

**Untersuchungen zum Verständnis der biologischen Funktion des
eukaryotischen Initiationsfaktors 5A (eIF-5A)
und dessen Hypusinmodifikation**

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Henning Sievert
aus Kiel

Hamburg März 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. J. HAUBER
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Priv.-Doz. Dr. S. HOFFMEISTER-ULLERICH
Tag der Disputation: 01. Juni 2012

Hamburg, den 18. Mai 2012



Professor Dr. J. Fromm
Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

Any living cell carries with it the experiences of a billion years of experimentation by its ancestors. You cannot expect to explain so wise an old bird in a few simple words.

Max Delbrück, *A Physicist Looks at Biology* (1949)

I. Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|-----|
| I. | Inhaltsverzeichnis..... | i |
| II. | Abkürzungsverzeichnis..... | iii |
| III. | Zusammenfassung..... | v |
| IV. | <i>Abstract</i> | vi |
| 1. | Einleitung..... | 1 |
| 1.1. | Die Biologie der Hypusinsynthese..... | 1 |
| 1.1.1. | Funktionen von eIF-5A..... | 2 |
| 1.1.2. | Isoformen von eIF-5A..... | 4 |
| 1.1.3. | Evolutionäre Konservierung von eIF-5A in Eukaryoten..... | 5 |
| 1.2. | Biomedizinisches Potential von eIF-5A..... | 5 |
| 1.3. | Die Rolle der Deoxyhypusin Hydroxylase (DOHH)..... | 7 |
| 1.4. | Offene Fragen in der Erforschung von eIF-5A und der Hypusinmodifikation..... | 8 |
| 1.5. | Werkzeuge zur Untersuchung von Proteinfunktionen..... | 10 |
| 1.5.1. | Mausmodelle zur Untersuchung von Proteinfunktionen <i>in vivo</i> | 10 |
| 1.5.2. | Methoden zur Aufklärung von Protein-Protein Interaktionen..... | 11 |
| 1.6. | Fragestellung..... | 13 |
| 2. | Material und Methoden..... | 16 |
| 2.1. | Material..... | 16 |
| 2.1.1. | <i>Kits</i> | 16 |
| 2.1.2. | Enzyme..... | 16 |
| 2.1.3. | Größenmarker für DNA und Proteine..... | 16 |
| 2.1.4. | Chemikalien, Reagenzien und Puffer..... | 16 |
| 2.1.5. | Geräte..... | 17 |
| 2.1.6. | Bakterienstämme..... | 18 |
| 2.1.7. | Zelllinien und primäre Zellen..... | 18 |
| 2.1.8. | Mausstämme..... | 19 |
| 2.1.9. | Vektorsysteme..... | 20 |
| 2.1.10. | Puffer und Lösungen..... | 21 |
| 2.1.11. | Antikörper..... | 25 |
| 2.1.12. | Oligonukleotide (<i>Primer</i>)..... | 25 |
| 2.2. | Methoden..... | 29 |
| 2.2.1. | Zellkultur..... | 29 |
| 2.2.2. | Methoden zur Herstellung einer <i>knock-out</i> Mauslinie..... | 33 |
| 2.2.3. | Tierexperimentelle Methoden..... | 39 |
| 2.2.4. | Molekularbiologische Methoden..... | 40 |
| 2.2.5. | Proteinbiochemische Methoden..... | 45 |
| 2.2.6. | TAP-Assay und Identifizierung von Protein-Protein Interaktionen durch massenspektrometrische Analyse..... | 47 |
| 2.2.7. | Zellbiologische Methoden..... | 49 |
| 2.2.8. | Bioinformatische Methoden..... | 50 |
| 2.2.9. | Statistische Auswertungen..... | 50 |
| 3. | Ergebnisse..... | 52 |
| 3.1. | Herstellung eines konditionalen <i>knock-out</i> Mausmodells der Deoxyhypusin Hydroxylase..... | 53 |
| 3.1.1. | <i>Knock-out</i> Strategie und Herstellung des <i>Targeting</i> -Vektors..... | 53 |
| 3.1.2. | <i>Targeting</i> von embryonalen Stammzellen, Blastozysten-Transfer..... | 59 |
| 3.1.3. | Genotypisierungs- und Rückkreuzungsstrategie..... | 61 |
| 3.1.4. | Konditionaler und konstitutiver <i>Knock-out</i> des <i>Dohh</i> -Gens..... | 63 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 3.2. | Charakterisierung des <i>Dohh Knock-out</i> Phänotyps..... | 64 |
| 3.2.1. | Der heterozygote <i>Dohh</i> -KO führt postnatal zu verzögertem Wachstum | 64 |
| 3.2.2. | Der <i>Dohh</i> -KO bewirkt einen letalen Phänotyp in der frühen Embryogenese..... | 64 |
| 3.2.3. | Histologische Untersuchung von Mäusen mit <i>Dohh</i> ^{+/-} -Genotyp | 67 |
| 3.2.4. | Konditionaler <i>Knock-out</i> des <i>Dohh</i> -Allels | 68 |
| 3.3. | Herstellung einer Zelllinie für den konditionalen <i>Dohh</i> -KO <i>in vitro</i> | 69 |
| 3.3.1. | <i>Knock-out</i> des <i>Dohh</i> -Allels <i>in vitro</i> : Nachweis des <i>Dohh</i> -KO | 70 |
| 3.3.2. | <i>Knock-out</i> des <i>Dohh</i> -Allels <i>in vitro</i> : Effekt auf die Hypusinmodifikation von eIF-5A1 | 72 |
| 3.3.3. | <i>In vitro Knock-out</i> des <i>Dohh</i> -Allels: Effekt auf die Proliferation | 73 |
| 3.3.4. | <i>Knock-out</i> des <i>Dohh</i> -Allels <i>in vitro</i> : Zelluläre Seneszenz | 74 |
| 3.3.5. | <i>Knock-out</i> des <i>Dohh</i> -Allels <i>in vitro</i> : Zellzyklusanalyse | 75 |
| 3.4. | Bestimmung des Hypusin-Interaktionsnetzwerks | 77 |
| 3.4.1. | Etablierung eines hochsensitiven Assays zur Ermittlung von Protein-Protein Interaktionen: ‚Bioreaktor-TAP-MS/MS‘ | 77 |
| 3.4.2. | Erstellung eines Interaktionsnetzwerkes für alle an der Hypusinsynthese beteiligten Proteine..... | 81 |
| 3.4.3. | <i>Cluster</i> -Analyse des Protein-Protein Interaktionsnetzwerkes..... | 85 |
| 3.4.4. | <i>Gene Ontology</i> Analyse der potentiellen Interaktionspartner von eIF-5A1, eIF-5A2, DHS und DOHH | 86 |
| 3.4.5. | Evolutionäre Entwicklung des Interaktionsnetzwerks hypusinierungsrelevanter Proteine..... | 93 |
| 3.4.6. | Experimentelle Validierung eines Teils der identifizierten Interaktionspartner von eIF-5A, DHS und DOHH..... | 95 |
| 3.4.7. | Untersuchung der Hypusinabhängigkeit von und weitere Validierung einiger in dieser Arbeit identifizierter Interaktionen mit eIF-5A | 97 |
| 4. | Diskussion | 103 |
| 4.1. | Der <i>Dohh Knock-out</i> | 103 |
| 4.1.1. | Etablierung einer <i>Dohh knock-out</i> Mauslinie..... | 103 |
| 4.1.2. | <i>In vivo</i> -Charakterisierung des <i>Dohh knock-out</i> | 105 |
| 4.1.3. | Erkenntnisse aus dem <i>Dohh knock-out in vitro</i> | 108 |
| 4.2. | Das Protein-Protein Interaktionsnetzwerk hypusinrelevanter Proteine | 111 |
| 4.2.1. | Bioreaktor-TAP-MS/MS: Eine hochsensitive Methode zur Aufklärung von PPI..... | 111 |
| 4.2.2. | Das Interaktionsnetzwerk der hypusinrelevanten Proteine bietet Hinweise auf die molekularen Mechanismen der eIF-5A-Funktion | 112 |
| 4.2.3. | Evolutionäre Diversifikation als mögliche Grundlage für die Unterschiede zwischen eIF-5A Orthologen ein- und mehrzelliger Eukaryoten | 113 |
| 4.2.4. | Unterschiede in den PPI der Isoformen eIF-5A1 und eIF-5A2 | 114 |
| 4.2.5. | Die vorliegenden Daten bieten keine Hinweise auf bisher unbekannte Funktionen der Enzyme DHS und DOHH | 115 |
| 4.2.6. | Der Einfluss der Hypusinmodifikation auf einzelne PPI von eIF-5A..... | 116 |
| 4.3. | Ausblick | 119 |
| 5. | Anhang | 121 |
| 5.1. | Referenzen..... | 121 |
| 5.2. | Liste der per Bioreaktor-TAP-MS/MS identifizierten Proteine..... | 134 |
| 5.3. | Danksagung | 156 |
| 5.4. | Eidesstattliche Erklärung..... | 157 |
| 5.5. | Während dieser Arbeit entstandene Publikationen und Posterpräsentationen | 158 |

II. Abkürzungsverzeichnis

Protein- und Genbezeichnungen entsprechen den allgemein empfohlenen Nomenklaturkonventionen der jeweiligen Spezies. Die Bezeichnungen können in öffentlich verfügbaren Datenbanken* abgefragt werden und sind hier nicht einzeln aufgeführt. Gängige Abkürzungen für Salze und niedermolekulare Chemikalien sind ebenfalls nicht aufgeführt.

| | |
|-----------------|---|
| 4-OHT | 4-Hydroxytamoxifen |
| <i>A. dest.</i> | <i>Aqua destillata</i> (lat.: destilliertes Wasser) |
| AML | Akute myeloische Leukämie |
| ANOVA | Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>) |
| AP | Affinitätsaufreinigung |
| BAC | <i>Bacterial artificial chromosome</i> |
| bp / kb | Basenpaar / 1.000 Basenpaare („Kilobasen“) |
| cDNA | Komplementäre DNA |
| cpm | Ereignisse pro Minute (<i>counts per minute</i>) |
| <i>et al.</i> | <i>et alii</i> (und andere) |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| Co-IP | Koimmunpräzipitation |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| FACS | <i>Fluorescence-activated cell sorter</i> , Durchflusszytometer |
| FBS | Fetales Kälberserum (<i>Fetal bovine serum</i>) |
| FRET | Förster-Resonanzenergietransfer |
| FRT | <i>Flp recognition target</i> |
| FSC | <i>Forward scatter</i> , Vorwärtsstreuung (FACS-Analyse) |
| FTICR | Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz |
| GO | <i>Gene Ontology</i> |
| GC7 | N1-Guanyl-1,7-Diaminheptan |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| HIV-1 | Humanes Immundefizienz-Virus |
| HSC | Hämatopoetische Stammzellen |
| IEF | Isoelektrische Fokussierung |
| IEP | Isoelektrischer Punkt |

* z. B: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> und <http://expasy.org/>

| | |
|------------------------------------|---|
| IgG | Immunglobulin G |
| kDa | Kilodalton (1 Da entspricht 1 g/mol) |
| KO | <i>Knock-out</i> |
| LIF | Leukämie inhibierender Faktor |
| loxP | <i>Locus of crossover (x) P1</i> |
| MEF | Murine embryonale Fibroblasten |
| mESC | Murine embryonale Stammzellen |
| MS/MS | Tandemmassenspektrometrie |
| N ₀ bzw. N ₃ | Zellzahl nach dem Aussäen (0 Tage) bzw. 3 Tage nach der letzten Passage |
| NEAA | Nicht-essentielle Aminosäuren |
| OD | Optische Dichte |
| p210 | BCR-ABL (210 kDa) |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| pI | Isoelektrischer Punkt |
| PPI | Protein-Protein Interaktion |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>) |
| p. c. | Tage nach der Empfängnis (<i>post conceptionem</i>) |
| PCA | <i>Protein complementation assay</i> |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PTM | Posttranslationale Modifikation |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-PCR |
| SG | Streptavidin-IgG-Tag |
| S.O.C. | <i>Super optimal broth</i> + 20 mM Glukose |
| SSC | <i>Sideward scatter</i> , Seitwärtsstreuung (FACS-Analyse) |
| SSR | <i>site specific recombinase</i> |
| TAP | Tandemaffinitätsaufreinigung |
| TEV | <i>Tobacco etch virus</i> |
| WB | Western Blot |
| Y2H | <i>Yeast two hybrid</i> |

III. Zusammenfassung

Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A) ist für das Überleben und die Proliferation eukaryotischer Zellen essentiell. Er ist außerdem an der Pathogenese verschiedener Krankheiten wie Krebs, *Diabetes* Typ II und der HIV-Infektion beteiligt. Die molekularen Grundlagen dieser Funktionen sind jedoch bisher überwiegend unbekannt. Nicht zuletzt aus diesem Grund konnte bisher – trotz des großen Potentials von eIF-5A als Zielstruktur innovativer therapeutischer Interventionen für diese Krankheiten – keine darauf basierende neue Therapie entwickelt werden. Hinzu kommt, dass eIF-5A das einzige bekannte Ziel des Synthesewegs einer posttranslationalen Modifikation darstellt, der Aminosäure Hypusin. Die in zwei enzymvermittelten Schritten ablaufende Synthese dieser Modifikation findet in allen eukaryotischen Zellen statt und beeinflusst die eIF-5A-Funktion, auch im Hinblick auf die oben genannten Krankheiten, maßgeblich. Die dabei zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sowie der Einfluss des zweiten, durch die Deoxyhypusin Hydroxylase (DOHH) vermittelten Schritts der Hypusinsynthese sind jedoch weitgehend unklar.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war daher, den Einfluss der DOHH-Funktion auf den Säugerorganismus *in vivo* zu untersuchen. Dafür wurde ein konditionales *knock-out* (KO) Mausmodell für das *Dohh*-Gen etabliert und die Auswirkung des DOHH-Verlusts während der Embryonalentwicklung und im adulten bzw. juvenilen Tier untersucht. Dabei konnten verschiedene Erkenntnisse gewonnen werden: Erstens ist der Verlust des *Dohh*-Gens bereits zwischen den Tagen 3,5 und 9,5 der Embryogenese rezessiv letal. Der Verlust nur eines *Dohh*-Allels bewirkt postnatal eine geringe, aber signifikante Verringerung des Wachstums und hat einen negativen Einfluss auf die Hämatopoese in der Milz adulter Tiere. Durch den Einsatz eines induzierbaren KO wurde außerdem entdeckt, dass der Verlust des *Dohh*-Gens auch in drei bis vier Wochen alten Tieren einen rezessiv letalen Phänotyp verursacht. Anhand einer aus diesem Modell etablierten Fibroblasten-Zelllinie konnte schließlich gezeigt werden, dass auf der zellbiologischen Ebene zelluläre Seneszenz als Folge des DOHH-Verlusts ein Faktor in der Entstehung der beobachteten Phänotypen ist.

Des Weiteren wurde nach Hinweisen auf die molekularen Grundlagen dieser Beobachtungen sowie der Funktionen von eIF-5A gesucht. Dafür sollten Interaktionspartner der eIF-5A Isoformen und der Enzyme der Hypusinsynthese identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde eine hochsensitive Methode etabliert: Bioreaktor-TAP-MS/MS. Aus den damit identifizierten 261 Proteinen konnte ein umfassendes Interaktionsnetzwerk für alle vier an der Hypusinsynthese beteiligten Proteine, also die zwei Isoformen von eIF-5A (eIF-5A1 und eIF-5A2),

DHS und DOHH konstruiert werden. Einige der Interaktionen wurden erfolgreich durch zellbiologische und proteinbiochemische Methoden bestätigt. Das Netzwerk wurde außerdem durch bioinformatische Methoden wie zum Beispiel die *Cluster*-Analyse ausgewertet. Aus diesen Untersuchungen folgte, dass die potentiellen Interaktionspartner der Zielproteine vor allem an der Proteinsynthese, dem RNA-Transport und Metabolismus sowie der Zellzyklusregulation beteiligt sind. Die für eIF-5A2 spezifischen Interaktionspartner gaben zudem Hinweise auf hypothetische, physiologische sowie pathologische, gewebsspezifische Funktionen dieser Isoform. Solche Funktionen waren aufgrund des Expressionsmusters dieser Isoform prospektiv vermutet worden.

Diese Arbeit beschreibt ein vielseitig einsetzbares Tiermodell für die translationale biomedizinische Erforschung der Hypusinemodifikation, sowie mit dem Protein-Interaktionsnetzwerk eine umfangreiche Ressource zum Verständnis der molekularen Mechanismen sowohl bekannter als auch bisher unentdeckter zellulärer Funktionen des Proteins eIF-5A.

IV. *Abstract*

Title: Studies towards understanding the biological function of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) and its hypusine modification.

Eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) is essential for the survival and proliferation of eukaryotic cells. It is also involved in the pathogenesis of various diseases, including cancer, diabetes, and HIV-1 infection, making eIF-5A a promising drug target. Unfortunately, due to the lack of understanding of the molecular mechanisms underlying eIF-5A's functions, it has not yet successfully been targeted in novel therapeutic approaches to the treatment of the aforementioned diseases.

eIF-5A is the only known target for a specific posttranslational modification, resulting in the formation of the natural amino acid hypusine. The two-step synthesis of hypusine occurs in all eukaryotic cells and influences both normal eIF-5A function as well as its involvement in disease pathogenesis. The effects of and molecular basis behind the second step of hypusine synthesis, catalyzed by deoxyhypusine hydroxylase (DOHH), are elusive in higher eukaryotes.

The main goal of this study was to gain insight into the function of DOHH *in vivo*. A conditional knockout (KO) mouse model of *Dohh* was established and used to study the effect of *Dohh* loss during organismal development. This approach led to two main findings: First, the loss of *Dohh* is recessively lethal during early embryogenesis, between 3.5 and 9.5 dpc.

Second, the loss of only one allele is not lethal but elicits a minor lag in organismal growth and a negative effect on spleen hematopoiesis. The recessively lethal phenotype also emerged after the conditional *Dohh* KO in seven to eight week old animals, three to four weeks after induction. A fibroblast cell line was established from this conditional KO mouse strain. These cells showed reduced growth upon loss of *Dohh*. Several pieces of evidence suggest that this growth phenotype is triggered by cellular senescence.

The search for the molecular mechanisms of these observations, as well as of the eIF-5A's general function, constitutes the second part of this study. To this end, unknown protein-protein interactions (PPI) of eIF-5A1, eIF-5A2, DHS, and DOHH were identified using a novel and highly sensitive method: 'bioreactor-TAP-MS/MS'. An interaction network of the 261 identified proteins was constructed and analyzed for clusters of functionally related proteins. Proteins directly or indirectly interacting with the hypusine-related bait proteins were mainly active in protein synthesis, RNA transport and metabolism, as well as regulation of the cell cycle. These data provide support for understanding previously observed roles and hypothesized functions of eIF-5A. Moreover, specific interaction partners of eIF-5A2 indicate hypothetical tissue-specific functions of this protein.

In conclusion, this study presents a versatile animal model for translational biomedical research of the hypusine modification, as well as a comprehensive interactome map of all proteins involved therein.

1. Einleitung

Proteine vermitteln den überwiegenden Teil aller zellbiologischen Funktionen, seien es die Aufrechterhaltung des Stoffwechsels, der strukturellen Integrität der Zelle, des Wachstums oder auch des Prozessierens und Reagierens auf extrazelluläre Reize und Signale. Während die Sequenzen der Proteine, und damit deren grundlegende Eigenschaften und Strukturen, im Genom kodiert sind, ist die Regulation und zum Teil auch die Modulation der Proteinfunktion oftmals von posttranslationalen Modifikationen (PTM) abhängig¹. Hierbei werden eine Reihe unterschiedlicher Gruppen an spezifische Aminosäurereste angehängt, von sehr kleinen (z. B. Phosphatgruppen) bis zu ganzen Peptidketten mit einem Molekulargewicht von mehreren tausend Dalton (zusammengefasst von Witze *et al.*²). Die meisten solcher PTM lassen sich auf vielen verschiedenen Proteinen finden und haben dort, je nach Protein, verschiedene Auswirkungen auf deren Funktion und Stabilität. So kann die Phosphorylierung des einen Proteins seine Aktivierung verursachen, die eines anderen dagegen seine Inhibierung (zusammengefasst von Cohen³).

Andere PTM haben unabhängig vom Zielprotein gleichbleibende Funktionen. Ein Beispiel hierfür stellt die Markierung von Proteinen zum proteasomalen bzw. lysosomalen Abbau durch Ubiquitin dar⁴.

Fast alle PTMs haben jedoch gemeinsam, dass sie auf einer großen Anzahl funktional und strukturell heterogener Proteine zu finden sind. Eine der wenigen Ausnahmen dieser Regelmäßigkeit bildet die einzigartige PTM des eukaryotischen Initiationsfaktors 5A (eIF-5A), bei der die Aminosäure Lysin zu Hypusin (*N*^ε-(4-amino-2-hydroxybutyl)-lysin) modifiziert und das Zielprotein dadurch aktiviert wird. Dabei wird Hypusin ausschließlich an einem spezifischen Lysinrest dieses Proteins synthetisiert. Bisher konnte diese Aminosäure in keinem anderen Protein gefunden werden⁵.

1.1. Die Biologie der Hypusinsynthese

Die Biosynthese der Aminosäure Hypusin aus Lysin läuft in zwei enzymvermittelten Schritten ab: Zunächst bewirkt die Deoxyhypusin Synthase (DHS) in einer NAD-abhängigen Reaktion durch die Übertragung einer 4-Aminobutylgruppe von Spermidin auf Lysin (Lys₅₀) die Herstellung des Zwischenprodukts Deoxyhypusin (Dhp₅₀)⁶. Diese reversible Reaktion ist sehr spezifisch für ihre beiden Substrate (eIF-5A(Lys₅₀) und Spermidin). Anschließend erfolgt die Hydroxylierung des Intermediats zu Hypusin (Hyp₅₀) durch die Deoxyhypusin Hydroxy-

lase (DOHH)^{7,8}. Dieser Schritt ist selbst irreversibel und verhindert auch die Rückreaktion des durch DHS vermittelten ersten Schritts der Hypusinsynthese. Das fertig synthetisierte Hypusin, und somit die aktive Form von eIF-5A, stellt demnach einen stabilen Zustand dar. Die Hypusinbiosynthese ist in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt.

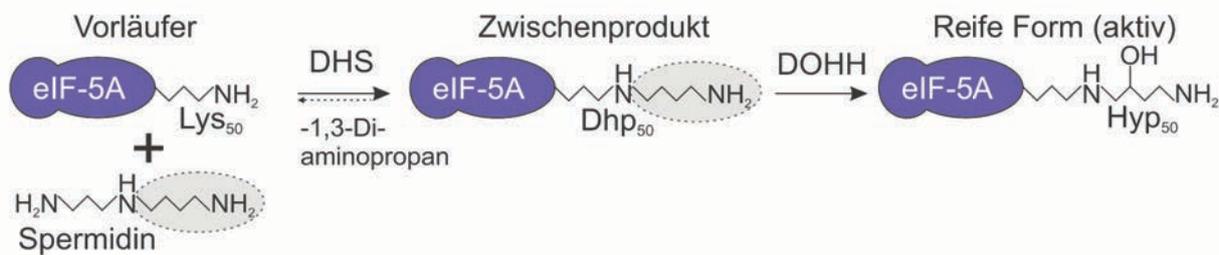


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Hypusinsynthese. Das Enzym Deoxyhypusinsynthase katalysiert in einer reversiblen Reaktion die Übertragung einer Aminobutylgruppe des Diamins Spermidin auf den Lysinrest an Position 50 von eIF-5A. Anschließend wird das Zwischenprodukt, Deoxyhypusin, durch das Enzym Deoxyhypusin Hydroxylase zu Hypusin hydroxyliert.

Normalerweise liegt eIF-5A in Säugerzellen beinahe vollständig hypusiniert vor. Die unmodifizierte Form, sowie hypusindefiziente Mutanten, bei denen entweder das von der Modifikation betroffene Lysin durch Arginin oder das Glycin an der Stelle 52 durch Alanin ausgetauscht wurde, sind praktisch nicht funktional^{9,10}. Die Funktionalität des intermediären Deoxyhypusin wurde bisher weniger gut untersucht (vgl. Abschnitt 1.3).

Neben der funktionellen Beeinflussung von eIF-5A hat die Hypusinmodifikation noch weitere Auswirkungen auf das Protein. So wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Lokalisation ebenfalls von Hypusin abhängt – während reifes eIF-5A vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert ist, ist der nicht hypusinierte Vorläufer sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma zu finden¹¹. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass die Bindung bestimmter RNA-Motive¹², sowie die Fähigkeit des eIF-5A aus der Hefe (*S. cerevisiae*), in Affinitätsaufreinigungs-Experimenten Ribosomen mit aufzureinigen¹³, ebenfalls hypusinabhängig sind.

1.1.1. Funktionen von eIF-5A

Anhand dieser Studien konnte gezeigt werden, dass die meisten Funktionen von eIF-5A hypusinabhängig sind. Zu diesen Funktionen gehören regulatorische Funktionen in verschiedenen zellbiologischen Prozessen (Abb. 1.2):

Ursprünglich wurde eIF-5A als universeller Initiationsregulator der Proteinbiosynthese identifiziert. Es wurde beobachtet, dass eIF-5A in Abhängigkeit von der Hypusinmodifikation *in vitro* die Bildung der ersten Peptidbindung vermittelte¹⁴. Weitere Untersuchungen in der Hefe konnten diese Vermutung jedoch nicht bestätigen.

In einem Modell mit konditionaler eIF-5A-Expression in der Hefe (*S. cerevisiae*) konnte vielmehr gezeigt werden, dass eIF-5A für die Hefe zwar essentiell war, dessen Verlust allerdings nur zu einer leichten Verringerung der Proteinsynthese führte¹⁵. Des Weiteren gibt es neuere Hinweise darauf, dass eIF-5A im Rahmen der Translation nicht an der Initiation, sondern vielmehr an der Elongation der Peptidkette beteiligt ist^{10,16,17}. Dafür spricht ebenfalls die Beschreibung einer funktionellen Interaktion

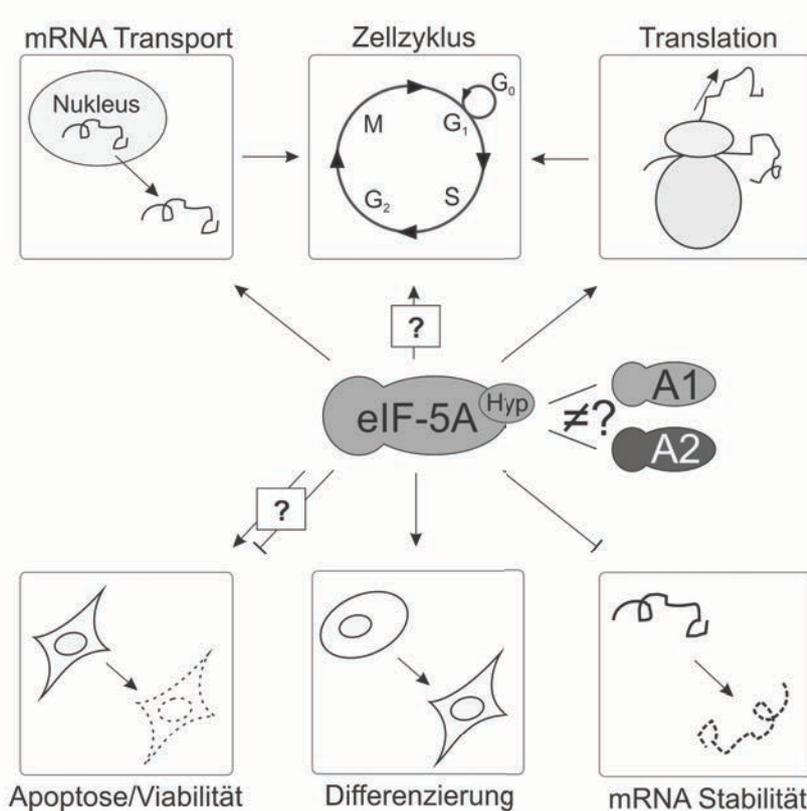


Abbildung 1.2: Bekannte Funktionen des Proteins eIF-5A.

