLQS	QQSSSYPT
Intra 10	30-1	MST.0005.0098_A4	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_3 O_11	R 3 pl 3 O 11	SYAMS	DITTDGSGTNYADSVKG	SSSAFDY	RASQSISSYLN	TASDLQS	QQDADAPA
Intra 10	30-2	MST.0005.0099_A6 & B6	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_3 O_11	R 3 pl 3 O 11	SYAMS	DITTDGSGTNYADSVKG	SSSAFDY	RASQSISSYLN	TASDLQS	QQDADAPA
Intra 10	30-3a	MST.0005.0100_A8	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_3 O_11	R 3 pl 3 O 11	SYAMS	DITTDGSGTNYADSVKG	SSSAFDY	RASQSISSYLN	TASDLQS	QXDXXASC
Intra 24	30-3b	MST.0005.0100_B8	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_3 O_11	R 3 pl 3 O 11	SYAMS	NISAYGNXTGYADSVKG	XASTFDY	RASQSISSYLN	YASYLQS	QQSSSYPT
Intra 13	31-1	MST.0005.0101_B10	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_O_15	R 3 pl 3 O 15	SYAMS	GISNAGSTTTYADSVKG	SYTAFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	
Intra 13	31-2	MST.0005.0102_B12	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_O_15	R 3 pl 3 O 15	SYAMS	GISNAGSTTTYADSVKG	SYTAFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	
Intra 27	31-3	MST.0005.0103_B14	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_O_15	R 3 pl 3 O 15	SYAMS	SIYSTGAATTYADSVKG	GSTSFDY	RASQSISSYLN	SASSLQN	
Intra 05	32-1	MST.0005.0107_A22 & B22	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_O_24	R 3 pl 3 O 24	SYAMS	AISSTGSDTDYADSVKG	YSAFDY	RASQSISSYLN	DASSLQS	QQYGNAPD
Intra 29	32-2	MST.0005.0105_A18 & B18	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_O_24	R 3 pl 3 O 24	SYAMS	TIGSTGYSTSYADSVKG	SCGSFDY	RASQSISSYLN	TASSLQS	QQTITGPG
Intra 29	32-3	MST.0005.0106_A20 & B20	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_O_24	R 3 pl 3 O 24	SYAMS	TIGSTGYSTSYADSVKG	SCGSFDY	RASQSISSYLN	TASSLQS	QQTITGPG
Intra 30	32-4	MST.0005.0108_B24	NT22+SH3GL3_HypR3_pl3_O_24	R 3 pl 3 O 24	SYAMS	TIGXTGYNTXYADSVKG	XCGSFDY	RASQSISSYLN		
Intra 11	33-1	MST.0005.0123_F6	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_D_02	R 4 pl 1 D 02	SYAMS	DITY... YADSVKG	DSTAFDY	RASQGISSYLN	SASNLQS	QQSYSAPT

Intra 24	33-2	MST.0005.0124_E8	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_D_02	R 4 pl 1 D 02	SYAMS	XISAYGNTTGYADSVKG	SASTFDY		YASYLQS	
///	33-3	MST.0005.0121_E2	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_D_02	R 4 pl 1 D 02						
Intra 05	34-1a	MST.0005.0128_E16	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_D_09	R 4 pl 1 D 09	SYAMS	AISSTGSDTDYADSVKG	YYSAFDY	RASQSISSYLN	DASSLQS	QQYGNAPD
Intra 26	34-1b	MST.0005.0128_F16	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_D_09	R 4 pl 1 D 09	SYAMS	SITTINGGSTDYADSVKG	DTASFDY	RASQSISSYLN	SASSLQS	QQTANAPX
Intra 22	34-2	MST.0005.0125_E10	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_D_09	R 4 pl 1 D 09	SYAMS	SINYSGSYTAYADSVKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	XASDLQS	
Intra 22	34-3	MST.0005.0126_E12 & F12	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_D_09	R 4 pl 1 D 09	SYAMS	SINYSGSYTAYADSVKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASAYPA
Intra 22	34-4	MST.0005.0127_E14 & F14	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_D_09	R 4 pl 1 D 09	SYAMS	SINYSGSYTAYADSVKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASAYPA
Intra 5	35-1	MST.0005.0117_C18 & D18	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_D_16	R 4 pl 1 D 16	SYAMS	AISSTGSDTDYADSVKG	YYSAFDY	RASQSISSYLN	DASSLQS	QQYGNAPD
Intra 5	35-2	MST.0005.0119_C22 & D22	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_D_16	R 4 pl 1 D 16	SYAMS	AISSTGSDTDYADSVKG	YYSAFDY	RASQSISSYLN	DASSLQS	QQYGNAPD
Intra 5	35-3	MST.0005.0120_C24 & D24	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_D_16	R 4 pl 1 D 16	SYAMS	AISSTGSDTDYADSVKG	YYSAFDY	RASQSISSYLN	DASSLQS	QQYGNAPD