Die schematisch dargestellten zellulären Prozesse werden durch eIF-5A-Funktionen teilweise hypusinabhängig reguliert. Ein direkter Einfluss auf die Zellzyklusregulation wurde bisher nicht nachgewiesen. Der Einfluss von eIF-5A auf die Apoptose scheint von Zelltyp, Hypusinstatus und weiteren biologischen Parametern abzuhängen. Ob beide Isoformen funktionell identisch sind ist ungeklärt, erscheint bisher jedoch unwahrscheinlich.

von eIF-5A mit dem eukaryotischen Elongationsfaktor 2 (eEF-2) und Proteinkomponenten des 80S-Ribosoms^{18,19}. Dass zudem nur ein geringer Teil des zellulären eIF-5A an Ribosomen gebunden vorliegt^{13,18}, entkräftet die Annahme, die Hauptfunktion von eIF-5A läge in der Translationsinitiation bzw. in der Regulation der Translation im Allgemeinen.

Andere Daten zur Funktion von eIF-5A stehen mit diesen Überlegungen im Einklang. Diese belegen einen Einfluss des Proteins auf den zellulären mRNA-Metabolismus und den Transport von RNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma. So interagiert eIF-5A mit den am nukleozytoplasmatischen Export beteiligten Proteinen CRM1 (Xpo1), Exportin 4 (Xpo4) und kernmembranständigen Nukleoporinen²⁰⁻²². Die zusätzliche Bindung spezifischer RNA-Sequenzen²³ lässt vermuten, dass eIF-5A in diesem Mechanismus eine Schlüsselstellung als Adapterprotein einnimmt. Weitere Beobachtungen legen nahe, dass eIF-5A auch Einfluss auf die Stabilität bestimmter mRNAs nimmt^{24,25}.

Über die Regulation dieser Prozesse hat eIF-5A potentiellen Einfluss auf die Zellproliferation. Tatsächlich ist dieses Protein, sowie die DHS-vermittelte erste Stufe der Hypusinmodifikation, in allen bisher untersuchten eukaryotischen Zellen essentiell für das Zellüberleben, die Zellteilung und die Differenzierung^{9,26,27}. Dies konnte durch Experimente mit temperatursensitiven und hypusindefizienten Mutanten in der Hefe und dem Verlust des *DYSI*-Gens^{9,28-31}, Spermidin-Analoga bzw. Metallchelatoren zur Inhibition der DHS- und DOHH-Aktivität³²⁻³⁶ und des Entzugs des zellulären Spermidins^{37,38} in verschiedenen Spezies gezeigt werden. Allein in der Hefe (*S. cerevisiae*) ist der Verlust des *LIA1*-Gens, das die DOHH kodiert und somit den zweiten Schritt der Hypusinmodifikation vermittelt, nicht letal. Fehlende DOHH-Aktivität führt dort nur zu einer leichten Verringerung der Wachstumsrate³⁹. Ob diese Abhängigkeit des Zellwachstums von hypusiniertem eIF-5A lediglich auf den beschriebenen Funktionen in der Proteinsynthese und der RNA-bezogenen Funktionen beruht, oder ob eIF-5A den Zellzyklus auch direkt beeinflusst, ist bisher nicht bekannt.

Als weitere Rolle von eIF-5A wurde die Verstärkung von IFN α - und TNF α -induzierter Apoptose durch nicht hypusiniertes eIF-5A1 beschrieben⁴⁰⁻⁴⁴. In einem Diabetes-Modellsystem der Maus (*M. musculus*) konnte gezeigt werden, dass höhere Mengen von hypusiniertem eIF-5A durch die Regulation der Zytokinausschüttung proapoptotisch wirken⁴⁵. Somit scheint es jeweils von den individuell vorherrschenden Bedingungen abhängig, ob hypusiniertes oder unhypusiniertes eIF-5A die Apoptose stimuliert.

1.1.2. Isoformen von eIF-5A

Die meisten Säugerspezies, darunter der Mensch (*H. sapiens*) und die Maus (*M. musculus*), tragen in ihrem Genom zwei Gene, die verschiedene Isoformen des Proteins eIF-5A kodieren, eIF-5A1 und eIF-5A2. Beiden Isoformen ist eine hohe Sequenzidentität gemein, die beim Menschen 84% über die Gesamtsequenz beträgt⁴⁶. Dabei ist die für die Hypusinbiosynthese essentielle Region vollständig konserviert, und beide Isoformen enthalten Hypusin⁴⁷. Interessanterweise stellen zwar beide Isoformen ein vergleichbares Substrat für die DHS der Hefe dar, die menschliche DHS hat jedoch eine deutlich höhere Affinität für die Isoform eIF-5A1⁴⁷. Die Expressionsanalyse von eIF-5A liefert einen interessanten Hinweis darauf, dass die beiden Isoformen trotz der hohen Sequenzidentität nicht dieselben Funktionen vermitteln könnten. Während eIF-5A1 ubiquitär in Zellen praktisch aller Gewebe und Entwicklungsstadien exprimiert wird^{48,49}, ist eIF-5A2 auf der Proteinebene nur in embryonalem sowie wenigen adulten Geweben nachzuweisen, darunter im Gehirn und im Hoden^{46,47,49}. In Hefe-

zellen werden beide Isoformen parallel exprimiert und können sich gegenseitig vollständig ersetzen. Die humanen Orthologe sind dazu in der Hefe ebenfalls in der Lage⁴⁷.

Ob die Expressionsmuster der beiden Isoformen von eIF-5A auf (hypothetischen) unterschiedlichen Funktionen dieser Proteine beruhen, ist bisher nicht ausreichend untersucht. Die spezifische und stringente Kontrolle der eIF-5A2 Expression legt jedoch spezielle Funktionen dieses Moleküls in der embryonalen Entwicklung nahe, sowie solche, die spezifisch für Zellen des Nervengewebes und der Spermatogenese sind. Beide Isoformen haben jedoch gemeinsame Basisfunktionen.

1.1.3. Evolutionäre Konservierung von eIF-5A in Eukaryoten

Die Sequenzen aller an der Hypusinmodifikation beteiligten Proteine, insbesondere der die Hypusinmodifikation umgebenden Region von eIF-5A, sind in allen Eukaryoten hoch konserviert⁵⁰. Auch die Sekundär- und Tertiärstrukturen von eIF-5A unterscheiden sich in der Hefe (*S. cerevisiae*) und dem Menschen nur unwesentlich⁵¹. Während in Bakterien bisher nur ein Ortholog von eIF-5A (EF-P) gefunden werden konnte, verfügen Archaeen zusätzlich bereits über ein DHS-Ortholog, das einen Deoxyhypusinrest an das dem eIF-5A entsprechende Ortholog aIF-5A synthetisiert⁵⁰. In der Hefe wird der zweite Schritt der Hypusinierung durch das DOHH-Ortholog zwar auch durchgeführt, dieser ist aber nicht essentiell³⁹. Im Gegensatz dazu führt der Verlust der DOHH in höheren Eukaryoten (*C. elegans*, *D. melanogaster*) zu einer Letalität während der frühen Embryonalentwicklung^{52,53}. Diese genetischen Studien am *Dohh*-Ortholog der Taufliege *D. melanogaster*, dem *nero*-Gen, zeigten weiterhin, dass DOHH in der Fliege verschiedene Prozesse wie Zellwachstum, Proliferation und Autophagie reguliert⁵³. Diese Studien geben jedoch keine Auskunft über die Auswirkung des ubiquitären Verlusts der DOHH-Funktion in adulten Tieren. Der *Knock-out* (KO) des *Eif5a1*- bzw. *Dhps*-Gens ist in der Maus ebenfalls in einem frühen embryonalen Entwicklungsstadium letal^{27,54}. Daten für das *Dohh*-Gen im Mausmodell liegen bisher nicht vor. Diese Studien sowie die Beobachtungen, dass die Aktivität der DOHH nur in höheren Eukaryoten von essentieller Bedeutung für die regulatorische Funktion von eIF-5A im Zellzyklus und für die Zellviabilität ist, legen eine Veränderung der Proteinfunktion oder des Wirkmechanismus im Laufe der evolutionären Entwicklung höherer Eukaryoten nahe.

1.2. Biomedizinisches Potential von eIF-5A

Neben den oben beschriebenen physiologischen Funktionen ist für beide Isoformen von eIF-5A eine Vielzahl von Funktionen bei der Entstehung und Entwicklung verschiedenster Erkrankungen bekannt.

So hat eIF-5A eine essentielle Rolle in der Replikation des humanen Immundefizienz-Virus (HIV-1). Diese wird durch die Funktion als zellulärer Kofaktor für das HIV-Rev Protein vermittelt, das wiederum für den Export und die Translation retroviraler RNA-Moleküle aus dem Zellkern benötigt wird^{55,56}.

Eine weitere Rolle, für die ebenfalls der mRNA-Export ins Zytoplasma ausschlaggebend ist, hat eIF-5A in der autoimmun-vermittelten Entzündung von β -Inselzellen im *Diabetes mellitus* Typ II. Hier konnte gezeigt werden, dass die Translation des *Nos2* Transkripts sowie die Zytokinausschüttung und entzündungsrelevante Signalwege hypusinabhängig durch eIF-5A reguliert werden und dadurch in den β -Zellen Apoptose ausgelöst wird⁴⁵. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Behandlung adipöser, diabetischer Mäuse mit dem DHS-Inhibitor GC7 ihre Glukosetoleranz verbesserte, die Insulinausschüttung erhöhte und zu einer erhöhten β -Zellmasse führte²⁵. Für diese proinflammatorische Eigenschaft von eIF-5A gibt es einen weiteren Beleg: Der siRNA-vermittelte *in vivo Knock-down* von eIF-5A im Mausmodell für Endotoxin-induzierte Sepsis konnte die behandelten Tiere gegen normalerweise letale Lipopolysaccharid-Dosen schützen⁵⁷.

Die meisten therapeutisch motivierten Studien bezüglich eIF-5A beschäftigen sich jedoch mit dessen Rolle in verschiedenen Krebsarten: In Zellen und Geweben verschiedener Neoplasien konnte eine erhöhte Expression von eIF-5A1 festgestellt werden^{48,58,59}. Außerdem wurde beschrieben, dass die Inhibition der DHS-Aktivität *in vitro* die Differenzierung von Neuroblastom- und AML-Zellen auslösen kann⁶⁰ und auf Zellen der CML sowohl in Kombination mit Imatinib als auch davon unabhängig antitumorale Effekte ausübt⁶¹. Darüber hinaus konnte für Ciclopirox, einen Eisenchelator und somit Inhibitor der DOHH, *in vitro* ein negativer Effekt auf das Endothelwachstum und die Angiogenese nachgewiesen werden⁶². Es ist aber unklar, ob diese Beobachtungen und Effekte auf den für die Zellteilung essentiellen, allgemeinen Funktionen von eIF-5A1 beruhen.

Anders verhält es sich mit der Isoform eIF-5A2, die sich funktionell zwar mit eIF-5A1 überschneidet, durch ihre geringe oder nicht vorhandene Expression jedoch keine Auswirkung auf die normale Teilung adulter Zellen hat. Für eIF-5A2 konnte ebenfalls in diversen Tumorarten und -zelllinien, unter anderem des Ovarial-, Kolorektal- und Blasenkarzinoms^{46,49,63-66}, eine Amplifikation bzw. Überexpression des *EIF5A2*-Gens nachgewiesen werden. In vielen dieser Fälle konnte darüber hinaus eine therapeutisch relevante Funktion von eIF-5A2 auf die Zellen dieser Neoplasien gezeigt werden: So löst eIF-5A2 im Ovarialkarzinom die Transformation aus und ist mit aggressiveren Verläufen assoziiert^{63,67}. Im hepatozellulären Karzinom führt die Überexpression ebenfalls zu erhöhter Invasivität und löst Schlüsselereignisse aus, die zur

Metastasierung führen⁶⁸. Weitere Krebsarten, in denen der eIF-5A2-Status als relevant für den klinischen Verlauf und die Prognose ermittelt wurde, sind unter anderem das Urothelkarzinom⁶⁵ und das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (*non-small cell lung cancer*)⁶⁶. Darüber hinaus hat eine Studie zum Leberkrebs gezeigt, dass in dieser Entität die Überexpression von eIF-5A2, aber nicht von eIF-5A1, in p53^{-/-} Hepatozyten zu Tumorwachstum führt⁶⁹. In derselben Studie konnte ein mutmaßlicher nukleozytoplasmatischer Transporter von eIF-5A, Exportin 4²¹, als Tumorsuppressor identifiziert werden. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde eIF-5A2 als Onkogen und prognostischer Marker vorgeschlagen^{63,66}. Der Umstand, dass eIF-5A1 und eIF-5A2 differentiell exprimiert werden, und dass die beiden Isoformen vermutlich auch verschiedene Funktionen ausüben können, begünstigt die Option einer therapeutischen Relevanz von eIF-5A2^{43,62,70}.

In Mikroarray- und SAGE- (*serial analysis of gene expression*) Studien wurde zudem entdeckt, dass die Expression des *EIF5A1*-Gens von Myc^{71,72} und p53 reguliert wird⁷³.

1.3. Die Rolle der Deoxyhypusin Hydroxylase (DOHH)

Genau wie eIF-5A ist auch die DOHH ein strukturell interessantes Protein: Es ist ein Metalloenzym und besteht aus acht sogenannten *HEAT-repeat* Domänen. Dies sind Peptidsequenzen, die α -helikale Haarnadelstrukturen ausbilden und häufig die Interaktion von Proteinen vermitteln³⁹. DOHH enthält vier hoch konservierte His-Glu Motive für die Koordination seines Substrats, eIF-5A(Dhp₅₀), sowie zweier Eisenionen, und stabilisiert dadurch die ringförmige Tertiärstruktur des Moleküls. Es konnte gezeigt werden, dass DOHH ohne gebundenes Eisen seine Ringstruktur und damit seine Enzymaktivität im Hinblick auf die Hypusiniierung verliert^{32,74}. Dieser Effekt wird auch durch Mutationen der His-Glu Motive hervorgerufen⁷⁵. Während die essentielle Bedeutung der Hypusinmodifikation für Funktionen von eIF-5A insgesamt gut belegt ist (vgl. Abschnitt 1.1.1), ist die Bedeutung der Hydroxylierung des Intermediats im zweiten Schritt der Hypusinbiosynthese für die Säugerzelle bisher weniger umfassend untersucht. In der Hefe führte der Verlust der DOHH-Funktion nur zu einem vergleichsweise milden Phänotyp. Dagegen waren die Folgen des DOHH-Verlusts in *D. melanogaster* deutlich gravierender (vgl. Abschnitt 1.1.3). Für Zellen oder Modellorganismen der Säugetiere gibt es bisher jedoch keine entsprechenden Daten. Auf der Hypothese aufbauend, dass eIF-5A im Laufe der eukaryotischen Evolution zusätzliche zellbiologische Funktionen übernommen hat, lässt sich vermuten, dass gerade die Hydroxylierung des Deoxyhypusins in der weiteren Entwicklung bis zum Säuger zusätzliche Bedeutung gewonnen hat.

Ein Grund für die unzureichende Datenlage zur DOHH-Funktion im Säugermodell ist sicherlich das Fehlen geeigneter Modelle und spezifischer Inhibitoren. Es gibt Untersuchungen, die aufbauend auf den Eisen bindenden Eigenschaften verschiedener Chelatoren, z. B. Ciclopirox, durchgeführt wurden^{62,76,77}. Diese können in *in vitro* Experimenten mit aufgereinigten Proteinen die DOHH-Aktivität drastisch senken. Da jedoch noch nicht ausreichend untersucht wurde, welche Metalloenzyme außer DOHH von der Ciclopirox-Behandlung betroffen sind, ist die Spezifität der *in vivo* beobachteten Effekte bisher nicht hinreichend belegt.

1.4. Offene Fragen in der Erforschung von eIF-5A und der Hypusinmodifikation

Abgesehen von dem oben erläuterten Fehlen eines geeigneten spezifischen Inhibitors für die Charakterisierung der Enzymfunktion von DOHH gibt es weitere Erkenntnislücken, die es als Voraussetzung für die Erprobung von eIF-5A und den an der Hypusinmodifikation beteiligten Enzymen als therapeutische Zielstrukturen in der biomedizinischen und pharmazeutischen Wirkstoffforschung zu schließen gilt.

Zunächst ist hier aufzuzählen, dass eIF-5A zwar viele gut belegte, auch essentielle zellbiologische Funktionen ausübt (vgl. Abschnitt 1.1.1), über die Mechanismen dieser Funktionsausübung aber kaum gesicherte Erkenntnisse existieren. So ist zwar belegt, dass eIF-5A für die Proliferation von eukaryotischen Zellen essentiell ist (vgl. Abschnitt 1.1.1). Ob dieser Effekt aber hauptsächlich über die direkte ribosomale Regulation der Synthese bestimmter Proteine, zum Beispiel von Zellzyklusregulatoren und über die Regulation von mRNA-Lokalisation sowie -stabilität, oder über weitere, bisher unbekannt Funktionen mit Auswirkung auf den Zellzyklus vermittelt werden, ist bisher nicht bekannt (vgl. Abb. 1.2). Darüber hinaus ist unklar, welche Mechanismen den genannten Funktionen auf molekularer Ebene zugrunde liegen.

Da die meisten regulatorischen Proteinfunktionen auf Wechselwirkungen zweier oder mehrerer Proteine beruhen, lassen sich durch die Aufklärung aller Protein-Protein Interaktionen (PPI), die ein Protein einzugehen in der Lage ist, viele Hinweise auf dessen Funktion und Wirkmechanismen gewinnen⁷⁸. Diese Erkenntnisse begründen oft die Basis, auf der Hypothesen für funktionelle Studien zu Proteinfunktionen gebildet werden⁷⁹. Zwar existieren solche Daten für alle in dieser Arbeit untersuchten Proteine, jedoch sind diese aus zwei Gründen für die translationale Forschung nur eingeschränkt hilfreich: Erstens wurden fast alle vorhandenen Daten aus Experimenten gewonnen, die in Hefearten durchgeführt wurden (z. B.

Tassarow *et al.*⁸⁰). Die Hefe- und Säugerorthologe von eIF-5A sind zwar sequenziell hoch konserviert, funktionell aber nicht vollständig identisch. Wie zuvor erwähnt, führt der Verlust der DOHH in Zellen der Hefe und der Taufliege zu verschiedenen Phänotypen. Daten zum KO in Säugern existieren bisher nicht. Aus diesen Gründen sind Veränderungen im PPI-Profil der Proteine dieser Organismen zu erwarten. Zweitens ist bisher, außer im Fall des eIF-5A1-Orthologs aus *S. cerevisiae*¹³, keine Studie veröffentlicht worden, die sich spezifisch mit PPI dieser Proteine befasst – alle vorliegenden Ergebnisse sind aus Hochdurchsatzexperimenten gewonnen, bei denen sich die genannten Proteine in der Gesamtheit der untersuchten Proteine befanden und diesen keine spezielle Aufmerksamkeit geschenkt wurde (z. B. Gong *et al.*⁸¹ und Ho *et al.*⁸²). Dazu kommt, dass solche Studien normalerweise unter artifiziellen Bedingungen durchgeführt werden, zum Beispiel durch die Lokalisation der Proteine im Kern der Hefezellen bei der *Yeast-Two-Hybrid-Methode* (Y2H), und dass dabei unter Umständen Interaktionen verloren gehen bzw. Proteine miteinander interagieren, bei denen dies unter physiologischen Bedingungen nicht der Fall wäre (vgl. Abschnitt 1.5.2). Die großen Datensätze dieser Hochdurchsatzexperimente werden in der Regel kaum durch zusätzliche Bestätigungsexperimente gestützt, sondern bioinformatisch strukturiert und als Ressource für die Hypothesenbildung veröffentlicht (zusammengefasst von Aebersold und Mann⁸³).

Zuletzt sind nicht nur viele Studien zu den PPI, sondern auch ein großer Teil der die eIF-5A Proteinfunktionen betreffenden Arbeiten in Modellorganismen wie verschiedenen Hefearten, *C. elegans* und *D. melanogaster* durchgeführt worden (vgl. Abschnitt 1.1.1). Die Translation dieser Erkenntnisse in die biomedizinische Forschung erfordert es jedoch, Versuche an mit dem Menschen näher verwandten Arten – Säugetieren bzw. Vertebraten – durchzuführen. Dies gilt insbesondere für die onkologische Forschung, da die meisten Krebsarten von der Dysregulation der durch komplexe Mechanismen gesteuerten Homöostase des Zellwachstums und -überlebens sowie deren Verbleib im Gewebeverbund herrühren, und viele dieser Mechanismen (als Voraussetzung für deren Modellierung) in weniger komplexen oder gar einzelligen Organismen nicht existieren⁸⁴. Erste *knock-out* (KO) Mausmodelle für die Proteine eIF-5A1 und DHS sind erst kürzlich publiziert bzw. noch nicht ausführlich beschrieben worden^{27,54} und waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht etabliert. Keines dieser Modelle ist konditional und daher durch die frühe embryonale Letalität homozygoter KO-Tiere für Studien am postnatalen Organismus nicht verfügbar.

1.5. Werkzeuge zur Untersuchung von Proteinfunktionen

1.5.1. Mausmodelle zur Untersuchung von Proteinfunktionen *in vivo*

Die in der biomedizinischen Forschung hauptsächlich Anwendung findenden und am besten charakterisierten Säugetiermodelle sind die Maus (*M. musculus*) und die Ratte (*R. norvegicus*). Die Verwendung von Säugetieren ist vor allem für die spätere Anwendung der Erkenntnisse auf die Physiologie und Pathophysiologie des Menschen wichtig, die bereits in vielen Fällen zu einer signifikanten Verbesserung des Verständnisses der menschlichen Biologie und vieler Krankheiten geführt hat^{85,86}. Insbesondere die Verwendung der Maus bringt verschiedene Vorteile mit sich: Die Sequenzierung des Mausgenoms und die Verfügbarkeit von Technologien zu dessen Manipulation erleichtert die Herstellung transgener Tiere, und es gibt eine für Säugerspezies einzigartige Vielzahl bereits etablierter Tiermodelle. Entsprechende Technologien für die Ratte sind erst in den letzten Jahren ausreichend weit entwickelt worden⁸⁷. Aufgrund dieser Voraussetzungen ist es möglich, die Konsequenzen des Ausschaltens, Mutierens und Überexprimierens bestimmter Gene zu untersuchen, um so Rückschlüsse auf ihre Funktion ziehen zu können⁸⁸. Daneben bietet die Haltung und Zucht von Mäusen auch aus ökonomischer Sicht günstigere Voraussetzungen gegenüber größeren Säugetieren. Die häufige Verwendung der Maus als Studienobjekt in der biomedizinischen Forschung hat außerdem zu einer guten Charakterisierung der potentiellen Probleme und einer bedarfsorientierten Optimierung der Haltungsbedingung geführt⁸⁹.

Die Herstellung transgener Mäuse, mit denen der kontrollierte völlige Verlust eines Gens (konditionaler *Knock-out*) und damit die Funktion seines Genprodukts untersucht werden kann, hat sich seit der Publikation der ersten *Targeting*-Strategie⁹⁰ zu einer vielseitigen, verlässlichen und weit verbreiteten Methode entwickelt (zusammengefasst von Capecchi^{91,92}). Der Vorteil des konditionalen KOs ist die zeitliche und räumliche Kontrolle des Genverlusts. So kann dieser auch dann im adulten Tier oder in bestimmten Geweben untersucht werden, wenn er bereits in der Embryonal- oder frühen Individualentwicklung letal sein bzw. schwere Entwicklungsstörungen oder Sterilität hervorrufen sollte. Der konditionale KO wird dabei durch zwei lokusspezifische Rekombinasen (*site specific recombinases*, SSRs), Cre (*Causes recombination*) aus dem Bakteriophagen P1 und Flp (*Flippase*) aus der Hefe (*S. cerevisiae*) ermöglicht. Diese Enzyme erkennen jeweils 34 bp lange Zielsequenzen, genannt loxP (*Locus of crossover (x) P1*) und FRT (*Flp recombinase recognition target*), und verursachen - je nach ihrer Orientierung zueinander - die Deletion oder Inversion der dazwischen liegenden Sequenz^{93,94} (zusammengefasst von Branda und Dymecki⁹⁵). Mit diesen Erkennungsstellen

wird das Zielgen an geeigneten Stellen markiert („gefloxt“) und eine transgene Mauslinie etabliert, die das markierte Zielgen anstelle des Wildtypallels in ihrem Genom trägt (zusammengefasst von Capecchi⁹²). Die Verwendung für den eigentlichen KO wird durch so genannte *Deleter*-Linien ermöglicht. Diese transgenen *Knock-in* Linien tragen das Gen der Cre- (bzw. Flp-) Rekombinase in ihrem Genom, und durch die Wahl eines passenden Promoters lässt sich die Expression auf bestimmte Gewebe oder Entwicklungsstadien beschränken. Darüber hinaus gibt es induzierbare Systeme, in denen die Expression der Cre-Rekombinase oder ihre Aktivierung durch Tetracyclin⁹⁶ bzw. IFN- α -induzierbare⁹⁷ Promotoren oder die Fusion der Cre-Rekombinase mit dem durch Tamoxifen induzierbaren Östrogen-Rezeptor⁹⁸ gesteuert wird. Bei letzterer wurde die Sequenz des Cre-Gens mit der Ligandenbindungsdomäne des mutierten humanen Östrogenrezeptors (*ESR1*) fusioniert. Normalerweise verhindert der Rezeptorteil des Fusionsproteins (CreEsr1) den Transport in den Zellkern. Erkennt der Rezeptor aber seinen Liganden 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT), ein Metabolit des Wirkstoffs Tamoxifen, bewirkt dieser den aktiven Transport in den Zellkern und damit die Aufhebung der funktionsinhibierenden räumlichen Trennung der Cre-Rekombinase von der genomischen DNA. Neben diesen auf *Deleter*-Linien basierenden Verfahren besteht weiterhin die Möglichkeit, das Gen der Cre-Rekombinase in virale Partikel zu verpacken und direkt an den Zielort zu injizieren⁹⁹. Durch die gezielte Transduktion kann die Expression der Cre-Rekombinase lokal und unabhängig vom Zelltyp mit hoher Genauigkeit gesteuert werden. Auf diese Weise können zum Beispiel durch die Nachbildung von Ereignissen, die zum Auftreten von Tumoren führen, neue Modelle für die Tumorentstehung entwickelt werden⁹⁹.

1.5.2. Methoden zur Aufklärung von Protein-Protein Interaktionen

Die Funktion und Regulation praktisch aller Prozesse, zum Beispiel der Proliferation und der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase, werden durch Proteine vermittelt. Dabei sind insbesondere die Wechselwirkungen dieser Proteine für diese Mechanismen entscheidend. Zur Aufklärung unbekannter PPI, die wiederum Rückschlüsse auf die Funktionen und deren molekulare Mechanismen dieser Proteine zulassen, gibt es verschiedene Methoden mit jeweils spezifischen Vor- und Nachteilen.

Eine verbreitete Methode ist die Immunpräzipitation (Co-IP) von Proteinkomplexen anhand von spezifischen Antikörpern¹⁰⁰. Der Vorteil dieser Methode ist, dass hier das endogene, also nicht überexprimierte oder modifizierte Zielprotein zur Aufreinigung verwendet wird. Dies hat wiederum den Nachteil, dass die Co-IP sich im Allgemeinen nicht zur Aufreinigung großer Proteinmengen eignet und daher sehr sensitive und meistens spezifische Methoden zur

Detektion verwendet werden (z. B. der Western Blot). Außerdem muss ein spezifischer Antikörper zur Verfügung stehen, der für die Methode geeignet ist.

Eine ähnliche Methode ist die Affinitätsaufreinigung¹⁰¹ (AP). Hierbei wird das Zielprotein oder *Bait* (engl.: Köder) mit einem *Tag* versehen. Dadurch wird die Zugabe eines für das Zielprotein spezifischen Antikörpers unnötig. Da für die AP keine Antikörper benötigt werden und das *Bait*-Protein meist überexprimiert wird, können größere Mengen aufgereinigt werden. Dadurch wird die Identifikation der aufgereinigten Proteine durch Massenspektrometrie möglich⁷⁸. Ein Nachteil dieser Methode ist eine relativ hohe Rate falsch-positiv identifizierter Interaktionen.

Eine weitere *pull-down* Methode ist die im Vergleich zu den ersten beiden Methoden aufwändigere Tandemaffinitätsaufreinigung¹⁰² (TAP). Hier wird ebenfalls ein Fusionsprotein aus *Bait* und *Tag* exprimiert, allerdings ist dieses wesentlich größer und ermöglicht die zweifache serielle Aufreinigung des Proteins. Dies verringert die Rate falsch-positiver Identifikationen signifikant. Der Nachteil dieser Methode ist die langwierige Aufreinigung, während der insbesondere schwache oder transiente Interaktionen verloren gehen können. Dennoch ist diese Methode aufgrund ihrer hohen Spezifität und der physiologischen Bedingungen vor der Zellyse die derzeit meist angewandte Methode zur Aufklärung unbekannter PPI in Hochdurchsatzexperimenten^{103–105}.

Beim *Yeast-Two-Hybrid* (Y2H)-Verfahren¹⁰⁶ werden die Zielproteine an die DNA-bindende bzw. an die Aktivierungsdomäne eines Transkriptionsfaktors fusioniert und in Hefezellen exprimiert. Die Anwendung dieser Methode in einem Hochdurchsatzscreening erfordert eine große Transkript-Bibliothek der entsprechenden Spezies. Weitere Nachteile ergeben sich aus der Umgebung, in der die Interaktion stattfindet – dem Zellkern der Hefe – und der Tatsache, dass die beiden Fusionsproteine dort überexprimiert vorliegen. Die Proteine wenig verwandter Arten, z. B. von Säugern, werden zudem mit großer Wahrscheinlichkeit nicht posttranslational modifiziert, was das Interaktionsverhalten ebenfalls beeinflussen kann.

Bei dem *protein complementation assay* (PCA) werden einige Nachteile der Y2H-Methode ausgeglichen: Für diese Methode werden zwar ebenfalls Fusionsproteine überexprimiert, dies geschieht jedoch meist in Zellen derjenigen Spezies, aus der auch die zu untersuchenden Interaktionspartner stammen. Die zwei Teile des jeweiligen *Reporters* ergänzen sich bei einer Interaktion und stellen dessen Enzym- (z. B. Dihydrofolatreduktase¹⁰⁷) oder Fluoreszenzaktivität (z. B. YFP¹⁰⁸), wieder her. Die Methode ist aufgrund der stabilen Komplementation sehr sensitiv, die damit einhergehende Stabilisierung transienter Interaktionen macht allerdings die Verwendung adäquater Kontrollen nötig.

Eine weitere Methode beruht auf dem Förster-Resonanzenergietransfer¹⁰⁹ (FRET). Hier sind zwei Fluorophore (ein Donor und ein Akzeptor) mit jeweils einem der Zielproteine fusioniert. Diese Methode hat den Vorteil, dass die auf die Zielproteine fusionierten Reporter selbst nicht physisch interagieren und somit keine Stabilisierung der Interaktion bewirken. Andererseits ist diese Methode dadurch auch deutlich weniger sensitiv als z. B. der PCA.

1.6. Fragestellung

Die in Kapitel 1 beschriebenen Vorarbeiten legen nahe, dass beide Isoformen des Proteins eIF-5A sowie deren Hypusinmodifikation potentiell attraktive Zielstrukturen in der Entwicklung neuer Therapieansätze für verschiedene Krankheiten darstellen. Dabei scheint auch die DOHH-Funktion in der Entwicklung und Zellproliferation höherer Eukaryoten eine zentrale Rolle zu spielen. Zu Beginn dieser Arbeit waren die meisten der hier beschriebenen Vorarbeiten zur Rolle der DOHH allerdings noch nicht veröffentlicht. Ausgehend vom damaligen Kenntnisstand wurde daher die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegende Hypothese entwickelt, dass die gezielte Inhibition der DOHH womöglich weniger gravierende Auswirkungen auf die Säugerzelle – und damit den Organismus – hat als der Verlust bzw. die Inhibition von eIF-5A und der DHS. Dies würde sich nicht zuletzt auf die Verträglichkeit therapeutischer Strategien positiv auswirken.

Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte ein vielseitig verwendbares Modellsystem für den DOHH-vermittelten zweiten und finalen Schritt der Hypusinsynthese entwickelt und dieses charakterisiert werden. Insbesondere für die biomedizinische Evaluation verspricht dabei das Tiermodell den größten Erkenntnisgewinn und die vielseitigste Anwendbarkeit. Zudem soll speziell die Wirkung auf den Gesamtorganismus untersucht werden. Das System des konditionalen KOs in der Maus erfüllt diese Anforderungen (vgl. Abschnitt 1.5.1) und hat verschiedene weitere Vorteile: Zum einen kann beim Auftreten einer zu Beginn der vorliegenden Arbeit zwar nicht postulierten, aber dennoch nicht unwahrscheinlichen embryonalen Letalität des DOHH-Verlusts dessen Auswirkung auch im adulten Organismus untersucht werden. Darüber hinaus lassen sich aus einem solchen Mausmodell Zellmodelle etablieren, die weitere experimentelle Möglichkeiten eröffnen und dabei helfen, die benötigte Zahl an Versuchstieren zu verringern. Zuletzt ist der Nachweis des Genverlusts mit proteinbiochemischen und molekularbiologischen Standardmethoden schnell und sicher durchführbar. Für den Nachweis der Aktivität der DOHH, des finalen Schritts der Hypusinsynthese, gab es dagegen zu Beginn der Arbeit keine Methode, die diese Kriterien erfüllte.

Das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es daher, eine konditionale *Dohh*-KO Mauslinie herzustellen. Im Anschluss sollte diese Linie grundlegend charakterisiert werden. Um die zusätzliche Möglichkeit zu schaffen, den *Dohh*-Verlust auch *in vitro* (in Zellkultur-experimenten) zu untersuchen, sollte ausgehend von dieser Mauslinie eine Fibroblasten-Zelllinie aus embryonalen Primärzellen etabliert werden.

Weiterhin wird aus der Einleitung ersichtlich, dass auf der Basis der aktuellen Datenlage die verschiedenen eIF-5A-Funktionen auf molekularer Ebene bisher nicht vollständig verstanden wurden. Die zellbiologischen Funktionen der meisten Proteine, insbesondere solcher mit regulatoriver Wirkung, werden zumeist durch Wechselwirkungen mit anderen Proteinen – direkt oder im Verbund eines Proteinkomplexes – vermittelt. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch die Funktionen des Proteins eIF-5A auf solchen Interaktionen beruhen und die Kenntnis von seinem Interaktom, also der Gesamtheit der mit eIF-5A interagierenden Proteine und Proteinkomplexe, zum Verständnis dieser Funktionen beitragen kann. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, im Interaktom von eIF-5A, DHS und DOHH Hinweise auf weitere Proteinfunktionen zu entdecken, die bisher noch nicht beschrieben wurden.

Um diese Fragestellung zu adressieren, sollten im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit unbekannte PPI der Proteine eIF-5A1, eIF-5A2, DHS und DOHH ermittelt werden. Dazu sollte eine hochsensitive Methode etabliert und auf die genannten Proteine angewandt werden.

Die erhaltenen Daten sollten anschließend bioinformatisch analysiert werden, um die identifizierten Proteine in funktionelle

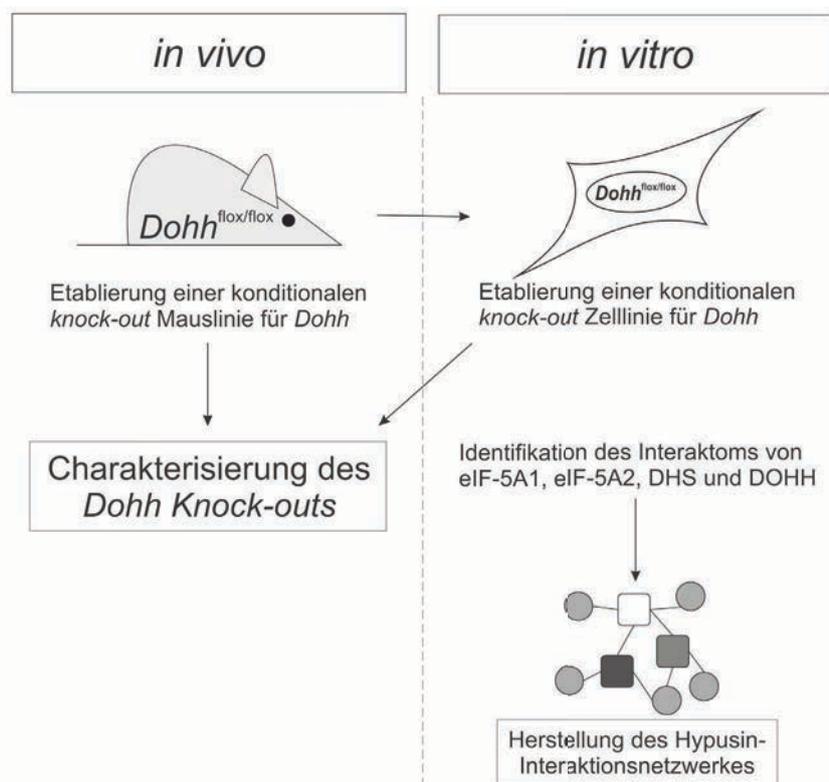


Abbildung 1.3: Überblick über die dieser Arbeit zugrunde liegenden Fragestellungen. Für das Enzym DOHH sollen durch die Etablierung je einer konditionalen *knock-out* Maus- und Zelllinie Modelle für Untersuchungen der Enzymfunktion *in vivo* und *in vitro* geschaffen werden. Außerdem soll ein Interaktionsnetzwerk für die an der Hypusiniierung beteiligten Proteine eIF-5A1, eIF-5A2, DHS und DOHH erstellt werden.

Zusammenhänge mit bekannten oder neuen Funktionen von eIF-5A und des Hypusinmodifikationssystems zu bringen.

Die beiden Projektteile ergeben damit folgende Zielsetzung (Abb. 1.3):

- Etablierung einer konditionalen KO-Mauslinie für das Gen *Dohh* und einer Fibroblasten-Zelllinie mit konditionalem *Dohh*-KO.
- Grundlegende Charakterisierung des *Dohh*-KO Phänotyps *in vivo* und *in vitro*.
- Identifikation des spezifischen Interaktoms von eIF-5A1, eIF-5A2, DHS und DOHH und Herstellung eines Interaktionsnetzwerkes dieser Proteine.
- Überprüfung einzelner neu entdeckter Interaktionen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Kits

| | |
|---|----------------------------|
| DreamTaq Green PCR Master Mix, | |
| GeneJET Gel Extraction Kit, | |
| GeneJET PCR Purification Kit | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit, | |
| Phusion High-Fidelity PCR Kit, | |
| DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit | Finnzymes, Vantaa, FIN |
| BAC Subcloning Kit, | |
| Quick & Easy Conditional Knockout Kit (loxP/Cre), | |
| Quick & Easy Conditional Knockout Kit (FRT/FLPe) | Gene Bridges, Heidelberg |
| NucleoSpin RNA II | Macherey Nagel, Düren |
| BCA Protein Assay Kit | Pierce (Thermo Scientific) |
| PureYield Plasmid Maxiprep System | Promega, Madison, WI |

2.1.2. Enzyme

| | |
|-------------------------------------|---|
| RNase A | Carl Roth, Düren |
| M-MuLV Reverse Transkriptase, | |
| RiboLock RNase Inhibitor, | |
| Proteinase K | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Restriktionsendonukleasen (diverse) | Fermentas, St. Leon-Rot und NEB, Ipswich, MA |
| acTEV Protease | Invitrogen, Carlsbad, CA |

2.1.3. Größenmarker für DNA und Proteine

| | |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| SmartLadder | Eurogentec, Serain, Belgien |
| PageRuler Prestained Protein Ladder | Fermentas, St. Leon-Rot |
| PeqGold Leiter-Mix Orange G | Peqlab Biotech. GmbH, Erlangen |

2.1.4. Chemikalien, Reagenzien und Puffer

| | |
|---|-----------------------------|
| TEMED | Amersham (GE Healthcare) |
| NP-40 | Applichem, Darmstadt |
| HEPES, L-Glutamin, Natriumpyruvat, Penicillin/Streptomycin, 0,25% Trypsin/EDTA (ES-Zellkultur) | Biochrom, Berlin |
| Bradford-Reagenz | Bio-Rad, Hercules, CA |
| GC7 | Biosearch Tech., Novato, CA |
| Acrylamid, Bromphenolblau, Calciumchlorid, Coomassie Brilliant Blue, DTT, Formaldehyd, Glutaraldehyd, Glycerin, Glycin, HEPES, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumhydrogenphosphat, Kristallviolett, LB-Agar, LB-Medium, Methanol, Na ₂ HPO ₄ , Natriumazid, Natriumcitrat, Natriumfluorid, Natriumhydrogencarbonat, RNase A, SDS, Spermidin, Spermin | Carl Roth, Düren |
| G418 | Clontech, Mountain View, CA |

| | |
|--|---------------------------------|
| 5x Protein Ladepuffer, Oligo(dT) ₁₈ , X-Gal | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Isopropanol | Fluka (Sigma-Aldrich) |
| CHAPS, IgG Sepharose Beads, Immobiline DryStrip, | GE Healthcare, Piscataway, NJ |
| Pharmalyte, Iodacetamid | |
| DMEM, FBS, Natriumpyruvat, Nichtessentielle | Gibco (Invitrogen) |
| Aminosäuren, Penicillin/Streptomycin, RPMI1640, | Harlan Teklad, Indianapolis, IN |
| Trypsin/EDTA, G418 | |
| Tamoxifen Spezialdiät für Mäuse (1g/kg) | |
| Agarose, Bis-Tris NuPage Gele, DEPC-H ₂ O, Lipo- | |
| flectamin 2000, Opti-MEM I Reduced Serum Medium, | Invitrogen, Carlsbad, CA |
| Propidiumiodid, S.O.C. | |
| Aceton, Essigsäure, Ethanol, Natriumchlorid, Natrium- | J. T. Baker, Deventer, NL |
| hydroxyd | Lonza, Basel, CH |
| PBS | Merck, Darmstadt |
| APS, BSA, Magnesiumchlorid, | Millipore, Billerica, MA |
| LIF (ESGRO), Immobilon-P Transfermembran | PAA, Linz, Österreich |
| FBS (ES- und Feeder Zellkultur) | Peqlab Biotech. GmbH, Erlangen |
| AceGlow Chemilumineszenzsubstrat, TriFast | Perkin Elmer, Waltham, MA |
| EN3HANCE-Lösung | |
| 4-Hydroxytamoxifen, Ampicillin, Chloramphenicol, | |
| Chloroform, Chloroquin, DMFO, DMSO, EDTA, | |
| Ethidiumbromid, D-Glukose, Hygromycin, Kanamycin, | |
| L-Arabinose, Maisöl, β-Mercaptoethanol, Natrium- | |
| orthovanadat, Nukleoside, Paraformaldehyd, Polybren, | |
| Puromycin, Protease Inhibitor, Cocktail, Tamoxifen, | |
| Tetracyclin, Tris, TritonX-100, Trypanblau, Tween-20, | |
| Urea | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO |
| Ammoniumchloridlösung | Stemcell Tech., Vancouver, BC |
| ECL Western Blotting Substrat, Hoechst 33342, <i>Restore</i> | |
| WB <i>stripping buffer</i> , Streptavidin Sepharose | Thermo Scientific, Waltham, MA |

2.1.5. Geräte

Laborgeräte wie Schüttler, Zentrifugen etc., die zur Standardausstattung gehören sind hier nicht einzeln aufgeführt.

| | |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| Biostat B Rührkesselbioreaktor | Sartorius, Göttingen |
| <i>Durchflusszytometer</i> | |
| FACSCalibur | |
| FACSAria | |
| FACSCantoII | BD, Franklin Lakes, NJ |
| FTICR Massenspektrometer | Thermo Scientific, Waltham, MA |
| nanoAQUITY UPLC | Waters Corp., Milford, MA |
| NanoDrop ND 1000 Spektrophotometer, | |
| Fusion-SL Chemilumineszenzsystem | Peqlab Biotech. GmbH, Erlangen |
| DU530 Photometer | Beckman Coulter, Brea, CA |
| Protean IEF cell | |
| GS800 Calibrated Densitometer | Bio-Rad, Hercules, CA |
| IX81 Fluoreszenzmikroskop, | |
| U-RFL-T Quecksilberbogenlampe | Olympus, Tokyo, JP |
| <i>Thermocycler</i> | |
| Mastercycler gradient | Eppendorf, Hamburg |

| | |
|--|---|
| iCycler und DNAEngine Cycler mit Chromo4 Real-time Detektor Mx3000P qPCR <i>Cycler</i> | Bio-Rad, Hercules, CA Stratagene, Santa Clara, CA |
| Tri-Carb 2900TR Szintillator, Wallac Multilabel Counter 1420 Vi-CELL XR | Perkin-Elmer, Waltham, MA Beckmann-Coulter, Brea, CA |
| Gene-Pulser Xcell mit PC- und CE-Module sowie Shock-Pod | Bio-Rad, Hercules, CA |
| Ultrazentrifuge RC 5C Plus mit SS-34 Rotor und SLA-1500 Rotor | Sorvall (Thermo Scientific) |
| Fujix Bas 2000 <i>Bioimager</i> | Fujifilm, Tokyo, JP |

2.1.6. Bakterienstämme

DH5 α Competent Cells,
ElectroMAX DH10B (*E. coli*) Invitrogen, Carlsbad, CA

2.1.7. Zelllinien und primäre Zellen

Eingerückte Bezeichnungen repräsentieren Derivate der jeweils zuvor angeführten Linie.

| | |
|--|--|
| NIH3T3 | Murine embryonale Fibroblastenzelllinie. Zur Verfügung gestellt von Prof. B. Fehse, Klinik für Knochenmarktransplantation, Hamburg |
| HEK293T | Humane embryonale Nierenzelllinie. ATCC Nr. CRL-11268. |
| Phoenix Eco | Zelllinie zur Herstellung ecotropher Retroviren zur viralen Transduktion. Im Wesentlichen HEK293T Zellen mit stabiler Expression der viralen Proteine gag/pol und env. ATCC Nr. SD-3444. |
| Ba/F3 | Murine Pro-B Zelllinie, IL-3 abhängig. Aus dem DMSZ. |
| Ba/F3 p210 | Ba/F3 mit stabiler BCR-ABL-Expression (Model für die CML), IL-3 unabhängig. Zur Verfügung gestellt von N. Shaw und C. Sawyers, UCLA, CA. |
| mESC | Murine embryonale Stammzellen R1 der Linie 129/X1 \times 129/S1. Zur Verfügung gestellt von Prof. Nagy, Mount Sinai Hospital, Toronto, CDN. |
| MEF | Aus murinen Embryonen gewonnene Primärzelllinie. Eigene Präparation (siehe Kapitel <i>Methoden</i>) bzw. als <i>Feeder</i> Zellen von Prof. Nagy, Mount Sinai Hospital, Toronto, CDN. |
| 3T3 ^{ΔDohh} | Aus MEF der Linie <i>Dohh</i> ^{tm2Bal} hergestellte Fibroblasten-Zelllinie (siehe Kapitel 2.2.1 und 3.2.5). |

2.1.8. Mausstämme

| | |
|-------------------------------|--|
| C57BL/6J | Dieser Stamm mit schwarzer Fellfarbe wurde 1921 beschrieben und ist einer der meistverwandten Mausstämme in der biomedizinischen Grundlagenforschung. Die Tiere stammen aus der Hintergrundzucht der Versuchstierhaltung des UKE, Hamburg. |
| <i>Dohh</i> ^{tm2Bal} | Der in dieser Arbeit beschriebene Stamm mit für den konditionalen <i>Knock-out</i> markiertem <i>Dohh</i> -Allel. Der genetische Hintergrund wurde nach der Herstellung auf C57BL/6J zurück gekreuzt. |
| 129/S1 und 129/X1 | Die 129-Linie ist ein weiterer häufig eingesetzter Mausstamm mit brauner Fellfarbe, dessen embryonale Stammzellen oft zum gezielten Einbau genetischer Mutationen mit anschließendem Blastozysten-transfer der embryonalen Stammzellen verwandt werden. |
| <i>Cre-Deleter</i> | Ein transgener Stamm mit dem genetischen Hintergrund des Stamms C57BL/6, der die Cre-Rekombinase ubiquitär exprimiert und zum <i>Knock-out</i> von loxP-flankierten Genabschnitten eingekreuzt wird ¹¹⁰ . Die in dieser Arbeit verwandten Tiere stammen aus der Hintergrundzucht der Versuchstierhaltung des UKE, Hamburg. |
| <i>Flp-Deleter</i> | Ein transgener Stamm mit genetischem Hintergrund des Stamms C57BL/6, der die Flp-Rekombinase ubiquitär exprimiert und zum <i>Knock-out</i> von FRT-flankierten Genabschnitten eingekreuzt wird ¹¹¹ . Die in dieser Arbeit verwandten Tiere stammen aus der Hintergrundzucht der Versuchstierhaltung des UKE, Hamburg. |
| HSC- <i>Scl-cre</i> /Esr1 | Die Tamoxifen-induzierbare CreEsr1-Rekombinase wird vom <i>Scl</i> -Promoter kontrolliert ¹¹² . Die Aktivierung dieses Promoters erfolgt spezifisch in hämatopoetischen Stammzellen. Der genetische Hintergrund entspricht dem des Stamms C57BL/6J. Zur Verfügung gestellt von Dr. Joachim Göthert (Universitätsklinikum Essen-Duisburg). |
| CAG-cre/Esr1 | Vollständig: B6.Cg-Tg(CAG-cre/Esr1*)5Amc/J ¹¹³ . Dieser transgene Stamm exprimiert die durch Tamoxifen induzierbare CreEsr1-Rekombinase vom CAG-Promoter. Die Expression ist somit ubiquitär. Der genetische Hintergrund entspricht dem des Stamms C57BL/6J. Angekauft von Charles River, Willmington, MA (<i>Stock</i> Nr. 004682). |

2.1.9. Vektorsysteme

| | |
|--|--|
| pMSCV | Dieses retrovirale, auf dem <i>Murine Stem Cell Virus</i> basierende Expressionssystem ist für den Einsatz in den meisten Säugerzelllinien geeignet. Alle eingesetzten pMSCV-Vektoren wurden von Clontech (Mountain View, CA) angekauft. |
| pCeMM | Dieses retrovirale, auf dem humanen Cytomegalivirus basierende System ist für die Expression von Fusionsproteinen mit dem Streptavidin-IgG-Tag (<i>SG-Tag</i>) konzipiert worden. Es wurde von Prof. Superti-Furga (Wien, A) zur Verfügung gestellt. |
| pcDNA3 | Dieses Expressionssystem wird direkt in Zielzellen transfiziert. Die in dieser Arbeit verwandten <i>split-YFP</i> -Konstrukte basieren auf dem pcDNA3-Plasmid. |
| Plasmide aus dem <i>BAC Subcloning Kit</i> und den <i>Quick & Easy Conditional Knockout Kits</i> | |
| Minimalvektor | Der Minimalvektor enthält nur die für die bakterielle Selektion und Replikation benötigten Sequenzen. Er wurde von Gene Bridges (Heidelberg) als Bestandteil des <i>BAC Subcloning Kit</i> angekauft. |
| pRed/ET | Expressionsplasmid für die Enzymbestandteile des Red/ET-Systems. Von Gene Bridges (Heidelberg) als Bestandteil des <i>BAC Subcloning Kit</i> angekauft. |
| 706-Cre | Expressionsplasmid für die bakterielle Expression der Cre-Rekombinase. Von Gene Bridges (Heidelberg) als Bestandteil des <i>Conditional Knockout Kit</i> (loxP/Cre) angekauft. |
| BAC RP23-372F16 | Das <i>bacterial artificial chromosome</i> (BAC) enthält einen Abschnitt des kurzen Arms des murinen Chromosoms 19, auf dem sich das <i>Dohh</i> -Gen befindet. Dieses wurde für die Herstellung der <i>Knock-out</i> Maus extrahiert und wie im Kapitel <i>Methoden</i> beschrieben unter Austausch des ursprünglichen Allels in das Genom embryonaler Stammzellen integriert. Angekauft aus dem <i>BACPAC Resources Center</i> [†] des <i>Children's Hospital Oakland Research Institute</i> (Oakland, CA). |

[†] <http://bacpac.chori.org/>

2.1.10. Puffer und Lösungen

Zellkulturmedien

Medium für Suspensionszellen

Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640

10% FBS

1 mM Natriumpyruvat

1 mM nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)

50 U Penicillin / 50 µg/ml Streptomycin

Medium für MEF (*Feeder* Zellen)

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)

9% FBS

0,1 mM NEAA

50 U Penicillin / 50 µg/ml Streptomycin

Medium für embryonale Stammzellen

DMEM

25 mM HEPES

15% FBS

2 mM L-Glutamin

0,1 mM NEAA

50 U Penicillin / 50 µg/ml Streptomycin

Nukleosidmix (1,3 µg/ml Adenosin; 1,37 µg/ml Guanosin; 1,18 µg/ml Cytidin;
1,18 µg/ml Uridin; 0,38 µg/ml Thymidin)

1 mM Natriumpyruvat

100 µM β-Mercaptoethanol

1000 U/ml ESGRO-LIF

Medium für Adhäsionszellen

DMEM

10% FBS

50 U Penicillin / 50 µg/ml Streptomycin

Medium für MEF/3T3 aus *Dohh*^{tm2Bal}

Adhäsionszellmedium

25 µM β-Mercaptoethanol

4 mM L-Glutamin

| | |
|---|--------------------------------------|
| Einfriermedium | KSOM/HEPES-Medium, pH 7,4 |
| 90% FBS | 95 mM NaCl |
| 10% DMSO | 2,5 mM KCl |
| Einfriermedium für ES-Zellen | 350 μ M KH_4PO_4 |
| 50% FBS | 200 μ M MgSO_4 |
| 40% DMEM | 10 mM Natriumlaktat |
| 10% DMSO | 200 μ M Natriumpyruvat |
| 2x Einfriermedium für ES-Zellsuspension | 200 μ M Glukose |
| 80% FBS | 4 mM NaHCO_3 (KSOM: 25 mM) |
| 20% DMSO | 1,7 mM CaCl_2 |
| 2x HBS, pH 7,05 | 1 mM Glutamin |
| 280 mM Natriumchlorid | 10 μ M EDTA |
| 10 mM Kaliumchlorid | 21 μ M HEPES (nicht in KSOM) |
| 1,5 M Na_2HPO_4 | |
| 12 mM Glukose | |
| 50 mM HEPES | |