Intra 5	35-4	MST.0005.0118_C20	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_D_16	R 4 pl 1 D 16	SYAMS	AISSTGSDTXADSVKG	YYSAFDY	RASQSISSYLN	DASSLQS	QQYGNAPD
Intra 01	36-1a	MST.0005.0130_F20	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_G_21	R 4 pl 1 G 21	SYAMS	AIDAYGNNTSYADSVKG	GTSSFDY	RASQSISSYLN	NASSLQS	QQSNDAPS
Intra 22	36-1b	MST.0005.0130_E20	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_G_21	R 4 pl 1 G 21	SYAMS	SINYSGSYTAYADSMKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA
Intra 01	36-2	MST.0005.0131_E22 & F22	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_G_21	R 4 pl 1 G 21	SYAMS	AIDAYGNNTSYADSVKG	GTSSFDY	RASQSISSYLN	NASSLQS	QQSNDAPS
Intra 05	36-3a	MST.0005.0132_E24	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_G_21	R 4 pl 1 G 21	SYAMS	AISSTGSDTDYADSVKG	YYSAFDY	RASQSISSYLN	DASSLQS	QQYGNAPE
Intra 22	36-3b	MST.0005.0132_F24	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_G_21	R 4 pl 1 G 21	SYAMS	SINYSGSYTAYADSVKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA
Intra 22	36-4a	MST.0005.0129_E18	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_G_21	R 4 pl 1 G 21	SYAMS	SINYXGSYTDYADSMKG	YXXSFDY			
///	36-4b	MST.0005.0129_F18	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_G_21	R 4 pl 1 G 21						
Intra 11	37-1	MST.0005.0135_G06 & H06	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_H_06	R 4 pl 1 H 06	SYAMS	DITY. . . YADSVKG	DSTAFDY	RASQSISSYLN	SASNLQS	QQSYSAPT
Intra 11	37-2	MST.0005.0136_H08	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_H_06	R 4 pl 1 H 06	SYAMS	DITY. . . YADSVKG	DSTAFDY	RASQSISSYLN	SASNLQS	QQSYSAPT
Intra 21	37-3	MST.0005.0133_H02	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_H_06	R 4 pl 1 H 06	SYAMS	SINYNGCCTTYTHSVKG	GYDNFDY	RASQSISSYLN	FASGLQS	
Intra 22	37-4	MST.0005.0134_G04 & H04	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_H_06	R 4 pl 1 H 06	SYAMS	SINYSGSYTAYADSVKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA
Intra 13	38-1	MST.0003.0202_P2	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_H_08	R 4 pl 1 H 08	SYAMS	GISNAGSTTTYADSVKG	SYTAFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA
Intra 13	38-2	MST.0003.0204_O6 & P6	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_H_08	R 4 pl 1 H 08	SYAMS	GISNAGSTTTYADSVKG	SYTAFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA

Intra 23	38-3	MST.0003.0205_O8 & P8	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_H_08	R 4 pl 1 H 08	SYAMS	SINYSGYTTYADSVKG	SNTAFDY	RASQSISSYLN	SASNLQS	QQGSAAPA
Intra 22	39-1	MST.0005.0142_G20 & H20	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_I_08	R 4 pl 1 I 08	SYAMS	SINYSGSYTAYADSVKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA
Intra 22	39-2	MST.0005.0143_G22 & H22	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_I_08	R 4 pl 1 I 08	SYAMS	SINYSGSYTAYADSVKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA
Intra 26	39-3	MST.0005.0141_H18	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_I_08	R 4 pl 1 I 08	SYAMS	SITXXGXXTDYADSVKG	DTXSFDY	RASQSISSYLN	SASXLQS	QQTAXXPT
///	39-4	MST.0005.0144_G24	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_I_08	R 4 pl 1 I 08						
Intra 20	40-1	MST.0005.0137_G10	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_I_21	R 4 pl 1 I 21	SYAMS	SINSDGGSATSFADSVKG	CATTLDY	RASQSIXSLYN	NASNLQS	
Intra 20	40-2a	MST.0005.0140_G16	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_I_21	R 4 pl 1 I 21	SYAMS	SINSDGGSATSFAXSVKG	CATTLDY	RASQSISSYLN	NASNLQS	QQSASYPA
Intra 26	40-2b	MST.0005.0140_H16	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_I_21	R 4 pl 1 I 21	SYAMS	SITTINGSTXYXNSVKG	DATSFDY	RASQSISSYLN	SASSLQS	