Behandlung von Zelllinien und Mäusen

| | |
|--------------------|--|
| Tamoxifen | Spezialfutter mit 1g/kg Tamoxifen (Harlan, Indianapolis, IN) |
| 4-Hydroxytamoxifen | 1 mM in 95% Ethanol |
| GC7 | 10 mM in <i>A. dest.</i> |
| Puromycin | 5 mg/ml in <i>A. dest.</i> |
| G418 (Geneticin) | 50 mg/ml in <i>A. dest.</i> |
| Ketamin/Xylazin | 12 mg/ml Ketamin und 1,6 mg/ml Xylazin in 0,9% NaCl-Lösung |
| 4% PFA (Fixativ) | 4 g PFA in PBS lösen (erhitzen), auf 100 ml auffüllen |

Bakterien

| | |
|------------------------|-----------------------|
| Miniprep Lösung I | Miniprep Lösung II |
| 50 mM Glukose | 0,2 N Natriumhydroxid |
| 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 | 0,5% SDS |
| 10 mM EDTA, pH 8,0 | Miniprep Lösung III |
| | 25% 5 M Kaliumacetat |
| | 15% Essigsäure |

Proteinbiochemie

SDS-Lysispuffer

50 mM Tris-HCl, pH 7,6
 150 mM NaCl
 1% NP-40
 0,25% Natriumdeoxycholat
 1x Protease Inhibitor Cocktail

Trenngel: 10% (12%) Acrylamidgel, 10 ml

3,33 ml (4 ml) Acrylamid, 30%
 2,5 ml 1,5 M Tris, pH 8,8
 50 µl 20% SDS
 50 µl APS
 10 µl TEMED

Sammelgel: 4% Acrylamidgel, 10 ml

1,33 ml Acrylamid, 30%
 2,5 ml 0,5 M Tris, pH 6,8
 50 µl 20% SDS
 50 µl APS
 10 µl TEMED

5x SDS-Laufpuffer, 5l

360 g Glycin
 75 g Tris-Base
 25 g SDS

Semi-Dry Transferpuffer, 1l

5,82 g Tris-Base
 2,93 g Glycin
 1,9 ml 20% SDS
 200 ml Methanol

9 M Urea-Puffer

9 M Urea
 4% CHAPS

1% Pharmalyte

1% DTT

10 µg/ml Bromphenolblau

PBS-T

PBS

0,05% Tween-20

Blockierlösung

PBS-T

3% BSA

TAP-Assay

TAP-Lysispuffer

50 mM Tris, pH 7,6
 125 mM NaCl
 5% Glycerol
 0,2% NP-40
 1,5 mM MgCl₂
 25 mM NaF
 1 mM Na₃VO₄
 1x Protease Inhibitor Cocktail

TEV-Reaktionspuffer

10 mM Tris, pH 7,6
 100 mM NaCl
 0,2% NP-40
 0,5 mM EDTA

Molekularbiologie

50x TAE, 1l

242 g Tris-Base
57,1 ml Essigsäure
100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

Proteinase K Lysispuffer (1 ml)

50 mM KCl
50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
2,5 mM EDTA
0,45% NP-40
0,45% Tween-20
4,5 U Proteinase K

DNA extraction buffer

0,2 M Na₂HPO₄ (pH 7,8)
0,004% Triton X-100

DNA staining solution

200 µg PI
1 mg RNase A
10 ml PBS

Elektroporationspuffer (pH 7,05)

20 mM HEPES
137 mM Natriumchlorid
5 mM Kaliumchlorid
0,7 mM Na₂HPO₄
6 mM D-Glukose

Southern Blot

20x SSC

3 M NaCl
0,3M Natriumcitrat

SSPE (pH 7,04)

3 M NaCl
0,2 M Na₂HPO₄
0,02 M EDTA

Herring sperm DNA

10 mg/ml in *A. dest.* lösen
Dreimal aufkochen (Mikrowelle)
auf Eis stellen
15 min sonifizieren

Hybridisierungspuffer

7% (w/v) SDS
10% (w/v) Polyethylenglykol 6000
1,5x SSPE
200 µg/ml *herring sperm DNA*

Waschpuffer A

2x SSC
0,5% SDS

Waschpuffer B

0,2x SSC
0,1% SDS

Zellbiologische Methoden

PBS/FBS

0,5% hitzeinaktiviertes FBS
in PBS

FACS Puffer

0,1% Natriumazid
in PBS/FBS

2.1.11. Antikörper

| <i>Antikörper</i> | <i>Generiert in</i> | <i>Hersteller</i> |
|--------------------|---------------------|----------------------------------|
| Anti-DOHH* | Kaninchen | Eurogentec, Serain, Belgien |
| Anti-eIF-5A1 | Kaninchen | Novus Biologicals, Littleton, CO |
| Anti-eIF-5A2 | Maus | Abcam, Cambridge, MA |
| Anti-GAPDH | Maus | Millipore, Billerica, MA |
| Anti-Kaninchen-HRP | | Cell Signaling, Boston, MA |
| Anti-Maus-HRP | | GE Healthcare, Piscataway, NJ |
| Anti-Myc-Tag | Kaninchen | Cell Signaling, Boston, MA |
| Anti-Nucleophosmin | Maus | Invitrogen, Carlsbad, CA |
| Anti-TDP-43 | Kaninchen | Proteintech, Chicago, IL |
| Anti-Tubulin | Maus | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO |

* Zu Beginn der Arbeit an diesem Projekt war kein kommerzieller Anti-DOHH Antikörper erhältlich. Daher wurde der verwendete polyklonale Anti-DOHH Antikörper von der Firma Eurogentec durch Immunisierung mit dem Peptid *N*-QDFQYADGLERLRPPP-C individuell hergestellt.

2.1.12. Oligonukleotide (Primer)

Für alle in dieser Arbeit beschriebenen *real-time* RT-PCR Experimente wurden *QuantiTect SYBR Green PCR Kits* von Qiagen (Hilden) verwendet.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwandte Primer und Oligonukleotide

| Bezeichnung | Sequenz | Annealing bei | Elongation |
|----------------------------------|--------------------------|---------------|------------|
| Sequenzierprimer Dohh | | | |
| Dohh1 | TTCTCTATGGGAGAGACGG | - | - |
| Dohh2 | GGAATTGGACCCTTTTCCT | - | - |
| Dohh3 | CGTAGACCTGCTTCATGTG | - | - |
| Dohh4 | GGTGAGATCCATTTTGCAAC | - | - |
| Dohh5 | ATGCTATCTCGTGGATCAG | - | - |
| Dohh6 | GATTCGGATTGACCAGCTC | - | - |
| Dohh7 | CCCTTGCTGTTCACTGTC | - | - |
| Dohh8 | CGGCTCTTGGTCTATGTC | - | - |
| Dohh9 | GACCTGGGTGATCTCTTGT | - | - |
| Dohh10 | ATTGCGAGAGCACATTGAG | - | - |
| Dohh11 | GTCAAGCAGGGAGTACAAG | - | - |
| Sonstige Sequenzierprimer | | | |
| MSCV for | CCCTTGAACCTCCTCGTTCGACC | - | - |
| MSCV rev | CAGCGGGGCTGCTAAAGCGCATGC | - | - |
| T7 promoter primer | TAATACGACTCACTATAGGG | - | - |
| pCEMM CTAP rev | TCGGAGATAAGCTTCTGCTC | - | - |

| | | | |
|--|--|-----------|----------|
| YFP-2 rev | CCTTGATGCCGTTCTTTCCG | - | - |
| YFP-1 rev | GAAC TTGTGGCCGTTTACGTCG | - | - |
| Oligos zur Herstellung des Dohh-KO Minimalvektors | | | |
| DOHH-Step1-for | CAGGTGGTGGTGGCGCATGCCTTTAATCCCAGCACTTGGATG GATGTGGAGTTAAACAATTAACCCCTCACTAAAGGGCG | - | - |
| DOHH-Step1-rev | CCGGGATGCTGAGGCAGGAGGACCCCTGAGCTCCAGGCCACA GAAC TTCTAATACGACTCACTATAGGGCTC | - | - |
| DOHH-Step2-for | CCTGACTGCCACACTTGGTTGTGTGCACGTGACAGCGTGGAC GTCCCATCGCTCTCCTGAGTAGGACAAATC | - | - |
| DOHH-Step2-rev | AACCACCAACGGGAATCTGAGACTGAGATAGCAGCATGTGTT GAACACCAGTCGACTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATG | - | - |
| DOHH-Step3-for | AGGTGCCCCACACAAACCCTGGGGACTTTACCTGGCTGCCTA ACCATAGTTAATACGACTCACTATAGGG | - | - |
| DOHH-Step3-rev | AGCAGGAAAACAGTGGGCACATAGGGTCCCAAGGAAGGGACAC ACCAAGACCAATTAACCCCTCACTAAAGG | - | - |
| Primer zur Überprüfung des BAC/MV per PCR | | | |
| 372F16DOHH-forwar | CTTCCGCTTTGAGGACTCG | 55°C | 2:30 min |
| 372F16DOHH-rever | ACCTTTGGAACATGGTGCTC | | |
| DOHH-pSub-for | TCCTGTCTCAGGCCTCTGTT | 58°C | 2:30 min |
| amp-pSub | TGAGCAAAAACAGGAAGGCAA | | |
| Cass1 for | GGGCTACATGAGAACCCTCCA | 55°C | 2 min |
| Cass1 rev | ACCTGCATATCTGCCATTCC | | |
| DOHHCass2-for | ACCTGGGTGATCTCTTTGTGC | 55°C | 2 min |
| DOHHCass2-rev | CAGGGTCCTCAATGTGCTCT | | |
| Kan for | TATCAGGACATAGCGTTGGCTACC | 57°C | 1:30 min |
| PGK rev | CGAGACTAGTGAGACGTGCTAC | | |
| Cass2 for | ACCTGGGTGATCTCTTTGTGC | 60°C | 0:30 min |
| Cass2 rev | CAGGGTCCTCAATGTGCTCT | | |
| Dohh Southern for | CTCGAGCAAGGCAGGAAGAGGAAGTG | 60°C | 0:30 min |
| Dohh Southern rev | CTCGAGGAGGCTGCAAAGGACAAGAC | | |
| Primer zur Genotypisierung der Mäuse | | | |
| Dohh Genot. 1 for | AATATCACGGGTAGCCAACG | | |
| Dohh Genot. 1 rev | TGAATGAACTGCAGGACGAG | | |
| Dohh Genot. 2+4 for | GGCCACTCTTTGAGCGATAC | | |
| Dohh Genot. 2+3 rev | CCATGGGACTCTCAGTGGTC | | |
| Dohh Genot. 3 for | GGAGGGGACGGATAAAGTGT | | |
| Dohh Genot. 4 rev | GGCCGCATAACTTCGTATAA | | |
| Cre Genot. for | GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC | 58°C | 1 min |
| Cre Genot. rev | GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT | | |
| HSC-CreER Genot. for | GATCTCGAGCCATCTGCTG | | |
| HSC-CreER Genot. rev | GGTCGGCCGTCAGGGACAA | | |
| CAG-CreER Genot. for | CTCTAGAGCCTCTGCTAACC | | |
| CAG-CreER Genot. rev | CCTGGCGATCCCTGAACATGTCC | | |
| Klonierungsprimer | | | |
| CreEsr1 pMSCV pur f | CTAGGTCGACGCCACCATGTCCAATTTACTGACCG | 58°C | 1 min |
| CreEsr1 pMSCV pur r | CTAGGAATTCTCAGATCGTGTGGGG | | |
| eIF-5A1 pCEMM for | CTAGGAATTCGCCACCATGGCAGATGATTGGACTT | 58°C/65°C | 0:30 min |
| eIF-5A1 pCEMM rev | CTAGGTTTAAACTTTCCAGCTGCTTTTGCCATGGCCTTGATT G | | |

| | | | |
|---|--|-----------|----------|
| eIF-5A2 pCEMM for | CTAGGAATTCGCCACCATGGCAGACGAAATTGATTT | 58°C/65°C | 0:30 min |
| eIF-5A2 pCEMM rev | CTAGGGCCGGCCTTCCAGCTGCTTTGCAGGGCTTTATGGCTA | | |
| DHS pCEMM for | CTAGGAATTCGCCACCATGGAAGGGACCCCGCCAGG | 58°C/65°C | 1:00 min |
| DHS pCEMM rev | GGCCGGCCAGTCTTTCATTCTTCTCAGCTC | | |
| DOHH pCEMM for | CTAGGAATTCGCCACCATGGTAACGGAGCAAGAGAT | 58°C/65°C | 0:45 min |
| DOHH pCEMM rev | CTAGGGCCGGCCTTCCAGCTGCGGGTGGTGGCCGAGGCGCT | | |
| eGFP pCEMM for | CTAGGAATTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA | 58°C/65°C | 0:45 min |
| eGFP pCEMM rev | CTAGGGCCGGCCTTGTACAGCTCGTCCATGC | | |
| RL10a pCEMM for | CTAGGAATTCGCCACCATGAGCAGCAAAGTCTC | 55°C/62°C | 0:30 min |
| RL10a pCEMM rev | CTAGGGCCGGCCTATACAGACGCTGGGG | | |
| RS5 pCEMM for | CTAGGAATTCGCCACCATGACTGAGTGGGAAGC | 55°C/62°C | 0:30 min |
| RS5 pCEMM rev | CTAGGGCCGGCCTGCGGTTAGACTTGGC | | |
| PAI-RBP1 YFP for | CTAGGAATTCGCCACCATGCCTGGGCAGC | 58°C/65°C | 0:45 min |
| PAI-RBP1 YFP rev | CTAGGGCCGGCCTGGCCAGAGCTGGG | | |
| TDP-43 YFP for | CTAGCGTCTCGAATTCGCCACCATGTCTGAATATATTCGGGT | 55°C/62°C | 0:45 min |
| TDP-43 YFP rev | CTAGGGCCGGCCCCATTTCCCAGCCAGAA | | |
| NPM YFP for | CTAGGAATTCGCCACCATGGAAGACTCGATGG | 55°C/62°C | 0:30 min |
| NPM YFP rev | CTAGGGCCGGCCTAAGAGATTTCTCCACTG | | |
| LDH-A YFP for | CTAGGAATTCGCCACCATGGCAACCCTCAAG | 55°C/62°C | 0:45 min |
| LDH-A YFP rev | CTAGGGCCGGCCTGAACTGCAGCTCCTTCTG | | |
| MCM5 YFP for | CTAGGAATTCGCCACCATGTCGGGCTTCGAC | 58°C/65°C | 1:15 min |
| MCM5 YFP rev | CTAGGGCCGGCCTCTTGAGGCGATAGAGCAC | | |
| PKM2 YFP for | CTAGGAATTCGCCACCATGCCGAAGCCACAC | 58°C/65°C | 1:00 min |
| PKM2 YFP rev | CTAGGGCCGGCCTAGGTACAGGCACTACAGC | | |
| GCDH (Vorl.) YFP for | CTAGCGTCTCGAATTCGCCACCATGTCCCTGAGAGGAGTC | 58°C/65°C | 0:45 min |
| GCDH YFP rev | CTAGGGCCGGCCCCCTTGCCAACCGTGAATG | | |
| GCDH (reif) YFP for | CTAGCGTCTCGAATTCGCCACCATGCGCCCCGTGTTTAC | 58°C/65°C | 0:45 min |
| GCDH (reif) YFP rev | CTAGGGCCGGCCCCCTTGCCAACCGTGAATG | | |
| DDX3X YFP for | CTAGGAATTCGCCACCATGAGTCATGTGGCAGTG | 58°C/65°C | 1:00 min |
| DDX3X YFP rev | CTAGGGCCGGCCAGTTACCCACCAGTCAAC | | |
| EF-2 YFP for | CTAGGAATTCGCCACCATGGTGAACCTCACAGTAGA | 55°C/62°C | 1:30 min |
| EF-2 YFP rev | CTAGGGCCGGCCCCAGTTTGTCCAGGAAGTT | | |
| CCT5 YFP for | CTAGGAATTCGCCACCATGGCGTCCGTGGG | 55°C/62°C | 0:45 min |
| CCT5 YFP rev | CTAGGGCCGGCCTTTCTTTCAGATTCTCCAGG | | |
| MAP4K1 YFP for | CTAGGCGGCCGCGCCACCATGGCCCTTGTGGAC | 58°C/65°C | 1:30 min |
| MAP4K1 YFP rev | CTAGGGCCGGCCTTTCTTGGATGTAGAGGTTG | | |
| Oligos zur Klonierung einer <i>multiple cloning site</i> in pcDNA3 YFP₁ und YFP₂ | | | |
| PCA-MCS for | AATTCGCGGCCGCGCCACCATGGACCGGTGGCCGG | - | - |
| PCA-MCS rev | CCACCGGTCCATGGTGGCGCGGCCGCG | | |
| Primer für die Punkt- und Deletionsmutagenese | | | |
| eIF-5A1 K50R for | CTACTTCAAGACTGGCAGGCACGGCCAC | 65°C | variabel |
| eIF-5A1 K50R rev | GTGGCCGTGCCTGCCAGTCTTCAAGTAG | | |
| eIF-5A2 K50R for | ACTTCCAAGACTGGGAGGCATGGT | 65°C | variabel |
| eIF-5A2 K50R rev | CCATGCAAAATCGTGGAGATGTCA | | |
| eIF-5A1 G52A for | GACTGGCAAGCATGCCCATGCCAAGGTCC | 65°C | variabel |
| eIF-5A1 G52A rev | GGACCTTGGCATGGGCATGCTTGCCAGTC | | |
| eIF-5A2 G52A for | GACTGGGAAGCATGCTCATGCCAAGGTACAC | 65°C | variabel |
| eIF-5A2 G52A rev | GTGTACCTTGGCATGAGCATGCTTCCCAGTC | | |
| eIF-5A1 1-83 rev | CTAGGTTTAAACTTGTGGGGACATCCATAT | 65°C | variabel |
| eIF-5A2 1-83 rev | CTAGGGCCGGCCTATTTGGAACATCCATGTTG | | |
| eIF-5A1 84-154 for | CTAGGAATTCGCCACCATGATCAAACGGAATGACTTC | 65°C | variabel |
| eIF-5A2 84-154 for | CTAGGAATTCGCCACCATGATTAAGAGAAACGATTATCAAC | | |

2.1.13. Selbst klonierte Plasmidkonstrukte

Minimalvektor mit für den konditionalen KO markiertem *Dohh*-Allel sowie der flankierenden genomischen Sequenz (vgl. Abschnitt 3.1.1)

Genomische Sequenz der *Southern* Blot Sonde in pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA)

Kloniert in den pMSCV Expressionsvektor

pMSCV puro CreEsr1

Kloniert in den pCeMM (SG) CTAP Expressionsvektor:

| | | |
|---------------------------|---------------------------|----------|
| eGFP (V2)* | eIF-5A2 _{K50R} | NPM |
| eIF-5A1 | eIF-5A2 _{G52A} | PAI-RBP1 |
| eIF-5A1 _{K50R} | eIF-5A2 ₁₋₈₃ | RS5 |
| eIF-5A1 _{G52A} | eIF-5A2 ₈₄₋₁₅₄ | RL10a |
| eIF-5A1 ₁₋₈₃ | DHS | TDP-43 |
| eIF-5A1 ₈₄₋₁₅₄ | DOHH | |
| eIF-5A2 | LDH-A | |

* Dem pCeMM (SG) eGFP Plasmid wurde aufgrund seiner hohen Toxizität in den Ziellzellen das Reporter-GFP entfernt.

Als YFP-1 und YFP-2 Fusionsgen in den pcDNA3 Expressionsvektor kloniert:

| | | |
|-------------------------|---------------------------|----------|
| CCT5 | eIF-5A1 ₈₄₋₁₅₄ | MAP4K1 |
| DDX3X | eIF-5A2 | MCM5 |
| DHS | eIF-5A2 _{K50R} | NPM |
| DOHH | eIF-5A2 _{G52A} | PAI-RBP1 |
| EF-2 | eIF-5A2 ₁₋₈₃ | PKM2 |
| eIF-5A1 | eIF-5A2 ₈₄₋₁₅₄ | RS5 |
| eIF-5A1 _{K50R} | GCDH (Vorläufer) | RL10a |
| eIF-5A1 _{G52A} | GCDH (reif) | TDP-43 |
| eIF-5A1 ₁₋₈₃ | LDH-A | |

Die als Negativkontrolle verwendeten Konstrukte (MCFD2 und ERGIC-53) wurden von Prof. Hans-Peter Hauri (Universität Basel) zur Verfügung gestellt.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank der erforderlichen Biosicherheitsstufe (S1 bzw. S2) durchgeführt. Die Zentrifugation von Zellen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur und 450 g. Medien wurden vor der Verwendung im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt. Die Inkubation von Zellen erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Zellen wurden regelmäßig auf Mykoplasmen-Kontamination getestet.

Kultivierung von Ba/F3 p210 im Bioreaktor

Die Kultivierung von Zellen der Ba/F3 p210-Zelllinie im Bioreaktor-Maßstab erfolgte in der Technischen Universität Hamburg-Harburg und wurde dort von Oscar Platas-Barradas und Martin Schaletzky etabliert und durchgeführt.

Zu Beginn wurde eine Starterkultur in 75 cm² T-Flaschen angesetzt und regelmäßig nach einer Trypanblau-Färbung im Hämocytometer gezählt. Die Zellen wurden nach Erreichen der

exponentiellen Wachstumsphase in einen Rührkesselbioreaktor überführt. Dabei wurde eine Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml in einem Volumen von 5l eingestellt.

Der pH der Zellsuspension wurde durch Zugabe von CO₂ und 0,5 M Na₂CO₃ auf 7,2 geregelt. Die Rotordrehzahl (Rührgeschwindigkeit) wurde auf 100 min⁻¹ eingestellt. Bis die erwünschte Zelldichte erreicht war wurden zweimal täglich Proben gezogen. Der verwendete Bioreaktor ist in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt.

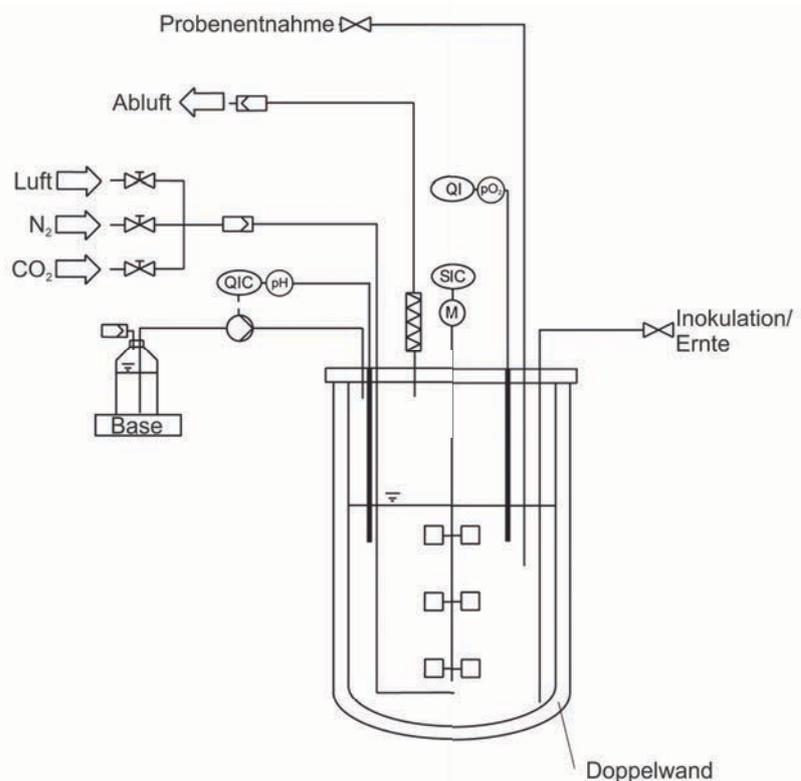


Abbildung 2.1: Schaltskizze des für die Kultivierung von Ba/F3 p210 verwendeten Bioreaktors. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Oscar Platas-Barradas (TU Hamburg-Harburg).

Kultivierung von Suspensionszellen

Suspensionszellen der Linie Ba/F3 p210 wurden in T-Flaschen und Suspensionszellmedium unter Standardbedingungen kultiviert. Zellen wurden in einer Dichte von maximal 10^5 Zellen/ml ausgesät und nach zwei bis drei Tagen passagiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte entweder durch Vitalfärbung mit Trypanblau und anschließender Zählung in der Neubauer-Zählkammer oder mit dem Vi-CELL XR.

Kultivierung von Adhäsionszellen

Adhäsionszellen der Linien HEK293T (und deren Derivate), NIH3T3 und MEF wurden in Zellkulturschalen, *Multiwell*-Platten oder T-Flaschen kultiviert. Die Zellen wurden vor Erreichen vollständiger Konfluenz durch die Zugabe von Trypsin/EDTA vom Gefäßboden abgelöst, zum Stoppen der Trypsin-Aktivität in Medium aufgenommen und vor dem erneuten Aussäen nach Bedarf im Verhältnis von 1:5 bis 1:10 verdünnt.

Die Kultivierung von MEF und 3T3 ^{Δ Dohh}, die aus der Linie *Dohh*^{tm2Bal} isoliert wurden, erfolgte wie beschrieben (s. u.).

Gewinnung und Kultivierung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)

Schwangere Weibchen wurden 12 bis 13 Tage nach der Verpaarung (12,5 bis 13,5 p. c.) getötet, das Peritoneum durch einen Y-förmigen Bauchdeckenschnitt eröffnet und zunächst der Uterus und dann die einzelnen Embryonen frei präpariert. Nach der Entfernung des Kopfes und der blutbildenden (roten) Organe wurden die Embryonen (bei Bedarf separat) gewaschen, mit einem Skalpell zerkleinert, anschließend mit Trypsin-EDTA Lösung bedeckt und darin für 5 bis 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Auf- und Abpipettieren wurde eine homogene Suspension hergestellt, diese in ein neues Röhrchen überführt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in MEF-Medium aufgenommen und in einer Dichte von etwa 8×10^6 Zellen pro 10 cm Schale ausplattiert. Die Zellen wurden zwei bis drei Tage bis zum Erreichen vollständiger Konfluenz inkubiert und im Folgenden nach jeder Passage in einer Dichte von ca. $1,2 \times 10^6$ Zellen pro 10 cm Schale ausgesät (dies entspricht ungefähr 3×10^5 Zellen in einer 5 cm Schale). Falls die Embryonen unterschiedliche Genotypen aufweisen konnten, wurden die MEF jedes Embryos zunächst separat kultiviert, per PCR genotypisiert (siehe Abschnitt 2.2.4) und Zellen mit gleichen Genotypen zusammengeführt.

Herstellung einer Fibroblasten-Zelllinie aus MEF

Die Herstellung einer Fibroblasten-Zelllinie aus MEF erfolgte nach dem 3T3-Protokoll von Todaro und Green¹¹⁴. MEF wurden wie oben beschrieben präpariert, ab der zweiten Passage alle drei Tage passagiert und in einer Dichte von $1,2 \times 10^6$ Zellen pro 10 cm Schale (bzw. 3×10^5 pro 5 cm Schale) neu ausgesät. Über neun bis zehn Passagen nahm die Proliferationsrate der Zellen ab und steigerte sich im weiteren Verlauf der Passagen wieder bis über den Ausgangswert. Der Phänotyp der Zellen veränderte sich während dieser Phase hin zu für Fibroblasten typischer Morphologie mit zwei oder mehr gestreckten Ausläufern. Die Zellen waren nun über eine große Anzahl Passagen stabil (> 50) und wurden als 3T3 ^{Δ Dohh} bezeichnet.

Kultivierung von murinen embryonalen Stammzellen (mESC)

Die Kultivierung von mESC wurde im Labor der UKE Core Facility ‚Transgene Tiere‘ von PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer, Sarah Homann sowie mit Eigenbeteiligung unter deren Anleitung durchgeführt.

Die mESC wurden auf einer Schicht mitoseinaktivierter, neomycinresistenter MEF kultiviert. Dafür wurden MEF bis zur Konfluenz kultiviert und zur Expansion 1:3 bis 1:4 passagiert. Zur Verwendung als *Feeder* Zellen wurde durch Behandlung der konfluenten MEF mit 10 μ g/ml Mitomycin C über 2-3 h ein irreversibler Zellzyklusarrest ausgelöst. Die MEF wurden anschließend trypsiniert und 5×10^4 Zellen/cm² auf gelatinisierten Schalen ausgesät. Embryonale Stammzellen wurden aufgetaut und in Stammzellmedium auf dem *feeder cell layer* ausgesät. Das Medium wurde täglich gewechselt und die Zellen alle zwei Tage 1:4 bis 1:6 mit 0,25%-igem Trypsin/EDTA auf neue *Feeder* Zellen passagiert.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden $1-2 \times 10^6$ Zellen abzentrifugiert, in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen mit ca. 1°C/min auf -80°C heruntergekühlt. Danach wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad angewärmt und in 5 ml Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in der benötigten Menge Medium resuspendiert und ausgesät.

Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch Färbung mit Trypanblau. Trypanblau kann intakte Zellmembranen nicht passieren und färbt daher ausschließlich tote Zellen an. Für die Färbung

wurde Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:5 mit der Zellsuspension gemischt und anschließend ca. 10 µl der Suspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Der durch Auszählen ermittelte Durchschnittswert ungefärbter Zellen pro Großquadrat entspricht der Anzahl lebender Zellen in 100 nl bzw. 10^{-4} ml Zellsuspension. Der Anteil lebender Zellen ergibt sich aus dem Verhältnis ungefärbter Zellen zur Gesamtzellzahl. Die Zellzahlbestimmung im ViCELL XR erfolgte automatisiert nach demselben Prinzip. Alle in dieser Arbeit verwandten Zelllinien wurden mit den Standardeinstellungen für die Linie CHO gemessen.

Retrovirale Transduktion

Geeignete Expressionsplasmide wurden zunächst in Phoenix- oder HEK293T-Verpackungszellen transfiziert und von diesen, in virale Partikel verpackt, in den Kulturüberstand abgegeben. Durch Inkubation mit dem Virusüberstand wurde das Konstrukt stabil ins Genom der Zielzellen integriert. Anschließende Selektion anhand des im Konstrukt enthaltenen Markers ermöglichte die Herstellung einer vollständig positiven Zelllinie.

Pro Konstrukt wurden Phoenix bzw. HEK293T Zellen in einer 10 cm Schale bei etwa 70% Konfluenz transfiziert. Dazu wurden 20 µg Plasmid-DNA bzw. 10 µg Plasmid-DNA, 5 µg Rev-Plasmid, 10 µg Gag/Pol-Plasmid sowie 2-5 µg nach Hüllprotein-Plasmid (je nach eingesetztem Plasmid) und 62,5 µl 2 M CaCl_2 mit *A. dest.* auf 500 µl aufgefüllt und mit 500 µl 2x HBS vermischt. Während der tropfenweisen Zugabe des HBS-Puffers wurde mit der Pipettierhilfe ein konstanter Luftstrom in der Lösung erzeugt. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung zu den Phoenix-Zellen in 9 ml frisches Medium eingetropft, 2,5 ml 100 mM Chloroquin zugegeben und vorsichtig geschwenkt. Nach 12 h Inkubation wurde das Medium durch 5 ml frisches Zielzellmedium ersetzt.

Nach weiteren 12 h wurde der Virusüberstand durch frisches Medium ersetzt, durch einen 45 µm Filter gereinigt und auf die Zielzellen gegeben. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt.

Die Zielzellen wurden nach Inkubation mit dem letzten Virusüberstand einen Tag in frischem Medium inkubiert und anschließend anhand des im Expressionsplasmid enthaltenen Selektionsmarkers selektiert. Dazu wurden die Zellen so lange in mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten Medium kultiviert, bis alle Zellen einer Kontrollkultur derselben Zelllinie abgelöst waren. Mit fluoreszenten Proteinen markierte Zellen wurden mittels eines Durchflusszytometers (FACS) in der *FACS-Sorting Core Facility* des UKE sortiert.

2.2.2. Methoden zur Herstellung einer *knock-out* Mauslinie

Die Methoden zur Herstellung der in dieser Arbeit beschriebenen KO-Mauslinie sind zum besseren Verständnis in diesem Abschnitt zusammengefasst und chronologisch aufgeführt.

Eine Übersicht der im Folgenden ausführlich beschriebenen Arbeitsschritte ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

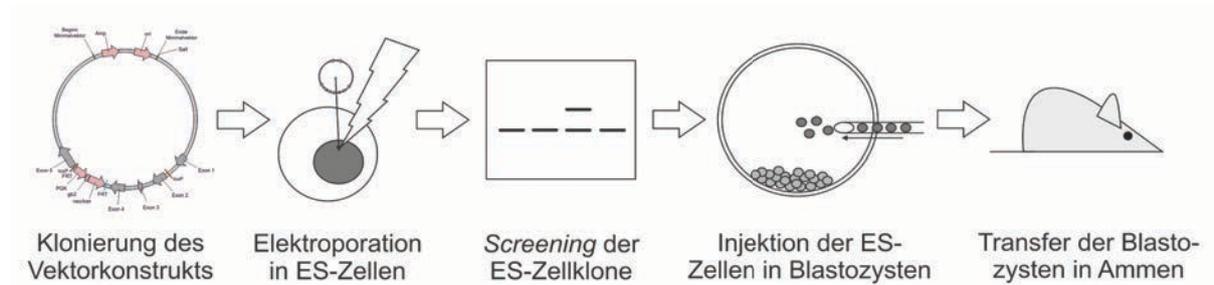


Abbildung 2.2: Die bei der Herstellung der *Dohh knock-out* Mauslinie durchgeführten Arbeitsschritte.

Klonierung des Vektorkonstruktes zur Herstellung der konditionalen *Dohh knock-out* Maus

Die Klonierung des Vektorkonstruktes erfolgte in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten (siehe Kapitel 3.1.1). Alle dort beschriebenen Rekombinationsschritte wurden in Bakterien unter Verwendung der Red/ET-Rekombinationstechnologie (Abb. 2.3) durchgeführt. Bei der Red/ET-Rekombination werden die Enzyme Red α und Red β des λ -Phagen exprimiert. Bei Red α handelt es sich um eine 5'-3' Exonuklease. Der von Red α freigelegte Einzelstrang wird von Red β gebunden und mit einer homologen Region doppelsträngiger DNA gepaart. Das 3'-Ende des Einzelstranges dient als *Primer* für die DNA-Replikation, wobei die neue Sequenz mit der vorhandenen DNA rekombiniert wird.

Zur Vorbereitung der Red/ET-Rekombination wird der zu rekombinierende DNA-Abschnitt per PCR amplifiziert und dabei jeweils etwa 80 bp große Homologieregionen angehängt. Die PCRs wurden wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben durchgeführt. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von 10% (v/v) 3 M Natriumacetat (pH 7,0) sowie 300% (v/v) Ethanol 5 min bei -80°C präzipitiert und weitere 5 min bei 20.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert. Die DNA-Konzentration der Lösung wurde photometrisch gemessen.

Währenddessen wurde das Red/ET-Expressionsplasmid in Bakterien elektroporiert, die bereits das BAC mit der *Dohh*-Gensequenz bzw. den Minimalvektor aus dem vorangegangenen Schritt enthielten. Dafür wurden die Bakterien in LB-Medium mit den entsprechenden

Antibiotika bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD) von ca. 0,6 kultiviert und 1 ml der Kultur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit *A. dest.* gewaschen, anschließend in ca. 30 µl resuspendiert und mit 20 ng (1 µl) des Red/ET-Expressionsplasmids versetzt. Die Suspension wurde dann in eine 1 mm Elektroporationskuvette überführt und gepulst (1,8 kV, 200 Ω, 5 ms). Die Bakterien wurden unmittelbar nach dem Puls in 1 ml LB-Medium aufgenommen und 70 min bei 30°C geschüttelt. Nach

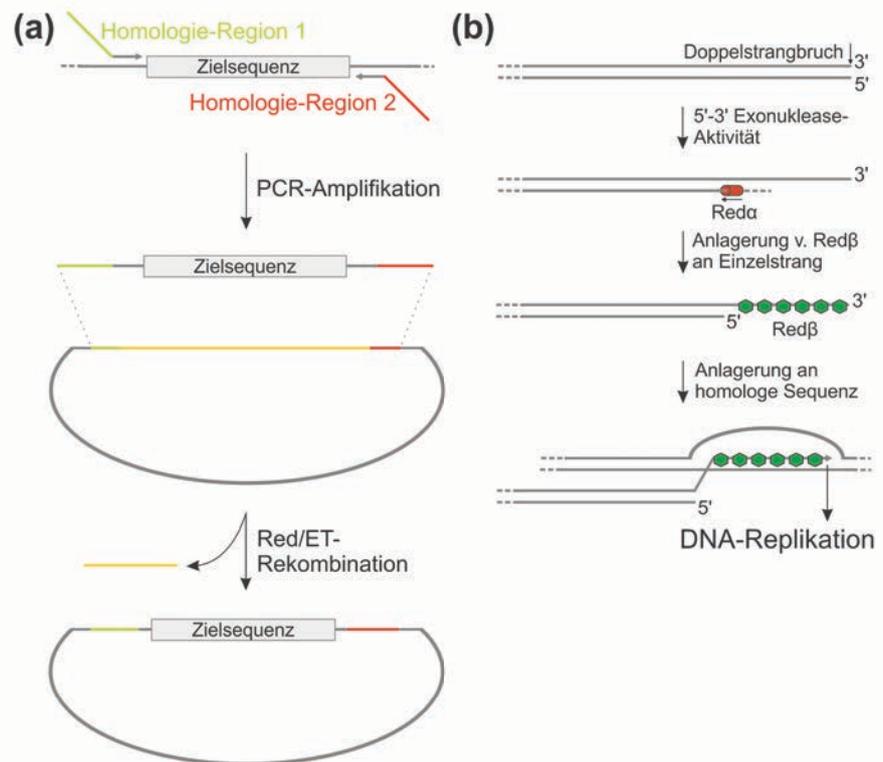


Abbildung 2.3: Der Red/ET-Technologie zugrunde liegende Mechanismen. (a) Durch die Verwendung von Oligonukleotiden mit zur Insertionsstelle homologen Regionen (grün/rot) wird die dazwischen (gelb) einzufügende Zielsequenz (Kasten) per PCR amplifiziert. Durch Expression des Red/ET-Systems und Transformation des PCR-Produktes sowie des Zielkonstruktes wird die Zielsequenz in das Konstrukt rekombiniert. (b) Die 5'-3' Exonukleaseaktivität des Enzyms Redα legt, von einem Doppelstrangbruch ausgehend, einen Einzelstrang frei. Diesen bindet Redβ und vermittelt dessen Anlagerung an eine homologe Sequenz. Durch die endogenen Enzyme der DNA-Replikation werden beide Sequenzen rekombiniert. *Abbildung modifiziert nach Gene Bridges, Quick and Easy Conditional Knockout Kit (Cre/loxP), Handbuch Version 1.1 (2007)*

der Inkubation wurden 100 ml der Kultur auf eine LB-Agar-Platte ausgestrichen, die mit den entsprechenden Antibiotika vorbehandelt war und über Nacht bei 30°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde ein Klon gepickt, bei 30°C in 1,4 ml LB-Medium bis zu einer OD von ca. 0,6 inkubiert und die Expression der Red/ET-Enzyme durch Zugabe von 50 µl 10% L-Arabinose induziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit den angehängten, zur Zielsequenz homologen Bereichen auf die oben beschriebene Weise in die Bakterien elektroporiert. Nach der Elektroporation wurden die Bakterien bei 37°C inkubiert. Bei dieser Temperatur wurde das Red/ET-Plasmid nicht mehr repliziert und ging nach wenigen Generationen verloren. Die Bakterien wurden wieder auf mit Antibiotika behandelte LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Plasmid-DNA einzelner Klone wurde präpariert (siehe Abschnitt 2.2.4: *Aufreinigung von Plasmid-DNA aus*

Bakterien) und durch Restriktionsverdau sowie Sequenzierung auf das erwünschte Rekombinationsereignis überprüft.

Nach dem Einbau der loxP-PGK-gb2-neo-loxP Kasette musste diese durch Expression der Cre-Rekombinase wieder entfernt werden. Dafür wurde das 706-Cre Expressionsplasmid in Bakterien elektroporiert, die bereits den Minimalvektor mit der Selektionskasette enthielten (s. o.). Die Bakterien wurden über Nacht bei 30°C selektiert. Am nächsten Tag wurde ein Klon in einer 1 ml Kultur für ca. 2 h bei 30°C kultiviert und anschließend die Expression der Cre-Rekombinase durch Erhöhen der Temperatur auf 37°C induziert. Die Temperaturveränderung bewirkte zugleich die Inhibition der Replikation des Plasmids, so dass es innerhalb weniger Generationen aus der Kultur verschwunden war. Die DNA wurde anschließend isoliert und wiederum in frische *E. coli* retransformiert. So wurde ausgeschlossen, dass Einzelklone mit einer Mischung aus korrekt und falsch rekombinierten Plasmiden ausgewählt wurden. Die DNA wurde daraufhin wiederum durch Restriktionsverdau und Sequenzierungen überprüft.

Ein vollständig sequenzierter Klon mit korrekter Integration beider *Targeting* Sequenzen und ohne Mutationen in der kodierenden *Dohh*-Sequenz wurde für die Elektroporation in embryonale Stammzellen mit SalI verdaut, wodurch das Plasmid am 3'-Ende des Minimalvektor-*Backbone* linearisiert wurde. Dafür wurden 60 µg DNA mit 80 U SalI in einem Gesamtvolumen von 500 µl über Nacht bei 37°C verdaut. Dies war nötig, um dem System zur homologen Rekombination in den embryonalen Stammzellen einen Doppelstrangbruch zu präsentieren und die Rekombination dadurch zu induzieren. Die DNA wurde mit Phenol-Chloroform aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.2.4) und ihre Konzentration anschließend photometrisch bestimmt.

Transfektion und Selektion embryonaler Stammzellen durch Elektroporation

Die Elektroporation wurde im Labor der UKE Core Facility ‚Transgene Tiere‘ unter der Anleitung von PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer durchgeführt. Die anschließende Kultivierung wurde von PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer und Sarah Homann sowie mit Eigenbeteiligung unter deren Anleitung durchgeführt.

Die Methode der Kultivierung von ES-Zellen auf MEF ist in Abschnitt 2.2.1 beschrieben. Der zeitliche Ablauf der Elektroporation und der darauf folgenden Kultivierung und Selektion der Stammzellen ist in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt (modifiziert aus Voigt¹¹⁵).

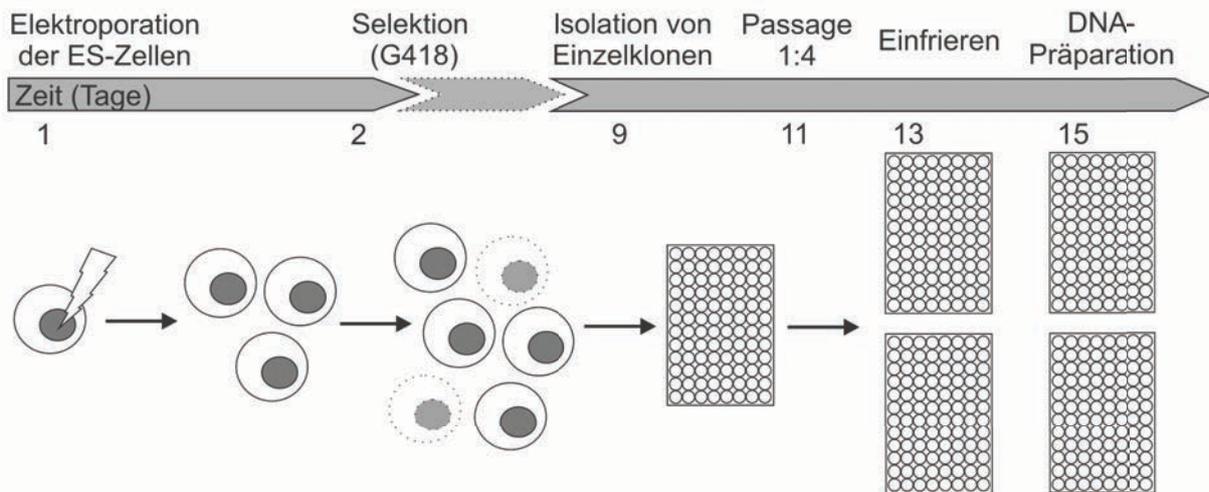


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der ES-Zellkultur für die Herstellung der konditionalen *Dohh*-KO Mauslinie. Nach der Elektroporation (Tag eins) werden die Zellen anhand der Neomycin-Resistenz selektiert (Tage zwei bis acht). An Tag neun werden Einzelklone isoliert und später 1:4 passagiert (Tag elf). Die Hälfte der Zellen wird zur weiteren Verwendung eingefroren (Tag 13), die andere Hälfte zur Präparation genomischer DNA für den anschließenden *Southern* Blot verwendet (*modifiziert aus Voigt*¹¹⁵).

Zwei Tage vor der Elektroporation wurden die ES-Zellen auf eine mit mitotisch inaktivierten MEF beschichtete und gelatinierte 10 cm Schale ausgesät. Das Medium wurde täglich sowie einmal zusätzlich zwei Stunden vor Versuchsbeginn gewechselt. Die Zellen wurden trypsinisiert (0,25% Trypsin/EDTA), in PBS gewaschen und 10^7 Zellen pro Ansatz in 800 μ l Elektroporationspuffer resuspendiert. Die Suspension wurde mit 30 μ g des durch Sall linearisierten *Targeting*-Konstrukts gemischt, in eine 4 mm Elektroporationsküvette überführt und 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden gepulst (250V Spannung, max. 500 μ F Kapazität, 5,5-6,5 ms Pulslänge), anschließend 10 min inkubiert und wie oben beschrieben auf fünf 10 cm Schalen ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Selektion durch Zugabe von 150-250 μ g/ml G418 (Geneticin) gestartet. Das Selektionsmedium wurde eine Woche lang täglich gewechselt. Am neunten Tag wurden die Platten mit PBS gewaschen und mit 10 ml PBS überschichtet. 192 der selektierten Kolonien mit runder, scharf abgegrenzter Morphologie wurden in 96 Well-Platten mit vorgelegtem Trypsin/EDTA überführt, vereinzelt und anschließend in gelatinierte, mit MEF beschichtete 96 Well-Platten ausgesät. Das Medium wurde täglich gewechselt und die Klone zwei Tage später 1:4 passagiert, so dass jeder selektierte Klon sowohl für die spätere Verwendung im Blastozystentransfer eingefroren als auch seine genomische DNA für *Southern* Blots isoliert werden konnte. Zum Einfrieren in 96 Well-Platten wurde das Medium gewechselt, die Zellen zwei Stunden später mit PBS/EDTA gewaschen und mit 40 μ l 0,25% Trypsin/EDTA vereinzelt. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 60 μ l Stammzellmedium inhibiert und die

Platte auf Eis gestellt. Nun wurde zu jedem Well 100 µl 2x Einfriermedium zugegeben und sorgfältig gemischt. Die Platte wurde mit Klebeband versiegelt und bei -80°C eingefroren.

Southern Blot

Die Isolierung genomischer DNA sowie die Southern Blots wurden im Labor der UKE Core Facility ‚Transgene Tiere‘ von PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer und Sarah Homann durchgeführt.

Die Sonde für den *Southern Blot* wurde per PCR vom BAC RP23-372F16 amplifiziert, nach Herstellerangaben in den pCR®2.1-TOPO® Vektor kloniert und nach Bedarf mittels XhoI-Restriktionsverdau ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA aus den Stammzellen im 96 Well-Format wurde das Medium alle zwei Tage bis zum Erreichen vollständiger Konfluenz gewechselt. Das Medium wurde abgekippt und jedes Well der Platte mit 200 µl PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit je 100 µl ES-Zell-Lysispuffer über Nacht bei 55°C und 100% relativer Luftfeuchte lysiert. Dem Lysat wurde im Verhältnis 1:10 8 M LiCl und anschließend 1:2 Isopropanol beigemischt. Die DNA wurde unter Schütteln über Nacht bei Raumtemperatur und 100% relativer Luftfeuchte gefällt. Die Platte wurde am nächsten Morgen 30 min bei 3.800 min⁻¹ zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Die Pellets wurden mit 70% Ethanol gewaschen und bei 55° getrocknet. Die DNA wurde in 100 µl TE-Puffer über Nacht bei 37°C und 100% relativer Luftfeuchte gelöst.

Die isolierte DNA jedes Klons wurde mit 20 U des Restriktionsenzym NdeI in einem Gesamtvolumen von 50 µl über Nacht bei 37°C verdaut. Die DNA-Lösungen wurden anschließend über Nacht auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und die Position des Markers fotografisch dokumentiert. Das Gel wurde für 10 min in 0,25 M HCl inkubiert, mit *A. dest.* gewaschen und für weitere 15 min in 0,4 M NaOH inkubiert. Die DNA wurde anschließend über Nacht durch Kapillarkräfte mit 0,4 M NaOH aus dem Gel auf eine Nylon-Membran geblottet und am nächsten Tag für 10 min in 2xSSC inkubiert. Danach wurde die Membran 2 h auf einem Filterpapier bei 80°C gebacken. Die Membran wurde dann in eine Hybridisierungsflasche gelegt und mit vorgewärmtem Hybridisierungspuffer und *Herring Sperm DNA* für 1 h bei 60°C gerollt. Anschließend wurden 2,5-5×10⁵ cpm radioaktiv markierte Sonde pro ml Hybridisierungsmix 5 min gekocht und in den Hybridisierungspuffer pipettiert. Der Hybridisierungsmix wurde über Nacht mit der Membran inkubiert. Die Membran wurde mit Puffer A und Puffer B jeweils so lange gewaschen, bis mit einem Handmonitor im Waschpuffer keine Aktivität mehr detektiert werden konnte. Die Hybridisierungssignale wurden mit Hilfe eines *Bioimagers* detektiert.

Die drei im Folgenden beschriebenen tierexperimentellen Arbeiten für die Herstellung der knock-out Mauslinie wurden in der UKE Core Facility ‚Transgene Tiere‘ von PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer und Sarah Homann durchgeführt.

Gewinnung von Blastozysten zur ES-Injektion

Schwangere Weibchen wurden an Tag 3,5 p. c. getötet, der Uterus entnommen und frei präpariert. Die Uterushörner wurden an ihren Enden aufgeschnitten und die enthaltenen Blastozysten mit KSOM/HEPES-Medium aus dem Uterus ausgespült. Die Blastozysten wurden unter Öl in kleinen Tropfen KSOM-Medium bei 37°C und 5% CO₂ bis zu ihrer Verwendung inkubiert.

Injektion von embryonalen Stammzellen in Blastozysten

Die zu injizierenden Blastozysten wurden auf eine Injektionsplatte in KSOM/HEPES-Medium überführt und dort mittels einer Haltekapillare fixiert. Etwa 20 der embryonalen Stammzellen wurden in eine Injektionskapillare aufgezogen und durch Durchstechen der *Zona Pellucida* und des Trophoblasts in die fixierte Blastozyste injiziert. Die Injektionskapillare wurde nach einer kurzen Verweildauer wieder entfernt und die injizierten Blastozysten bis zur weiteren Verwendung inkubiert.

Transfer der injizierten Blastozysten in scheinchwangere Ammen

Zum Transfer der Blastozysten wurden scheinchwangere Ammen verwendet, die drei Tage vor dem Eingriff mit vasektomierten – also sterilen – Böcken verpaart wurden. Für die Injektion wurden die Tiere narkotisiert, der Uterus durch einen seitlich angebrachten Schnitt aus der Bauchhöhle gezogen und dort fixiert. Pro Uterushorn wurden bis zu neun Blastozysten injiziert und der Uterus nach der Injektion wieder zurückgeschoben. Die Wunde wurde vernäht und darauf geachtet, dass die Maus während der Wirkdauer der Anästhesie nicht unterkühlt.

2.2.3. Tierexperimentelle Methoden

Die Tierhaltung und Handhabung von Versuchstieren innerhalb der Zuchtbarrieren (z. B. Wiegen und die Abnahme von Schwanzbiopsien) wurden von den Tierpflegerinnen und Tierpflegern der Versuchstierhaltung des UKE durchgeführt.

Genotypisierung anhand von Schwanzspitzenbiopsien

Zur Genotypisierung wurde wenige Tage alten Mäusen unter CO₂-Kurznarkose ein kurzes Stück der Schwanzspitze entnommen und dieses über Nacht bei 55°C in 150 bis 300 µl Proteinase K Lysispuffer lysiert. Eventuelle Restaktivität wurde durch zehnmündige Inkubation bei 95°C inhibiert. Die Lysate wurden anschließend per PCR analysiert.

Tamoxifen-Behandlung

Zur Induktion des konditionalen *Knock-outs* wurden Mäuse der entsprechenden Genotypen in Gruppen zu drei bis sechs Tieren über drei Wochen mit Tamoxifen-haltigem Spezialfutter gefüttert (1 g Tamoxifen pro kg Futter). Die Tiere wurden während und nach der Behandlung regelmäßig untersucht und ihr Gesundheitszustand anhand einer *Scoring*-Tabelle bewertet. Die gesamte Gruppe wurde spätestens dann für die entsprechende finale Untersuchung verwendet, sobald ein Tier einer Gruppe anhand dieser Bewertung getötet werden musste.

Kardiale Perfusion und histologische Analysen

Die kardialen Perfusionen und die Anfertigung sowie Mikroskopie histologischer Präparate wurden im Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg des UKE von Dr. Michaela Schweizer durchgeführt.

Die Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion von 1 µl Ketamin/Xylazin pro Gramm Körpergewicht narkotisiert. Die Narkosetiefe wurde durch den Zwischenzehenreflex überprüft. Daraufhin wurde der Bauchraum eröffnet und das Zwerchfell sowie der Brustkorb durchschnitten. Anschließend wurde eine Kanüle in den linken Herzventrikel eingeführt und mittels einer Klemme befestigt. Der rechte Vorhof wurde angeschnitten und der Blutkreislauf der Maus mit etwa 10 ml PBS gespült. Anschließend wurde das PBS durch das Fixativ (4% PFA in PBS) ersetzt und die Maus durch Spülen mit 50 ml des Fixativs fixiert. Der Maus wurden die benötigten Organe entnommen und bis zur Einbettung in Fixativ gelagert. Die in Paraffin eingebetteten Organe wurden geschnitten, auf Objektträger gezogen und für die Färbungen bzw. Immunhistochemie verwendet.

2.2.4. Molekularbiologische Methoden

RNA-Isolation

Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, in 1 ml TriFAST resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Suspension wurden 200 µl Chloroform beigemischt und anschließend 15 s geschüttelt. Nach 15 min Inkubation wurde weitere 15 min bei 4°C und 21.000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol, zehnmünütige Inkubation und erneute Zentrifugation ausgefällt. Das Pellet wurde zweimal in 75% Ethanol gewaschen und danach luftgetrocknet. Die RNA wurde in DEPC-Wasser aufgenommen und 10 min bei 55°C inkubiert. Anschließend wurde ihre Konzentration photometrisch bestimmt.

cDNA-Synthese / reverse Transkription

Für die Verwendung als Template in PCR-Experimenten wurde die RNA in cDNA umgeschrieben (reverse Transkription). Dazu wurden 1 µg RNA und 100 pMol Oligo(dT)₁₈-Primer mit nukleasefreiem *A. dest.* auf 12,5 µl aufgefüllt und mit 4 µl Reaktionspuffer, 20 U RNase-Inhibitor, 1 mM jedes dNTPs und 200 U Reverse Transkriptase auf 20 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Die Reaktion lief 1 h bei 42°C und wurde anschließend bei 70°C für 10 min gestoppt. Die cDNA konnte direkt für die RT-PCR verwendet oder musste für den Einsatz in der *real-time* RT-PCR mit 30 µl nukleasefreiem *A. dest.* (2:5) verdünnt werden.