Intra 05	40-3	MST.0005.0139_H14	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_I_21	R 4 pl 1 I 21	SYAMS	SIXDSGGNTTYADSVKG	YYSALQS	RASQXIXSYLN	DASSLQS	QQYGNAPD
Intra 22	41-1	MST.0003.0199_M20 & N20	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_K_03	R 4 pl 1 K 03	SYAMS	SINYSGSYTAYADSVKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA
Intra 22	41-2	MST.0003.0200_M22 & N22	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_K_03	R 4 pl 1 K 03	SYAMS	SINYSGSYTAYADSVKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA
Intra 22	41-3	MST.0003.0201_M24 & N24	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_K_03	R 4 pl 1 K 03	SYXMS	SINYSGSYTAYADSVKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA
Intra 14	42-1	MST.0005.0145_I2 & J2	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_K_17	R 4 pl 1 K 17	SYAMS	NIYDSGDNTAYADSVKG	NYAGFDY	RASQSISSYLN	NASTLQS	QQASGTPG
Intra 14	42-2	MST.0005.0147_I6 & J6	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_K_17	R 4 pl 1 K 17	SYAMS	NIYDSGDNTAYADSVKG	NYAGFDY	RASQSISSYLN	NASTLQS	QQASGTPG
Intra 21	42-3	MST.0005.0146_I4 & J4	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_K_17	R 4 pl 1 K 17	SYAMS	SINYNGCCTTYADSVKG	GYDNFDY	RASQSISSYLN	DASGLQS	QQSASTPS
Intra 13	43-1	MST.0005.0114_C12 & D12	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_M_08	R 4 pl 1 M 08	SYAMS	CISNAGSTTTYADSVKG	SYTAFDY			
Intra 13	43-2	MST.0005.0113_C10 & D10	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_M_08	R 4 pl 1 M 08	SYAMS	GISNAGSTTTYADSVKG	SYTAFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA
Intra 13	43-3	MST.0005.0115_C14 & D14	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_M_08	R 4 pl 1 M 08	SYAMS	GISNAGSTTTYADSVKG	SYTAFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA
Intra 13	43-4	MST.0005.0116_C16 & D16	NT22+SH3GL3_HypR4_pl1_M_08	R 4 pl 1 M 08	SYAMS	GISNAGSTTTYADSVKG	SYTAFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA
Intra 07	44-1	MST.0003.0208_O14 & P14	NT22+SH3GL3_HypR4_pl2_F_11	R 4 pl 2 F 11	SYAMS	AIYGYGDSTTYADSVKG	SDDNFDY	RASQSISSYLN	GASSLQS	QQSSTTPD
Intra 32	44-2	MST.0003.0206_P10	NT22+SH3GL3_HypR4_pl2_F_11	R 4 pl 2 F 11	SYAMS	TISTNGNDTGYADSVKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	YASDLQS	QQSASYPA
Intra 32	44-3	MST.0003.0209_O16 & P16	NT22+SH3GL3_HypR4_pl2_F_11	R 4 pl 2 F 11	SYAMS	TISTNGNDTGYADSVKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	YASDLQS	QQSASYPA
///	44-4	MST.0003.0207_O12	NT22+SH3GL3_HypR4_pl2_F_11	R 4 pl 2 F 11						

Intra 35	45-1	MST.0005.0149_I10 & J10	NT22+SH3GL3_HypR4_pl2_G_06	R 4 pl 2 G 06	SYAMS	YIDSSGSGTDYADSVKG	TSYAFDY	RASQSISSYLN	YASSLQS	QQSASYPA
Intra 17	45-2	MST.0005.0151_I14	NT22+SH3GL3_HypR4_pl2_G_06	R 4 pl 2 G 06	SYAMS	SIGDSSGGNTTYADSVKG	YYSAFDY	RASQSISSYLN		
Intra 35	45-3	MST.0005.0150_I12	NT22+SH3GL3_HypR4_pl2_G_06	R 4 pl 2 G 06	SYAMS	YIDSSGSGTDYADSVKG	TSYAFDY	RASQSISSYLN	YASSLQS	
Intra 22	45-4	MST.0005.0152_I16	NT22+SH3GL3_HypR4_pl2_G_06	R 4 pl 2 G 06		SINYSGSGTYAYXXSVKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	XQSASYPA
Intra 22	46-1	MST.0005.0154_I20 & J20	NT22+SH3GL3_HypR4_pl3_F_09	R 4 pl 3 F 09	SYAMS	SINYSGSGTYAYADSVKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA
Intra 22	46-2	MST.0005.0155_I22 & J22	NT22+SH3GL3_HypR4_pl3_F_09	R 4 pl 3 F 09	SYAMS	SINYSGSGTYAYADSVKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA
Intra 26	46-3a	MST.0005.0153_I18	NT22+SH3GL3_HypR4_pl3_F_09	R 4 pl 3 F 09	SYAMS	SITXXGGXTDYADSVKG	DATAFDY	RASQSISSYLN	SASXLQS	QQTAXAPX
Intra 22	46-3b	MST.0005.0153_J18	NT22+SH3GL3_HypR4_pl3_F_09	R 4 pl 3 F 09	SYAMS	SINYSGSGTYAYXNSVKG	DAGSFDY	RASQSISSYLN	SASDLQS	QQSASYPA