PCR

Alle PCRs wurden mit nukleasefreiem *A. dest.* angesetzt und für jeden Mastermix als Negativkontrolle eine Wasserprobe (*non-template control*) sowie, wenn verfügbar, eine Positivkontrolle gefahren. Alle verwendeten Primer, deren Anlagerungstemperaturen (*Annealing*) und Elongationszeiten im verwendeten Puffer sind im Kapitel 2.1.12 angegeben.

Klonierungs-PCR

Pro PCR-Reaktion für Klonierungen wurden ca. 50 ng Template-DNA bzw. 4 µl eines unverdünnten cDNA-Ansatzes mit 10 µl 5-fach *high fidelity* Puffer, je 25 pMol des 5'- und 3'-*Primers*, 0,2 mM jedes dNTPs und 1 U Phusion DNA Polymerase gemischt und mit dH₂O auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wurde nach folgendem Programm amplifiziert:

| | Temperatur | Dauer | Anzahl Zyklen |
|------------------------|------------|---------------|---------------|
| Initiale Denaturierung | 98°C | 30 s | 1 |
| Denaturierung | 98°C | 10 s | |
| Anlagerung | Variabel | 15 s | 3 |
| Elongation | 72°C | 1 min/1000 bp | |
| Denaturierung | 98°C | 10 s | |
| Anlagerung | 65-68°C | 10 s | 32 |
| Elongation | 72°C | 30 s/1000 bp | |
| Finale Elongation | 72°C | 10 min | 1 |

Nach der Amplifikation wurde das PCR-Produkt auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt und die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem *Gel Extraction Kit* aufgereinigt und für die weitere Klonierung verwendet.

PCR-basierte Punktmutagenese

Als *Template* für die PCR-basierte Punktmutagenese wurde ein Expressionsvektor eingesetzt, der das zu mutierende Insert enthielt. Die *Primer* mussten für die Ligation des PCR-Produkts am 5'-Ende phosphoryliert sein, der *forward-Primer* enthielt das veränderte Triplet. Für die PCR-Reaktion wurden 10 pg der *Template*-DNA, 10 µl 5x *high fidelity* Puffer, 200 µM jedes dNTPs, je 0,5 µM der *Primer* sowie 1 U Phusion DNA Polymerase gemischt und mit dH₂O auf 50 µl aufgefüllt. Anschließend wurde nach folgendem Programm amplifiziert:

| | Temperatur | Dauer | Anzahl Zyklen |
|------------------------|------------|--------------|---------------|
| Initiale Denaturierung | 98°C | 30 s | 1 |
| Denaturierung | 98°C | 10 s | |
| Anlagerung | Variabel | 15 s | 25 |
| Elongation | 72°C | 30 s/1000 bp | |
| Finale Elongation | 72°C | 10 min | 1 |

Nach der Amplifikation wurden 5 µl der PCR-Reaktion mit 5 µl Quick Ligation Buffer und 0,5 µl Quick T4 DNA Ligase gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 5 µl des Ligationsansatzes in DH5α transformiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien durch Sequenzierung auf die induzierte sowie eventuell spontan aufgetretene, unerwünschte Mutationen untersucht.

Genotypisierungs-PCR

Pro Reaktion wurden 2 µl des Schwanzspitzenbiopsie-Lysats, 10 µl *DreamTaq Green PCR Master Mix* und je 7,5 pMol des 5'- und 3'-Primers gemischt, mit dH₂O auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und nach folgendem Programm amplifiziert:

| | Temperatur | Dauer | Anzahl Zyklen |
|------------------------|------------|-------|---------------|
| Initiale Denaturierung | 94°C | 1 min | 1 |
| Denaturierung | 94°C | 20 s | |
| Anlagerung | 58°C | 20 s | 35 |
| Elongation | 72°C | 1 min | |
| Finale Elongation | 72°C | 5 min | 1 |

Der Genotyp jeder Maus wurde anhand mehrerer PCR-Ansätze bestimmt, die je nach Verpaarung individuell zusammengestellt wurden. Die Auswertung erfolgte durch Auftrennung über ein 1%-iges Agarose-Gel und anschließende Visualisierung durch Ethidiumbromidfärbung und UV-Licht.

Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden im Anschluss an die Amplifikation in die Taschen eines 1%-igen Agarose-Gels pipettiert, je nach Elektrophoresekammer bei 80 V bis 120 V aufgetrennt und mittels Ethidiumbromidfärbung und UV-Licht visualisiert. Die im Gel enthaltene DNA wurde, nach Fragmentlängen getrennt, in Form von Banden sichtbar. Anhand der Lauflänge und eines Größenmarkers (DNA-Leiter) konnten die einzelnen Fragmentlängen bestimmt werden. DNA-Banden, die für Klonierungen weiterverwendet werden sollten, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem *Gel Extraction Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Real-time RT-PCR

2,5 µl eines verdünnten cDNA-Ansatzes (siehe Abschnitt *cDNA-Synthese / reverse Transkription*) wurden pro Replikat mit 12,5 µl *Maxima SYBR Green Master Mix*, je 4 pMol des 5'- und 3'-Primers bzw. 2,5 µl des *Primermixes* gemischt und mit dH₂O auf 25 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Pro Ansatz und Gen wurden drei Replikate, pro Referenzgen zwei bis drei Replikate angesetzt. Die Amplifikation und gleichzeitige Datenerhebung erfolgte im *real-time Thermocycler* mit folgendem Programm:

| | Temperatur | Dauer | Anzahl Zyklen |
|------------------------|-------------|--------------|---------------|
| Initiale Denaturierung | 95°C | 3 min | 1 |
| Denaturierung | 95°C | 15 s | |
| Anlagerung | 57°C | 30 s | 40-42 |
| Elongation | 72°C | 30 s | |
| Schmelzkurve | 50°C → 95°C | 20 s/Schritt | 1 |

Die erhaltenen Daten für jedes Gen und jede Probe wurden anhand des jeweiligen Referenzgens nach der $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ -Methode normalisiert und ausgewertet¹¹⁶.

Heat-shock* Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli

Pro Transformation wurden 50 µl DH5α in einem 1,5 ml Reaktionsröhrchen auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit bis zu 50 ng DNA (oder maximal 5 µl DNA-Lösung) gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der *heat-shock* für 20 s bei 42°C. Die Suspension wurde erneut 2 min auf Eis inkubiert und 250 µl S.O.C. Medium zugefügt. Die Bakterien wurden nun eine Stunde bei 37°C geschüttelt, 3 min bei 1.000 g abzentrifugiert und in 100 µl des Überstandes resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend auf einer Agar-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Max. 100 ng oder 1 µl DNA wurden in ein Reaktionsröhrchen pipettiert und auf Eis gekühlt. Elektrokompente Bakterien (z. B. DH10B) wurden auf Eis aufgetaut und 20 µl der Suspension vorsichtig in das vorbereitete Röhrchen gegeben. Bakterien und DNA wurden vorsichtig gemischt, in eine gekühlte 0,1 cm Küvette überführt und mit folgenden Parametern elektroporiert: Spannung: 2.0 kV, Widerstand: 200 Ω, Kapazität: 25 µF. Die Bakterien wurden zügig in 1 ml S.O.C. aufgenommen und 1 h bei 37°C geschüttelt. 200 µl der Bakteriensuspension wurden dann auf einer Agar-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini-Prep)

2 ml einer Übernachtskultur wurden zentrifugiert (1 min, 20.000 g) und das Pellet in 100 µl der Lösung I resuspendiert. Zur Lyse wurden 200 µl Lösung II zugegeben, gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden durch Zugabe von 150 µl Lösung III neutralisiert und weitere 5 min inkubiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 1 ml Ethanol gefällt und 10 min bei 20.000 g pelletiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und

in 50 bis 100 μl *A. dest.* aufgenommen. Die DNA-Konzentration konnte anschließend photometrisch ermittelt werden.

Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Maxi-Prep)

250 ml einer Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 5.000 g pelletiert und unter Verwendung des *PureYield Plasmid Maxiprep System-Kits* nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNA wurde mit 1 ml *A. dest.* von der *Binding Column* gelöst und die DNA-Konzentration der Lösung anschließend photometrisch bestimmt.

Phenol-Chloroform-Aufreinigung von Plasmiden

Die DNA-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und sorgfältig gemischt. Die entstandene Lösung wurde 1 min bei 20.000 g getrennt und die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die enthaltene DNA durch Zugabe von einem Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat (pH 7,8) und drei Volumina Ethanol für 5 min bei -80°C präzipitiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (20.000 g, 5 min, 4°C) pelletiert und einmal mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde unter sterilen Bedingungen luftgetrocknet und in sterilem *A. dest.* bzw. dem benötigten Puffer (TE bzw. PBS) gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch.

Klonierung von Plasmiden

Die amplifizierten und aufgereinigten DNA-Fragmente (Inserts) sowie die Zielplasmide wurden mit den benötigten Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben in 100 μl -Ansätzen geschnitten und mittels des *PCR Purification Kits* aufgereinigt. Die DNA-Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt, 20 bis 50 ng des vorbereiteten Plasmids mit der dreifachen Molekülmenge des Inserts, 2 μl T4 DNA Ligase Puffer sowie 1 U T4 DNA Ligase (bzw. 5 U im Fall einer *blunt end* Ligation) gemischt und mit dH_2O auf 20 μl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 5 μl der Reaktion in DH5 α -Zellen transformiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die enthaltene Plasmid-DNA wurde aufgereinigt (siehe *Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien*) und die DNA anhand eines Restriktionsverdau und Sequenzierung auf die korrekte Insertion und eventuelle Mutationen des klonierten Gens untersucht.

2.2.5. Proteinbiochemische Methoden

Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung für Western Blot

Zellen wurden auf Eis mit 0,3 bis 1 ml SDS-Lysispuffer pro 10 cm Schale bzw. ca. 10^7 Zellen für 10 min lysiert und das Lysat anschließend 15 min bei 20.000 g und 4°C geklärt. Zur Konzentrationsbestimmung mit BCA wurde das Lysat sowie eine BSA-Standardreihe 1:20 mit dem BCA *working reagent* versetzt und die Extinktion nach einer 30-minütigen Inkubation (37°C) bei 562 nm photometrisch gemessen. Zur Auswertung wurde die Extinktion einer Blank-Probe von den anderen Messwerten subtrahiert und die Konzentrationen der Proteinlysate anhand der Standardreihe errechnet.

Western Blot

Die benötigte Proteinmenge jeder Probe wurde mit Lysispuffer auf das gleiche Volumen aufgefüllt und mit 5x Ladepuffer sowie DTT versetzt. Die Taschen eines 10%-igen Acrylamidgels wurden jeweils mit einem Größenstandard bzw. den Proben gefüllt und die Proteine bei 120 V aufgetrennt (PAGE). Anschließend wurden die Proteine bei 60 mA/Gel auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und freie Proteinbindstellen der Membran eine Stunde in Blockierlösung (5% Milchpulver bzw. 3% BSA in PBS-T) abgesättigt. Danach wurde die Membran mit dem Erstantikörper in frischer Blockierlösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal 10 min mit PBS-T gewaschen und eine Stunde mit dem Sekundärantikörper in PBS-T inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten wurde das Signal durch Zugabe eines Chemilumineszenzsubstrats und Exposition von Röntgenfilm oder einer CCD-Kamera gemessen und quantifiziert.

Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung für die 2D-PAGE

Die Zellen wurden durch Trypsin/EDTA von der Schale gelöst bzw. zentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und in ca. 0,5 ml Urea-Puffer 15 min bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurde das Lysat bei 20.000 g 15 min geklärt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur Konzentrationsbestimmung mit der Bradford-Methode wurden 30 µl jeder Probe sowie einer BSA-Standardreihe mit 30 µl 0,1 M HCl und 240 µl *A. dest.* gemischt. 25 µl dieser Lösung wurden mit 875 µl Bradford-Reagenz (1:5 in *A. dest.*) gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde zur Erstellung einer Standardreihe die Absorption der Standardreihe und anschließend der Proben bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde vom Photometer anhand der Standardreihe automatisch ermittelt.

Mini-2D Western Blot

Pro Mini-2D Western Blot wurden 20 µg Protein mit Urea-Puffer auf 125 µl aufgefüllt und damit ein 7 cm pH 4-7 *Strip* über Nacht rehydriert. Am nächsten Tag wurden die Proteine entlang des auf dem *Strip* bestehenden pH-Gradienten anhand ihres isoelektrischen Punkts (IEP) aufgetrennt (1. Dimension). Dazu wurde folgendes Programm eingestellt: Fokustemperatur 20°C, maximale Spannung 50 µA/Gelstrip. Zunächst 500 V für 30 min, dann 5000 Vh linear, gefolgt von 5000 Vh *rapid* und schließlich 2 h bei 500 V. Die *Strips* konnten im Laufe des letzten Schrittes entnommen und weiter verwendet werden. Anschließend wurden die *Strips* mit 1% DTT in Urea-Puffer 15 min äquilibriert und weitere 15 min mit 4,8% Iodacetamid alkyliert. Je ein *Strip* sowie ein mit Proteinmarker getränktes Filterpapier wurden auf ein 10%-iges Trenngel aufgelegt und mit gerade noch flüssiger, 0,5%-iger Agaroselösung aufgefüllt, die zur Visualisierung der Lauffront mit etwas Bromphenolblau versetzt war. Zur Auftrennung anhand des Molekulargewichts wurden 120 V angelegt, bis die Lauffront gerade aus dem Gel herausgelaufen war (2. Dimension). Die weiteren Schritte entsprachen den im Abschnitt *Western Blot* beschriebenen.

³H-Spermidin Einbau

Der ³H-Spermidin Einbau wurde von Michael Preukschas im Isotopenlabor des Campus Forschung (UKE) durchgeführt.

10⁷ Zellen der Linie Ba/F3 p210 wurden in 25 cm² T-Flaschen kultiviert. Dem Medium wurde 75 µCi ³H-Spermidin zugegeben und die Zellen 48 h später in SDS-Lysispuffer lysiert. Die Lysate wurden zentrifugiert (20.000 g, 4°C, 15 min) und die Proteinkonzentration mittels BCA ermittelt. 200 µg Protein wurden durch Zugabe eines Zehntel Volumens 100%-iger Trichloressigsäure (TCA) und 5-minütiger Inkubation bei -20°C, gefolgt von 15 min bei 4°C, gefällt. Die Proteine wurden zentrifugiert (5 min, 16.000 g) und zweimal mit 1 ml 10% TCA gewaschen, dem zusätzlich 1 mM Spermidin und Spermin beigemischt worden waren. Das Protein wurde in SDS-Lysispuffer resuspendiert und bei 95°C vollständig denaturiert. Die Proteinlösung wurde über 12% Bis-Tris *NuPage* Gele aufgetrennt und Coomassie-gefärbt. Die gefärbten Gele wurden für die spätere Ladekontrolle dokumentiert, entfärbt und für 1 h in EN3HANCE-Lösung inkubiert. Die Gele wurden bei 60°C vakuumgetrocknet und Röntgenfilme bei -80°C einen bis drei Monate darauf exponiert. Die Filme wurden anschließend entwickelt und mit einem GS-800 Densitometer digitalisiert.

2.2.6. TAP-Assay und Identifizierung von Protein-Protein Interaktionen durch massenspektrometrische Analyse

Tandemaffinitätsaufreinigung (*Tandem affinity purification, TAP*)

Alle Aufreinigungsschritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden auf Eis vorgekühlt. Eine schematische Darstellung der Arbeitsschritte ist in Abbildung 2.5 dargestellt.

Zur Aufreinigung wurden bis zu 10^{10} Zellen in PBS gewaschen und in 1 ml TAP-Lysispuffer pro $2-5 \times 10^7$ Zellen 15 min lysiert. Das Lysat wurde durch Ultrazentrifugation bei 48.000 g für

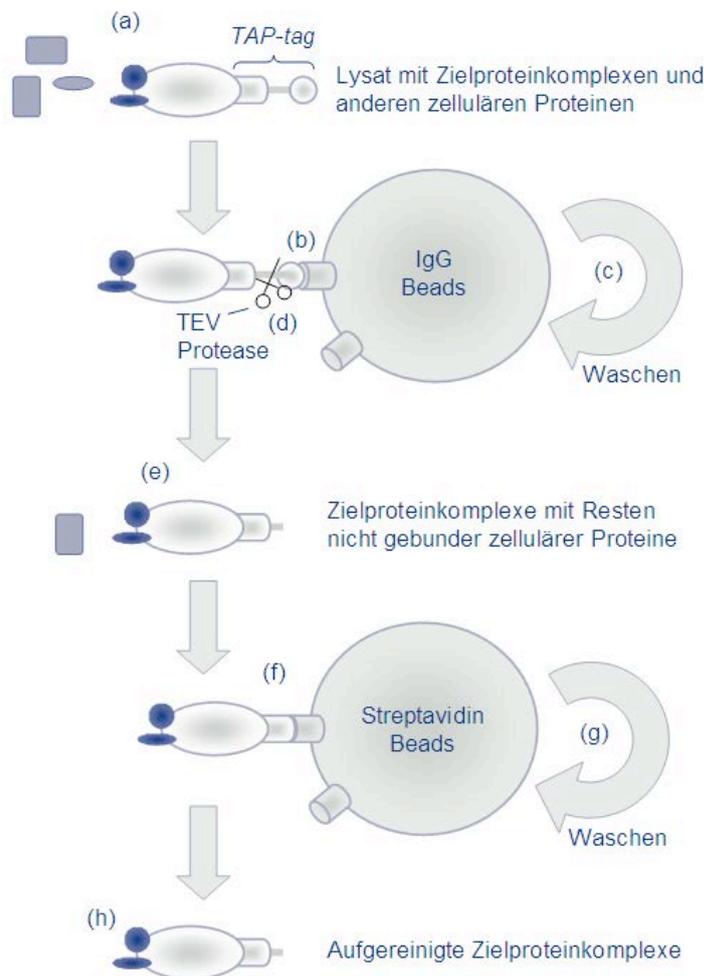


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Tandemaffinitätsaufreinigung (TAP). Lysate von retroviral mit einem TAP-Expressionskonstrukt transduzierten Zellen werden nach der Lyse **(a)** mit IgG-Beads inkubiert **(b)**, gewaschen **(c)**, und die das Zielprotein enthaltenden Proteinkomplexe durch TEV-Verdau spezifisch eluiert **(d)**. Nach der Inkubation des Eluats **(e)** mit Streptavidin-Beads **(f)** und erneutem Waschen **(g)** kann das aufgereinigte Zielprotein und die daran bindenden Proteine und Proteinkomplexe durch Aufkochen in SDS-Puffer eluiert werden **(h)**.

45 min geklärt (Abb. 2.5a). Proben, die später massenspektrometrisch analysiert werden sollten, wurden anschließend in zwei gleiche Teile aufgeteilt und separat aufgereinigt sowie analysiert. Auf diese Weise wurden technische Replikate der gesamten TAP-MS/MS Prozedur hergestellt. Der Überstand wurde 2 h mit 1 ml IgG Sepharose *Beads* pro 10^{10} eingesetzter Zellen inkubiert (Abb. 2.5b). Die *Beads* wurden anschließend drei Mal in Lysispuffer und drei Mal in TEV-Reaktionspuffer gewaschen (Abb. 2.5c). Danach wurde das SG-Tag durch dreistündige Inkubation mit 100 U acTEV-Protease pro 100 μ l *Beads* geschnitten (Abb. 2.5d) und der Überstand (Abb. 2.5e) erneut eine Stunde mit 750 μ l Streptavidin Sepharose *Beads* pro

10^{10} eingesetzte Zellen inkubiert (Abb. 2.5f). Die *Beads* wurden drei Mal mit TEV-Reaktionspuffer gewaschen (Abb. 2.5g), die gebundenen Proteinkomplexe durch kurzes Aufkochen in SDS-Lysispuffer denaturiert und in Lösung gebracht (Abb. 2.5h).

Die Proteinproben für die massenspektrometrische Analyse wurden auf einem 10%-igen Acrylamidgel über eine Länge von 2 bis 4 cm aufgetrennt und pro Spur in 8 bis 10 Einzelproben geschnitten.

Abbildung 2.6 zeigt einen repräsentativen Western Blot von Aliquots eines eIF-5A1 (SG)-TAP, die zur späteren Überprüfung der Aufreinigung nach allen Schritten des TAP-Protokolls genommen wurden.

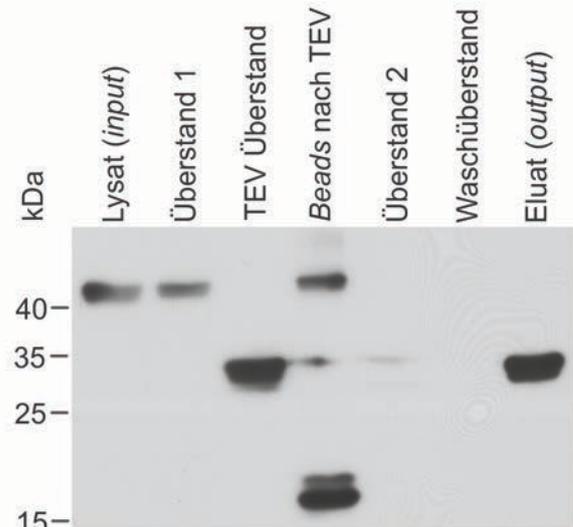


Abbildung 2.6: Repräsentativer Western Blot mit Zwischenschritten der TAP-Aufreinigung. Von den einzelnen Schritten der TAP-Aufreinigung von eIF-5A1 aus ca. 5×10^8 Zellen der Linie BaF/3 p210 eIF-5A1 (SG) wurden jeweils 1% bis 5% der Gesamtmenge abgenommen und das aufgereinigte eIF-5A1 (SG) anhand des *TAP-Tags* mit dem Anti-Myc-Tag Antikörper im Western Blot detektiert. Die Verschiebung zu einem kleineren Molekulargewicht wird durch die spezifische Elution von der IgG-Bead Matrix mittels der TEV-Protease verursacht.

Massenspektrometrie

Die Analyse der Proben erfolgte am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universitätsmedizin Greifswald und wurde dort von Dr. Simone Venz, Dr. Vishnu Dhople sowie weiteren wissenschaftlichen Mitarbeitern durchgeführt.

Die Proteine wurden im Gel über Nacht bei 37°C mit 20 ng/μl Trypsin in 20 mM Ammoniumbicarbonat verdaut und anschließend mit 50% Acetonitril in 0,1% Essigsäure extrahiert. Der Überstand wurde getrocknet und die Peptide erneut in 10 μl 2% Acetonitril in 0,1% Essigsäure gelöst. Die Lösungen wurden dann am FTICR Massenspektrometer analysiert.

Die erhaltenen Daten wurden mit der Software Scaffold 3.00.07 (Proteome Software, Portland, OR) analysiert. Der Grenzwert für identifizierte Peptide wurde auf 95%, Sequest ΔC_n Scores größer als 0,1 und XCorr Scores größer als 2,3 für zweifach sowie 3,8 für dreifach und vierfach geladene Peptide eingestellt. Der Grenzwert für identifizierte Proteine wurde ebenfalls auf 95% und mindestens zwei Peptide eingestellt.

Alle identifizierten Proteine wurden zweifach gefiltert: Zunächst wurden alle Proteine entfernt, die nicht in beiden technischen Replikaten eines *Bait*-Proteins gefunden wurden. Weiterhin wurden Proteine, die durch Identifikation in eGFP-CTAP Eluaten als ‚Matrix-Proteom‘ markiert waren, ebenfalls aus allen anderen Listen entfernt (vgl. Kapitel 3: ‚Ergebnisse‘).

2.2.7. Zellbiologische Methoden

Protein fragment complementation assay (PCA)

Durch den PCA können Protein-Protein Interaktionen (PPI) in lebenden Zellen nachgewiesen, zellulären Strukturen zugeordnet und quantifiziert werden. Für den PCA werden zwei Expressionskonstrukte kotransfiziert, die je ein Fusionsprotein kodieren, deren Interaktion nachgewiesen oder analysiert werden soll. Jedes der Proteine ist mit einem Fragment des *yellow fluorescent protein* (YFP) fusioniert, dem N-terminalen und dem C-terminalen Teil¹⁰⁸ (YFP₁ und YFP₂).

Am Tag vor der Transfektion wurden 10^5 NIH3T3-Zellen pro Well einer 24-Well Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden pro Ansatz 3 µg Plasmid-DNA sowie 6 µl Lipofectamin 2000 separat in je 50 µl OptiMem I Medium gelöst und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die beiden Lösungen wurden gemischt und weitere 20 min inkubiert. Währenddessen wurde das Zellmedium durch 0,5 ml frisches Adhäsionszellmedium ohne Antibiotika getauscht und die Transfektionslösung dazugegeben. Die Zellen wurden daraufhin 5 h bei 37°C inkubiert und das Medium erneut gewechselt. Die Auswertung erfolgte nach etwa 24 h durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sowie durchflusszytometrische Analyse der transfizierten Zellen. Alle Transfektionen wurden in Duplikaten durchgeführt und mindestens einmal wiederholt.

Zellzyklusanalyse durch Propidiumiodid (PI)-Färbung

Für die Zellzyklusanalyse nach Ricardi und Ricoletti¹¹⁷ wurden $1-2 \times 10^6$ Zellen in 1 ml PBS gewaschen und zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 500 µl PBS resuspendiert und durch Zugabe von 4,5 ml kaltem, 70%-igem Ethanol fixiert.

Nach erneutem Waschen der Zellen mit kaltem PBS wurde das Pellet wieder in 500 µl PBS aufgenommen und weitere 500 µl DNA *extraction buffer* zugefügt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen zentrifugiert und in 1 ml DNA *staining solution* resuspendiert. Die Suspension wurde mindestens 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch ausgewertet.

2.2.8. Bioinformatische Methoden

Die bei der massenspektrometrischen Analyse der TAP-Eluate identifizierten Proteine wurden wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben durch Datenbankabfragen annotiert und weiter analysiert. Dabei wurden folgende Datenbanken verwendet:

| Name | URL | Version |
|----------------------------|--|------------------|
| STRING ¹¹⁸ | http://string-db.org/ | 9.0 |
| IntAct ¹¹⁹ | http://www.ebi.ac.uk/intact/ | 3.1 |
| GeneMANIA ¹²⁰ | http://www.genemania.org/ | nicht zutreffend |
| Uniprot ¹²¹ | http://www.uniprot.org/ | nicht zutreffend |
| Panther ^{122,123} | http://pantherdb.org/ | 7.0 |
| IPA | http://www.ingenuity.com/index.html (Login benötigt) | 9.0 |
| OMA browser ¹²⁴ | http://omabrowser.org/cgi-bin/gateway.pl | Nov 2010 |

Die Vorbereitung des Netzwerkes in tabellarischer Form aus den Daten der Massenspektrometrie erfolgte in Microsoft Excel 2003, dessen Visualisierung und Analyse wurde durch den Import der Tabelle in die Software Cytoscape 2.8.1¹²⁵ und durch Verwendung der dafür erhältlichen Erweiterung ClusterONE 0.92[‡] durchgeführt.

2.2.9. Statistische Auswertungen

Die in Diagrammen angegebenen Werte sind in den jeweiligen Bildunterschriften erläutert. Generell wurden Messwerte in der Software GraphPad Prism 5 statistisch ausgewertet und grafisch dargestellt. Wenn im Text der Bildunterschriften nichts anderes angegeben ist, zeigen alle Diagramme die Mittelwerte (Säulen) und den Standardfehler (Fehlerbalken) der jeweiligen Werte. Die statistische Analyse erfolgte je nach Struktur der Daten durch den *Student's T-Test* bzw. *one-way* oder *two-way ANOVA* mit dem jeweils passenden *post-test*. Die jeweils verwandte Methode ist in den Bildunterschriften angegeben.

PCA-Kombinationen wurden in Duplikaten parallel zu den entsprechenden Kontrollen verwandt. Alle Messungen wurden in mindestens einem unabhängigen Versuch reproduziert und somit für jede Kombination mindestens vier Messwerte erhalten. Die Werte aller zusammengehörenden und parallel durchgeführten Kombinationen (Wildtyp und Mutanten derselben eIF-5A Isoform) wurden durch *one-way ANOVA* mit dem Dunnett oder Bonferroni *post-test* statistisch analysiert. Dabei wurden sowohl die Unterschiede zur Negativkontrolle

[‡] Bisher ist zu ClusterONE keine Publikation erschienen. Die Dokumentation und der Quellcode der Software sind unter <http://www.paccanarolab.org/software/cluster-one/index.html> verfügbar.

(MCFD2) als auch die der normalisierten Werte parallel durchgeführter Kombination untereinander untersucht.

Generell wurden Unterschiede mit einem p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant bewertet. Die p-Werte wurden wie folgt dargestellt: Nicht signifikant (n. s.) oder keine Markierung für $p \geq 0,05$, * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$.

3. Ergebnisse

Die folgenden in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Teilerperimente wurden in Kooperationsarbeiten durchgeführt. Daher sollen hier an zentraler Stelle erneut diejenigen Wissenschaftler namentlich Erwähnung finden, die diese Experimente ganz oder teilweise durchgeführt haben:

- *Alle Arbeiten mit embryonalen Stammzellen und Blastozysten, von der Kultivierung und Elektroporation über das Screening per Southern Blot bis zur Injektion und dem Transfer der Blastozysten in Ammentiere wurden von PD Irm Hermans-Borgmeyer und Sarah Homann in der UKE Core Facility ‚Transgene Tiere‘ oder mit Eigenbeteiligung unter ihrer Anleitung durchgeführt. Dies ist jeweils auch bei den Beschreibungen der einzelnen Methoden in Kapitel 2 angegeben.*
- *Die Tierhaltung und Handhabung von Versuchstieren innerhalb der Zuchtbarrieren (z. B. Wiegen und Abnahme von Schwanzbiopsien) wurden von Susanne Conrad, Ivonne Deutschmann, Marina Schröder sowie anderen Tierpflegerinnen und Tierpflegern der Versuchstierhaltung des UKE durchgeführt.*
- *Die kardiale Perfusion und die anschließenden histologischen Untersuchungen der KO-Tiere wurden von Dr. Michaela Schweizer in der UKE Core Facility ‚Morphologie‘ durchgeführt.*
- *Der Einbau radioaktiv markierten Spermidins zum Nachweis der Hypusinmodifikation wurde von Michael Preukschas im Isotopenlabor des Campus Forschung (UKE) durchgeführt.*
- *Die Kultivierung der Zellen im Bioreaktor wurde von Oscar Platas-Barradas und Martin Schaletzky an der Technischen Universität Hamburg-Harburg (TUHH) durchgeführt.*
- *Die massenspektroskopischen Analysen wurden von Dr. Simone Venz und Dr. Vishnu Dhople sowie weiteren wissenschaftlichen Mitarbeitern am Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie an der Universität Greifswald durchgeführt.*

Das Protein eIF-5A wurde in verschiedenen Arbeiten als potentielle Zielstruktur zur Entwicklung neuartiger Therapien für verschiedene Krankheiten, darunter Krebs, AIDS und Diabetes identifiziert^{61,126,127} (vgl. Abschnitt 1.2). Um das tatsächliche therapeutische Potential sowie seine zellbiologischen Grundlagen zu bestimmen, ist ein detailliertes

Verständnis der molekularen Mechanismen der eIF-5A-Funktion und der Auswirkung seiner Inhibition für den Säugerorganismus Voraussetzung. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Modelle hergestellt und charakterisiert, die zur Schaffung dieser Voraussetzung beitragen sollen (vgl. Abb. 1.3):

Um eine *in vivo* Funktionsanalyse der Hypusinmodifikation im Säugetiermodell zu ermöglichen, wurde eine konditionale *knock-out* (KO) Mauslinie für die Deoxyhypusin Hydroxylase etabliert. Dieses Modell erlaubt es, das *Dohh*-Gen mittels Expression der Cre-Rekombinase aus dem Mausgenom zu entfernen und so die Expression von DOHH vollständig zu verhindern.

Des Weiteren wurde im zweiten Teil der Arbeit ein Interaktionsnetzwerk der an der Hypusinmodifikation beteiligten Proteine eIF-5A1, eIF-5A2, DHS und DOHH hergestellt. Dieses Netzwerk soll dazu beitragen, die molekularen Mechanismen der Funktionsweise dieser Proteine sowie der Hypusinmodifikation besser zu verstehen. Zu diesem Zweck wurde eine hochsensitive Methode zur Ermittlung von Protein-Protein Interaktionen (PPI) etabliert – Bioreaktor-TAP-MS/MS – und auf diese Proteine angewandt. Die Zuverlässigkeit dieser Methode wurde durch verschiedene Kontrollexperimente überprüft. Die erhobenen Daten wurden durch Hilfsmittel der Bioinformatik zu einem Interaktionsnetzwerk erweitert und auf funktionelle Hinweise untersucht.

3.1. Herstellung eines konditionalen *knock-out* Mausmodells der Deoxyhypusin Hydroxylase

3.1.1. *Knock-out* Strategie und Herstellung des *Targeting*-Vektors

Im ersten Schritt der Herstellung des KO-Mausmodells für das *Dohh*-Gen musste ein *Targeting* Vektor entworfen und kloniert werden, in dem das loxP-markierte und mit einer Neomycin-Resistenz selektierbare Zielgen, von Homologiearmen flankiert, vorlag (Abb. 3.1). Für die Insertion der loxP und der Selektionskassette wurden die Introns zwischen den Exons eins und zwei sowie vier und fünf gewählt (Abb. 3.2). Durch Cre-Aktivität wurden somit die Exons zwei bis vier aus dem *Dohh*-Gen entfernt. Dabei wurden sowohl das in Exon 2 liegende Startcodon, sowie die kodierende Sequenz für 4 der 8 Eisen bzw. das Substrat koordinierenden Aminosäuren⁷⁴ entfernt (Abb. 3.3). Eine genauere Analyse der verbleibenden Gensequenz ergab, dass das erste potentielle Startcodon des einzigen in 3'-Richtung der Deletion verbleibenden Exons 5 außerhalb des Leserahmens liegt und das erste Startcodon im Leserahmen die Aminosäure Met₂₃₈ kodiert. Selbst wenn die mRNA des Cre-rekombinierten Gens ab Met₂₃₈ translatiert werden sollte, fehlten dem dabei entstehenden C-terminalen

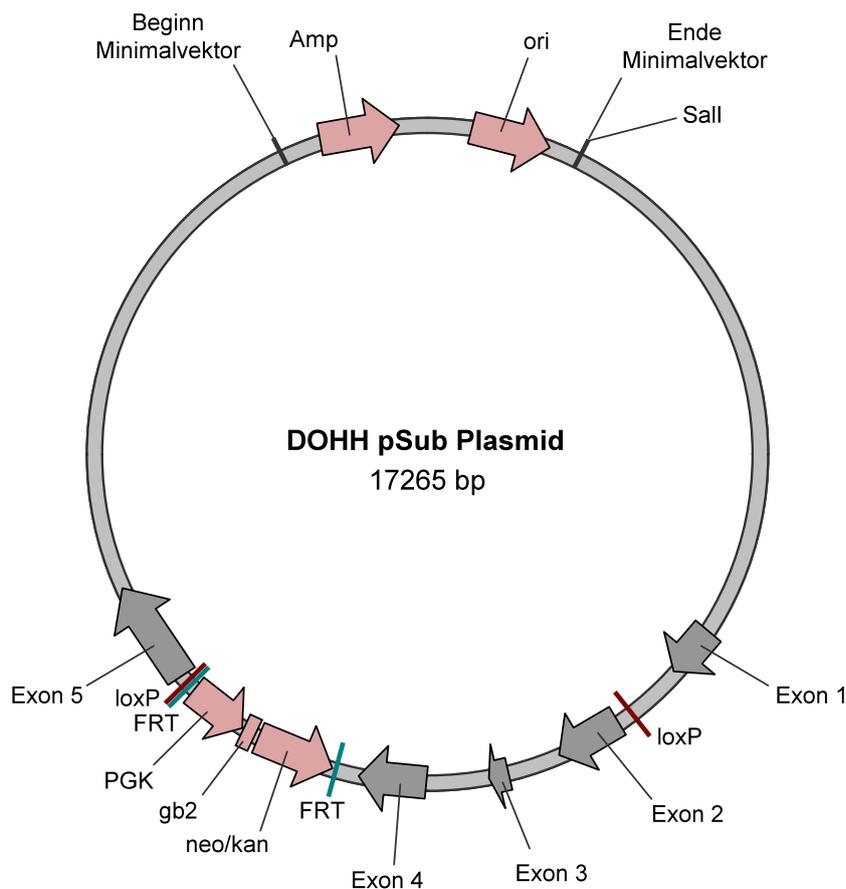


Abbildung 3.1: Darstellung des *Dohh*-KO Minimalvektors. Das *Dohh*-Gen wurde mit mehreren kb flankierender 3'- und 5'-Sequenz aus dem BAC heraus in einen Minimalvektor rekombiniert und dort mit einer loxP-Sequenz im Intron 1-2 und einer Selektionskassette in Intron 4-5 versehen. Die Sall Schnittstelle wird zur Linearisierung des Konstrukts für die homologe Rekombination in embryonale Stammzellen benötigt.

enthaltendes *bacterial artificial chromosome* (BAC) identifiziert (RP23-372F16) und von einer zentralen Bezugsquelle angefordert (siehe Abschnitt 2.1.9). Zunächst wurde per PCR mit *Dohh*-spezifischen Primerpaaren eine etwa 2,3 kb große Teilsequenz des *Dohh*-Gens amplifiziert. Abbildung 3.4 zeigt eine Aufnahme des per Gelelektrophorese aufgetrennten PCR-Produkts. Die *Dohh*-Sequenz schien demnach wie erwartet in der BAC-Sequenz enthalten zu sein. Um dies zu belegen und die Sequenz auf zufällig aufgetretene Mutationen zu überprüfen, wurde die *Dohh*-Sequenz auf dem BAC vollständig sequenziert. Dafür wurden elf Primer entworfen (siehe Tabelle 1 in Abschnitt 2.1.12). Abbildung 3.5 zeigt die erreichte Sequenzabdeckung des *Dohh*-Gens auf dem BAC RP23-372F16. Es ist zu sehen, dass der überwiegende Teil der Sequenz doppelt sequenziert wurde. So konnten fehlerhafte Sequenzierungsergebnisse von tatsächlichen Mutationen unterschieden werden. Da der trans-

Fragment DOHH₂₃₈₋₃₀₂ zwei weitere koordinierende Aminosäuren (6/8). Es wurde gezeigt, dass jede einzelne dieser Aminosäuren für die DOHH-Funktion essentiell war⁷⁴. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die verbleibende Gensequenz kein Protein mehr kodiert, das über DOHH-Aktivität verfügt.

Um die genomische Zielsequenz manipulieren zu können, wurde mittels des *Mus musculus* CloneFinder des National Center for Biotechnology Information (NCBI)[§] ein diese ent-

[§] erreichbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/mvhome/mvclone.cgi?taxid=10090>

latierte Bereich des Gens sowie die für das *Targeting* vorgesehenen Bereiche der Annotation der *Ensembl*-Datenbank** entsprachen, wurde das BAC für die Herstellung der DOHH *knock-out* Maus benutzt.

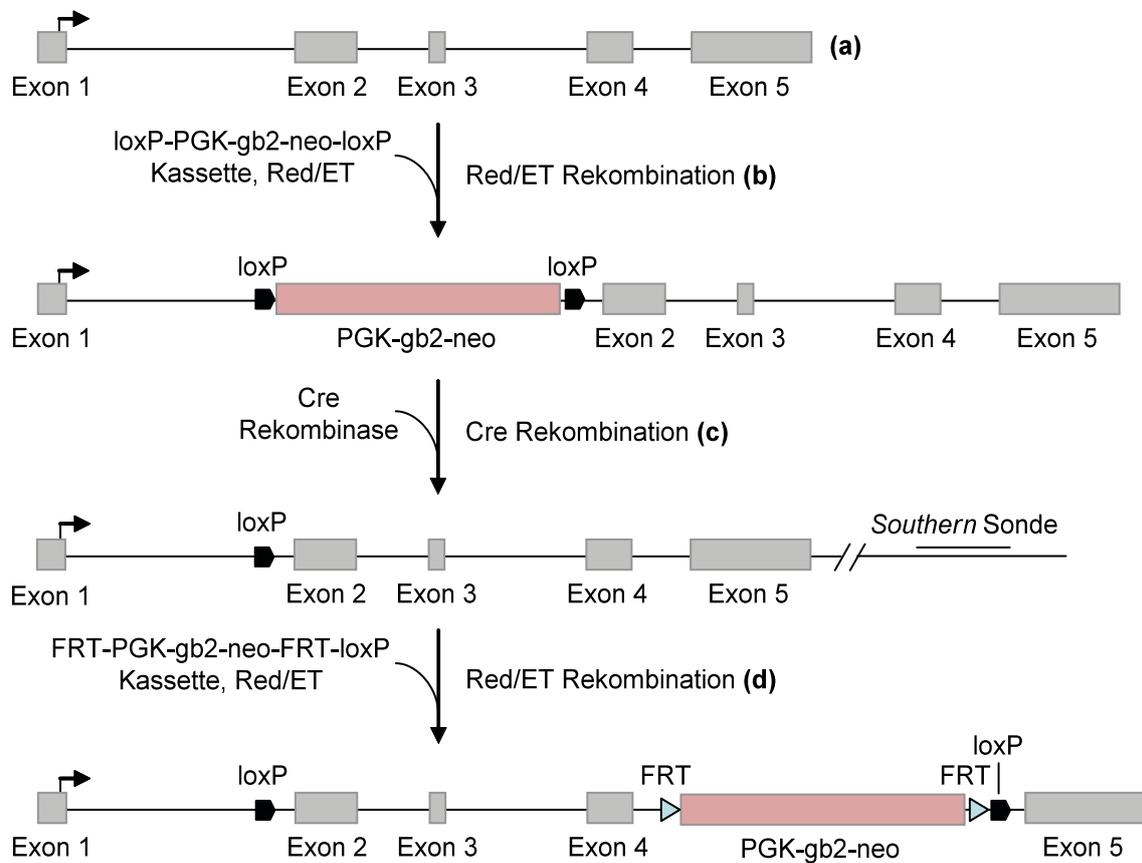


Abbildung 3.2: Strategie der Klonierung des *Dohh*-KO Konstruktes. Nach der Rekombination in den Minimalvektor wird in das *Dohh*-Gen (a) innerhalb des Introns 1-2 durch Red/ET-Rekombination eine *loxP*-PGK-gb2-neo-*loxP* Kasette eingesetzt (b). Durch Expression der Cre-Rekombinase wird diese anschließend wieder entfernt, zurück bleibt eine einzelne *loxP*-Sequenz (c). In dieses Konstrukt wird im Intron 4-5 eine weitere Kasette (FRT-PGK-gb2-neo-FRT-*loxP*) kloniert (d). Die eingezeichnete, für den späteren *Southern* Blot eingesetzte Sonde ist zur genomischen Sequenz in 3'-Richtung außerhalb der im Minimalvektor enthaltenen flankierenden Sequenz komplementär.

Das *Dohh*-Gen konnte nun mittels Red/ET-Rekombination aus dem BAC in einen Minimalvektor umklont werden, der aufgrund der deutlich geringeren Gesamtlänge sowie einer höheren Kopienzahl in Bakterien leichter handhabbar war. Dafür wurde der Minimalvektor, bestehend aus einem Replikationsursprung und einem Ampicillin-Resistenzgen, per PCR amplifiziert. Dabei wurde dieser durch Verwendung geeigneter *Primer*-Oligonukleotide mit homologen Sequenzen versehen, die das *Dohh*-Gen flankieren und als Marker für die spätere Rekombination dienen. Das Amplifikat wurde anschließend mittels Red/ET-Rekombination

** <http://www.ensembl.org/>

in Bakterien mit dem BAC RP23-372F16 rekombiniert, um den Minimalvektor mit der Sequenz des *Dohh*-Gens zu erhalten (Abb. 3.2a - Herstellungsstrategie). Mittels anschließendem Restriktionsverdau konnte ein Klon identifiziert werden, der die korrekt rekombinierte Sequenz aufwies (Abb. 3.6).

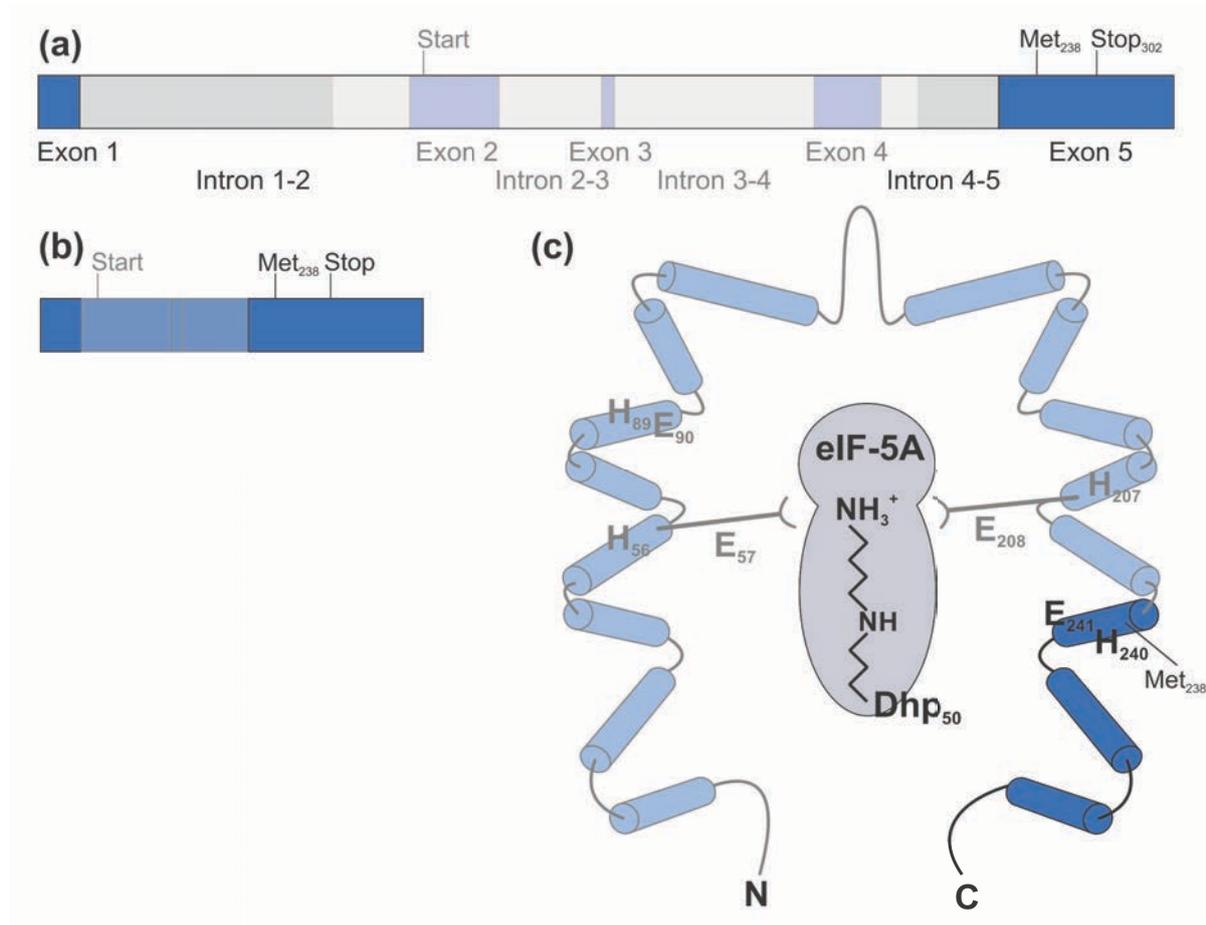


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der vom *Dohh* Knock-out betroffenen Bereiche. (a) Die loxP-Sequenzen innerhalb des *Dohh*-Gens vermitteln den Verlust der Exons 2 bis 4 (hell eingefärbte Bereiche). Die verbleibende Gensequenz (dunkel eingefärbte Bereiche) könnte im richtigen Leserahmen ab Met₂₃₈ abgelesen werden. (b) Darstellung der mRNA, analog zu (a). (c) Schematische Darstellung des DOHH-Proteins mit gebundenem Substrat (eIF-5A_{Dhp}). Die Positionen der für die Substratbindung (E₅₇, E₂₀₈) und die Koordination der Eisenionen (H₅₆, H₈₉, E₉₀, H₂₀₇, H₂₄₀ und E₂₄₁, Eisen nicht eingezeichnet) benötigten Aminosäuren sind ebenfalls eingezeichnet. Die hell eingefärbten Bereiche werden durch den KO entfernt. *Proteindarstellung verändert nach Kang et al.*⁷⁵.

Anschließend sollte eine loxP-Sequenz in das Intron 1-2 des *Dohh*-Gens integriert werden. Dafür wurde zunächst eine loxP-PGK-gb2-neo-loxP Selektionskassette an den Zielort kloniert. Dies geschah ebenfalls durch Red/ET-Rekombination (Abb. 3.7, Abb. 3.2b). Um die Selektionskassette wieder zu entfernen und nur die benötigte loxP-Sequenz zurück zu lassen, wurde die Selektionskassette durch Expression der Cre-Rekombinase entfernt (Abb. 3.8, Abb. 3.2c). Zuletzt musste noch eine weitere Selektionskassette in das Intron 4-5 integriert werden. Die Integration dieser Kassette wurde analog zur Integration der ersten Selektionskassette

durchgeführt (Abb. 3.9, Abb. 3.2d). Um das spätere Ausschneiden der Selektionskassette und damit die normale Expression des loxP-markierten *Dohh*-Gens zu ermöglichen, wurde eine loxP-FRT-PGK-gb2-neo-FRT Kasette gewählt, von der nach Rekombination mit der Flp-Rekombinase nur eine loxP- sowie eine FRT-Erkennungssequenz zurückblieb (Abb. 3.10).

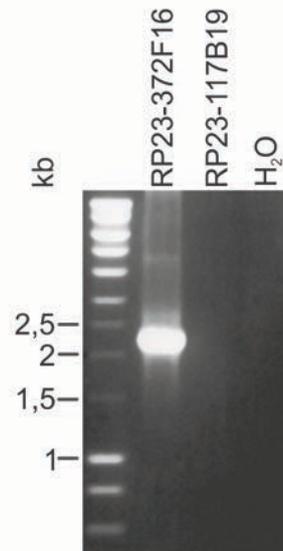


Abbildung 3.4: PCR-Amplifikation mit für das *Dohh*-Gen spezifischen Primern im BAC RP23-372F16. Die PCR amplifiziert ein etwa 2,3 kb großes Fragment des *Dohh*-Gens. Im Gegensatz zu den Negativkontrollen (BAC mit genomischer Sequenz eines anderen Chromosoms sowie eine Wasserkontrolle) ist die entsprechende Bande deutlich zu erkennen.

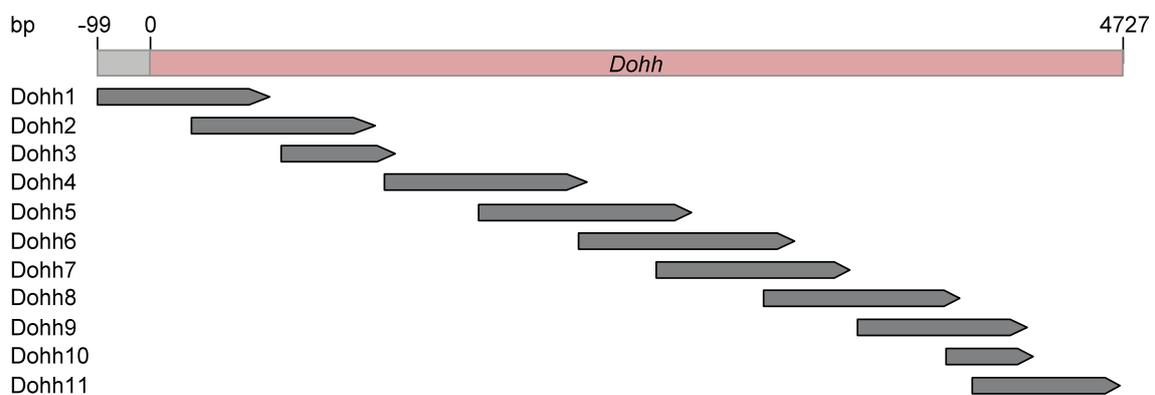


Abbildung 3.5: Sequenzabdeckung der Kontrollsequenzierung des *Dohh*-Gens vor Beginn der Klonierung des *Dohh*-KO Konstruktes. Die eingezeichneten Pfeile entsprechen den tatsächlich sequenzierten Bereichen unter Verwendung des angegebenen Primers.

Dieser Schritt fand jedoch erst in der Maus statt, da die in der Kasette enthaltene Neomycinresistenz während des weiteren Herstellungsprozesses als Marker für die Insertion in die embryonalen Stammzellen benötigt wurde.

Analog zu der Sequenzierung vor den Rekombinationsschritten wurde die gesamte DOHH-kodierende Sequenz, inklusive der neu integrierten Regionen, erneut sequenziert. Auch diesmal wurde ein Klon vollständig zweifach sequenziert und festgestellt, dass beide rekombinierten Sequenzen spezifisch integriert haben und dass die Exons des *Dohh*-Gens keine Veränder-

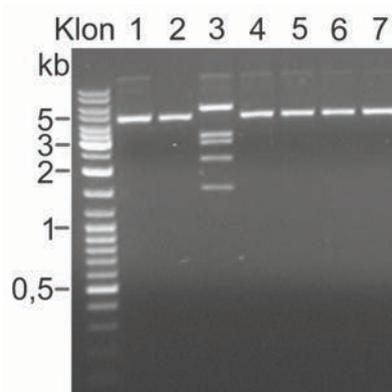


Abbildung 3.6: Screening von sieben Klonen des *Dohh*-Minimalvektors durch EcoRI-Restriktionsverdau. Das bei gewünschter Integration des *Dohh*-Gens in den Minimalvektor zu erwartende Bandenmuster (5,5/3,2/2,9/2,3/1,6 kb) ist in der Spur des Klons Nr. 3 zu sehen.

ungen zur in der Datenbank hinterlegten Sequenz aufweisen. Dieser sequenzierte Klon wurde für die folgenden Schritte verwendet.

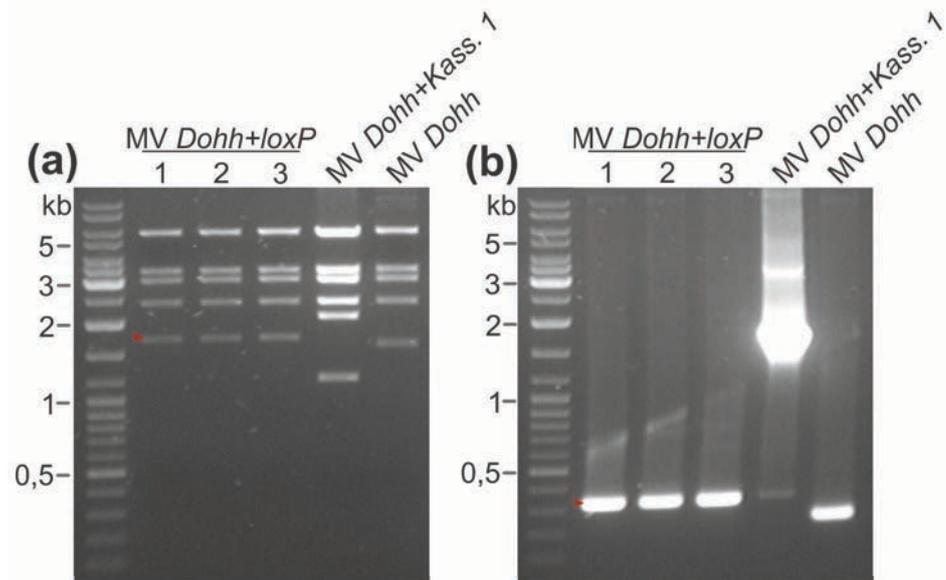


Abbildung 3.7: Screening von fünf Klonen des *Dohh*-Minimalvektors (MV) durch PCR und *Eco*RI-Restriktionsverdau nach erfolgtem Einbau der ersten Selektionskassette. (a) Die PCR amplifiziert ein ca. 500 bp großes Fragment, das aus der Kassette in das daran grenzende *Dohh*-Gen hineinreicht. (b) Das Bandenmuster nach dem *Eco*RI-Verdau entspricht bei allen fünf Klonen dem zu erwartenden Muster nach korrekter homologer Rekombination (5,5/3,2/2,9/2,3/2,0/1,2 kb). Die entstandenen Unterschiede zwischen dem Ausgangszustand (links) und dem Produkt der Rekombination (rechts) sind durch rote Dreiecke dargestellt.

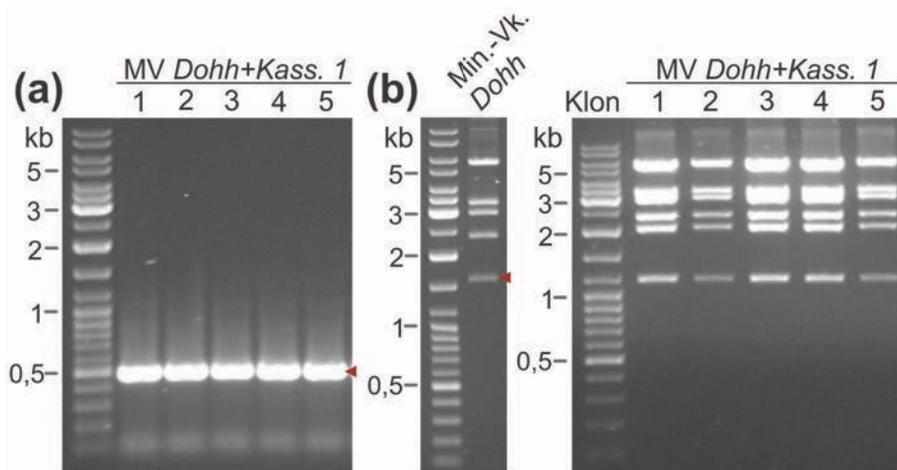


Abbildung 3.8: Screening von drei Klonen des *Dohh*-Minimalvektors (MV) nach erfolgter Entfernung der ersten Selektionskassette durch *Eco*RI-Restriktionsverdau und PCR. (a) Das Bandenmuster nach dem *Eco*RI-Verdau entspricht bei allen drei Klonen dem zu erwartenden Muster nach erfolgter Cre-Rekombination. Dieses unterscheidet sich nur durch die 34 bp lange *loxP*-Sequenz vom Minimalvektor vor dem Einbau der Selektionskassette (MV *Dohh*, s. Abb. 3.6), lässt sich aber gut von dem Zustand des vorhergegangenen Schritts (vor der Cre-Rekombination) unterscheiden (MV *Dohh* + Kass. 1, s. Abb. 3.7). Das rote Dreieck markiert die modifizierte Bande. (b) Die PCR amplifiziert im korrekten Konstrukt ein ca. 300 bp großes Fragment (rotes Dreieck), das über die *loxP*-Site verläuft. Die Größenunterschiede zur enthaltenen Selektionskassette (MV *Dohh* + Kass. 1, ca. 1,8 kb) und zum Konstrukt ohne *loxP*-Sequenz (34 bp kleiner) sind gut erkennbar.

3.1.2. Targeting von embryonalen Stammzellen, Blastozysten-Transfer

Das fertige *Targeting* Konstrukt wurde linearisiert (Abb. 3.11) und durch Elektroporation in murine embryonale Stammzellen (mESC) der Auskreuzung 129/X1 × 129/S1 transfiziert. Die Methode machte sich die Funktion des zellulären Systems zur Erkennung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zunutze.

Die lineare DNA wurde dabei von der Zelle erkannt und von ihr durch homologe Rekombination unter Zuhilfenahme des Schwesterchromosoms als Vorlage repariert. Im Gegensatz zu „echten“ Doppelstrangbrüchen wird hier allerdings die Sequenz des linear vorliegenden Plasmids in eines der Zielchromosomen integriert und dabei die Sequenz des ursprünglichen Wildtypallels durch die modifizierte Version ersetzt. Da das System jedoch nicht fehlerfrei arbeitet und die eingebrachte Sequenz häufig an

falscher Stelle ins Genom integriert, müssen nach erfolgter Neomycin-Selektion einzelne Klone per *Southern* Blot auf die korrekte Insertion überprüft werden (Abb. 3.12).

Ein Klon wurde für die weiteren Schritte ausgewählt und dessen ES-Zellen in Blastozysten der Linie C57BL/6 injiziert. Diese Blastozysten wurden nun in den Uterus einer schein-schwangeren Maus transferiert. Dabei macht man sich zunutze, dass die Bereitschaft der Gebärmutterschleimhaut weiblicher Mäuse zur Einnistung von Embryonen durch den Koitus induziert wird. Der Einsatz eines durch Vasektomie sterilisierten Bocks stellt dabei sicher, dass es nicht zur Befruchtung und Einnistung von Eizellen der Amme kommt. Die injizierten Blastozysten nisten sich im Anschluss an die Implantation in die Gebärmutterschleimhaut der Amme ein und werden von dieser ausgetragen. Dabei entstehen durch die Vermischung der bereits in den Blastozysten vorhandenen embryonalen Stammzellen der Ursprungslinie und der injizierten *Dohh*^{+tg} Zellen Chimären, die sich anhand der Fellfarbe erkennen lassen.

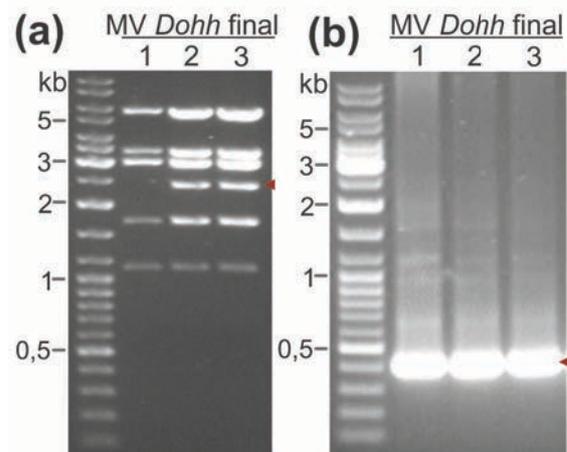


Abbildung 3.9: Screening von drei Klonen des *Dohh*-Minimalvektors (MV) nach erfolgter Insertion der zweiten Selektionskassette durch PCR und *EcoRI*-Restriktionsverdau. (a) Das Bandenmuster nach dem *EcoRI*-Verdau entspricht bei den Klonen 2 und 3 dem zu erwartenden Muster nach korrekter Insertion (5,5/3,2/2,9/2,8/1,7/1,1 kb). Das rote Dreieck markiert die neu entstandenen Bande. (b) Die PCR amplifiziert im korrekten Konstrukt ein ca. 400 bp großes Fragment (rotes Dreieck), das aus dem Intron 4-5 in die Selektionskassette reicht.

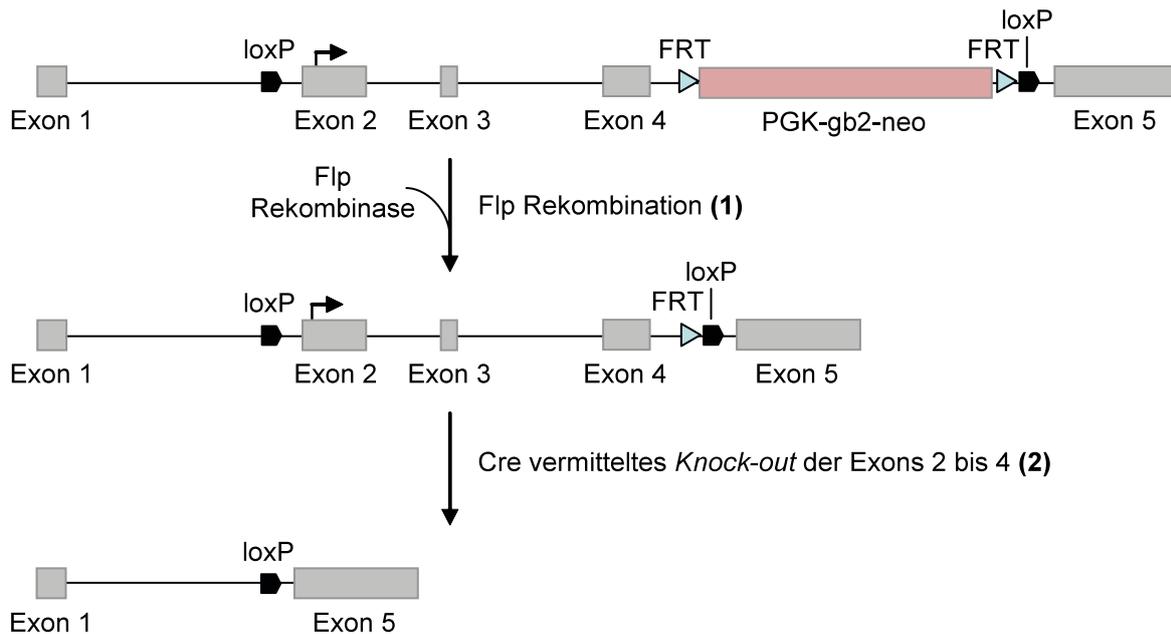


Abbildung 3.10: Knock-out Strategie nach erfolgreichem Nachweis der Keimbahntransmission. Durch Expression der Flp-Rekombinase (a) liegt das *Dohh*-Gen, abgesehen von zwei loxP- und einer FRT-Sequenz, wieder im Ursprungszustand vor. Durch Expression der Cre-Rekombinase können die Exons 2 bis 4 aus dem *Dohh*-Gen entfernt werden (b).

Die injizierten Zellen der 129-Linie führen zu braunem Fell, während C57BL/6-Tiere schwarzes Fell haben. Durch den Beitrag von Zellen beider Linien sind chimäre Tiere durch ein braun-schwarz geschecktes Fellmuster erkennbar (Abb. 3.13). Für die Weitergabe des modifizierten Allels ist aus-

schlaggebend, ob injizierte Zellen zur Anlage der Keimbahnzellen beigetragen haben. Dies erkennt man nach der Rückkreuzung der chimären Böcke mit Weibchen der Linie C57BL/6 – nur Nachkommen mit brauner Fellfarbe sind potentielle Träger des modifizierten *Dohh*-Allels. Braune Nachkommen der ersten Tochtergeneration (N_1) wurden daher genotypisiert und solche mit dem *Dohh*^{+tg}-Genotyp für weitere Verpaarungen verwendet. Die so hergestellte Linie erhielt die Bezeichnung C57BL/6-*Dohh*^{tm2Bal}, die sich an den Empfehlungen des *International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice*^{††} orientiert.

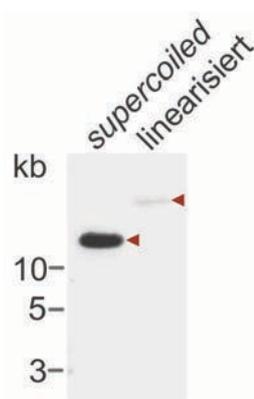


Abbildung 3.11: Linearisierung des *Dohh*-KO Minimalvektors zur Elektroporation in embryonale Stammzellen. Durch die Linearisierung wird die Knäuelstruktur des Plasmids (*supercoiled*) gelöst, das veränderte Laufverhalten im Agarosegel verursacht einen scheinbaren Größenunterschied.

^{††} erreichbar unter <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml>

3.1.3. Genotypisierungs- und Rückkreuzungsstrategie

Für die Genotypisierung der verschiedenen *Dohh*-Allele aus Schwanzspitzenbiopsien wurden vier Kombinationen von *PCR-Primern* genutzt, anhand derer sich alle möglichen Allelkombinationen voneinander unterscheiden ließen. Die verwendete Strategie sowie Beispiele verschiedener Genotypen sind in Abbildung 3.14 abgebildet.

Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, wurden für die homologe Re-

kombination Stammzellen der 129/X1 × 129/S1 Auskreuzung verwendet und die entstandenen Tiere in die C57BL/6 Linie eingekreuzt. Da der sogenannte genetische Hintergrund einer Linie, also deren einzigartige Kombination genetischer Variationen, einen starken Effekt auf die Ausprägung verschiedener Phänotypen hat (vgl. Abschnitt 1.5.1), mussten die

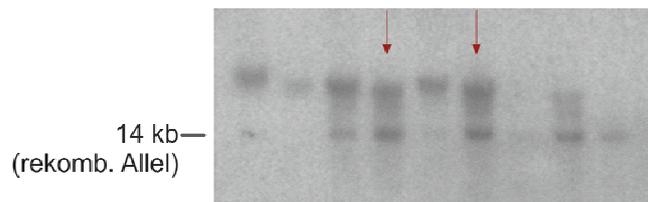
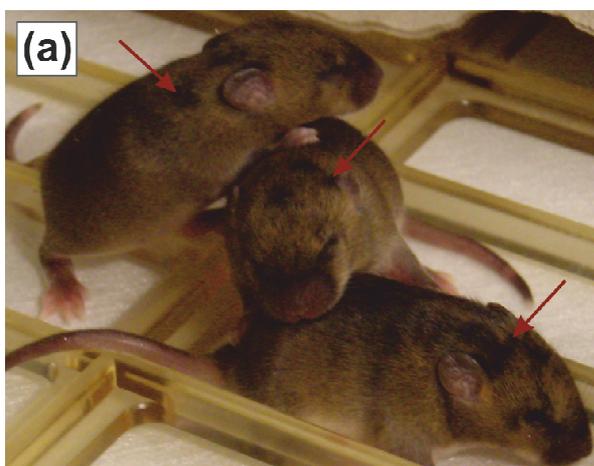


Abbildung 3.12: Southern Blot genomischer DNA der embryonalen Stammzellklone nach erfolgter homologer Rekombination. Das Sall-Fragment mit dem markierten Allel ist mit 14 kb um etwa 2 kb größer als das Wildtyp-Allel und kann so davon unterschieden werden. Die Signale oberhalb der Reihe spezifischer Banden sind unspezifisch. Die markierten Klone wurden später für den Transfer in Blastozysten verwendet.

transgenen Mäuse nun wieder auf einen definierten Hintergrund zurückgekreuzt werden. Dafür wurde die C57BL/6-Linie gewählt, da diese bisher am umfassendsten charakterisiert wurde und die meisten Linien, die später eventuell in diese Linie eingekreuzt werden sollen, ebenfalls auf diesem Hintergrund gezüchtet wurden.

Abbildung 3.13: Mäuse der Founder (N_0) und N_1 -Generation. (a) Wenige Tage alte Tiere der *Founder*-Generation. Der Grad des Chimärismus kann anhand der Fellfarben abgeschätzt werden. Braune Fellbereiche entstammen den injizierten Stammzellen, während schwarze Bereiche (rote Pfeile) von den in der Blastozyste vorhandenen Stammzellen herrühren. (a) Mutter (C57BL/6, schwarzer Pfeil) mit zwei verschiedenen alten Würfen. Die braune Fellfarbe der Jungtiere (brauner Pfeil) belegt die erfolgreiche Keimbahntransmission der injizierten Stammzellen.

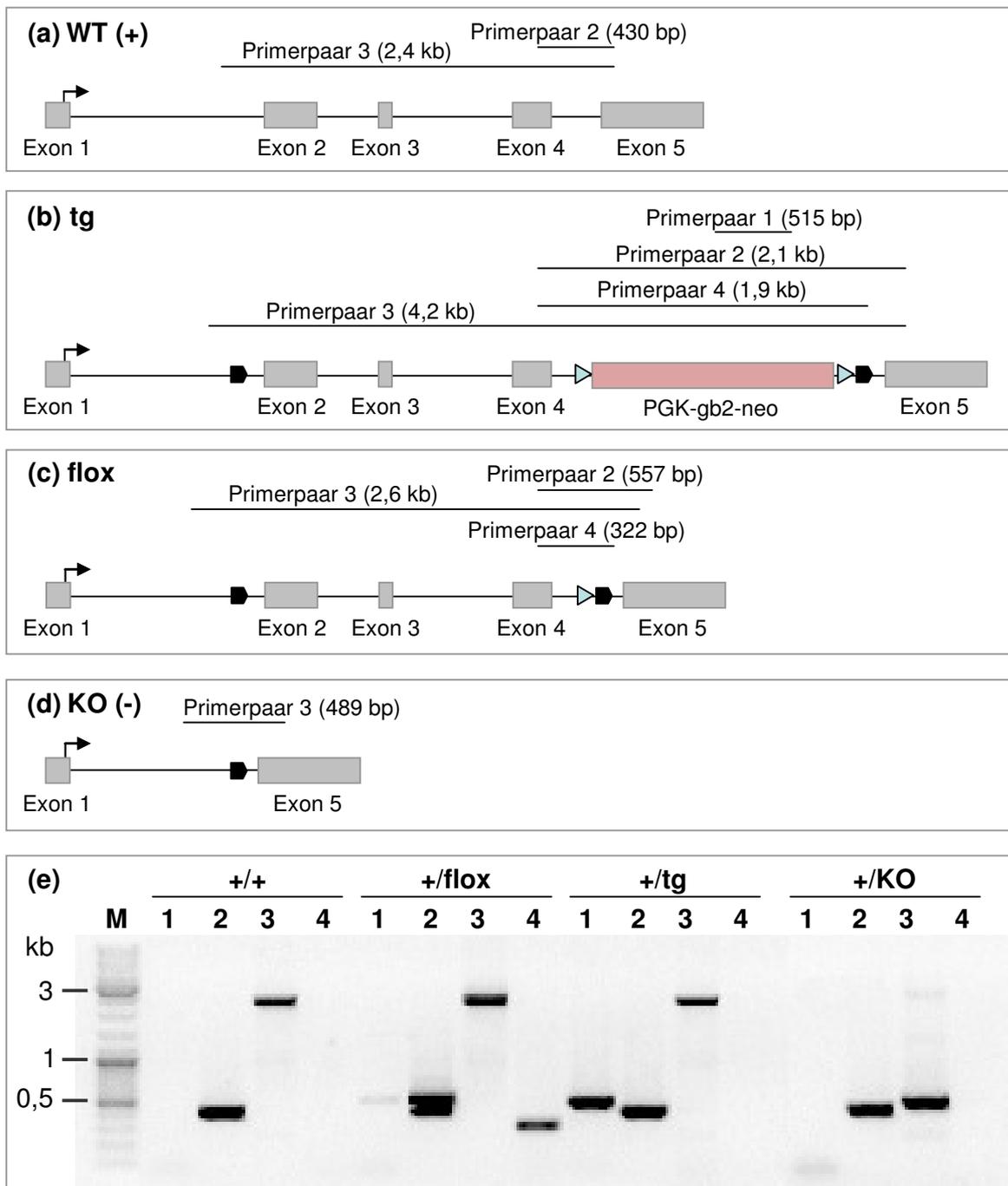


Abbildung 3.14: Genotypisierungsstrategie für die verschiedenen Genotypen. Für die Bestimmung der verschiedenen möglichen Genotypen wurden vier *Primerpaare* entworfen. Jeder Genotyp ist mit allen theoretisch amplifizierbaren Paaren dargestellt. **(a)** Das Wildtyp-allel wird hauptsächlich durch das 430 bp umfassende Produkt des *Primerpaars 2* charakterisiert. **(b)** Das rekombinierte Allel vor der Flp-Rekombination ergibt in Kombination mit *Primerpaar 1* ein 515 bp großes Fragment. **(c)** Das gefloxtete *Dohh*-Gen ist an der bei 557 bp detektierbaren Bande mit *Primerpaar 2* und einer 322 bp großen Bande mit *Primerpaar 4* zu erkennen. **(d)** Das KO-Allel ergibt mit *Primerpaar 3* ein 489 bp großes Fragment. **(e)** Genotypisierung anhand von Schwanzspitzenbiopsien aller vier Genotypen (a) bis (d), jeweils unter Verwendung aller vier *Primerpaare*. Die Nummerierung der Spuren entspricht der der *Primerpaare* in a) bis d).

Um dies zu erreichen, wurde die hergestellte Linie *Dohh*^{tm2Bal} über zehn Generationen durch Verpaarung mit Tieren der Linie C57BL/6 auf diesen Hintergrund zurück gekreuzt. Dieser Prozess nahm, bei einer durchschnittlichen Generationszeit von elf Wochen, etwa zwei Jahre in Anspruch. Dabei wurde in der zweiten Generation (N₂) durch Einkreuzen einer transgenen Linie, die die FLP-Rekombinase exprimiert, die Selektionskassette entfernt (siehe Abschnitt 3.1.1, Abb. 3.10).

Üblicherweise geht man bei dieser Strategie davon aus, dass nach zehn Generationen alle aus der 129-Ursprungslinie stammenden Allele durch Allele der C57BL/6-Linie ausgetauscht wurden und nun, abgesehen vom modifizierten Allel und seiner unmittelbaren Umgebung, der genetische Hintergrund des C57BL/6-Stammes vorliegt.

Das loxP-markierte Zielgen zeigte zu keiner Zeit einen erkennbaren negativen Einfluss auf individuelle Tiere oder die Verteilung der Genotypen in der Zucht. Auch die Verpaarung zweier Tiere mit heterozygot gefloxtem Zielgen ergab die zu erwartende Verteilung von Genotypen. Der Nachwuchs zeigte keinen erkennbaren Phänotyp (nicht gezeigt). Damit wurde gezeigt, dass die konditionale Modifikation des *Dohh*-Gens keinen offensichtlichen negativen Einfluss auf den Modellorganismus hat.

3.1.4. Konditionaler und konstitutiver *Knock-out* des *Dohh*-Gens

Nach Abschluss der Rückkreuzung auf den C57BL/6-Hintergrund konnte das markierte *Dohh*-Gen durch Expression der Cre-Rekombinase ausgeschaltet werden. Dazu wurden Individuen der *Dohh*-Linie mit so genannten *Deleter*-Mäusen verpaart. Diese tragen das Gen, das die Cre-Rekombinase kodiert. Durch die Wahl des entsprechenden Promoters kann hier die Expression auf bestimmte Gewebe beschränkt werden. Konditionale, also zeitlich und lokal beschränkte KOs lassen sich durch induzierbare Systeme realisieren, die zum Beispiel auf der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren beruhen. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung eines Fusionsproteins aus der Cre-Rekombinase und dem Östrogen-Rezeptor (Cre-Esr1). Dieses Protein wird von seiner Esr1-Domäne im Zytoplasma lokalisiert. Erst nach Bindung des Rezeptoragonisten 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) wird der Transport in den Zellkern ausgelöst, wo die Cre-Rekombinase loxP-Sequenzen in der genomischen DNA erkennt und entsprechend ihrer Anordnung rekombiniert⁹⁸. In dieser Arbeit sind drei verschiedene *Deleter*-Linien mit C57BL/6J Hintergrund eingesetzt worden: Eine generelle KO-Linie, in der die Cre-Rekombinase in allen Entwicklungsstadien gewebsunabhängig exprimiert wird und die daher zu einem vollständigen KO der loxP-markierten Allele führt. Darüber hinaus wurden zwei Tamoxifen-induzierbare CreEsr1-Linien eingesetzt, CAG-CreEsr1¹¹³ und HSC-*Scf*-CreEsr1¹¹² (vgl. Abschnitt 2.1.8). Während bei der ersten die

CreEsrl-Expression vom CAG-Promoter gesteuert wird und daher ubiquitär erfolgt, ist die Expression der zweiten auf das blutbildende System beschränkt.

3.2. Charakterisierung des *Dohh* Knock-out Phänotyps

3.2.1. Der heterozygote *Dohh*-KO führt postnatal zu verzögertem Wachstum

Zunächst wurden Mäuse des *Dohh*^{flox/+} Genotyps mit Cre-Deleter Mäusen verpaart (vgl. Abschnitt 2.1.8). Der Nachwuchs dieser Verpaarungen wurde genotypisiert. Dabei wurden nur Cre-positive Tiere der Genotypen *Dohh*^{+/+};Cre⁺ (Wildtyp) und *Dohh*^{+/-};Cre⁺ (Heterozygoter KO) gefunden. Damit konnte gezeigt werden, dass in Cre-positiven Tieren der KO des geflochtenen *Dohh*-Gens zuverlässig stattfand (vgl. Abb. 3.14). Tiere mit heterozygotem KO zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp im Vergleich zu Geschwistertieren mit zwei Wildtypallelen. Die Tiere wurden postnatal regelmäßig gewogen und

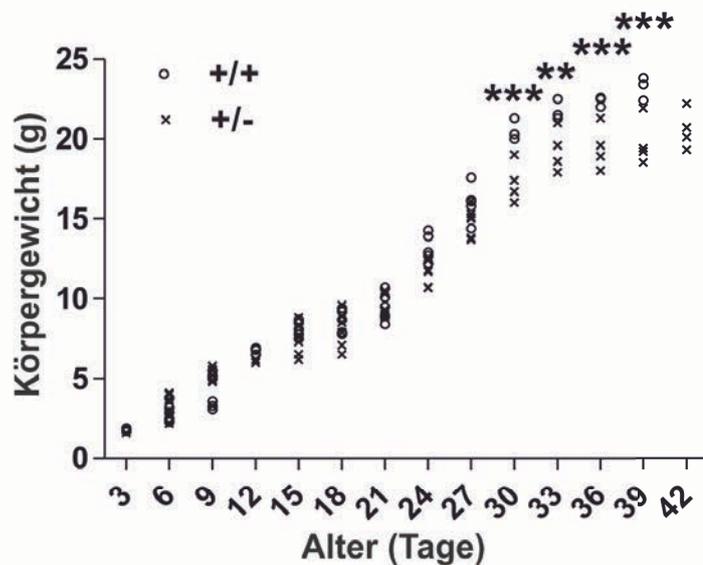


Abbildung 3.15: Entwicklung des Körpergewichts von Mäusen mit heterozygotem *Dohh*-KO. Das Körpergewicht einzelner Tiere wurde nach der Geburt regelmäßig bestimmt und anhand des Genotyps kategorisiert. Die Messwerte sind jeweils einzeln dargestellt. Quadrate: Heterozygote KO-Tiere; Kreise: Wildtypen. Die Unterschiede zwischen beiden Genotypen wurden für jeden Tag mit dem *two-way* ANOVA Test statistisch ausgewertet.

anhand ihres Genotyps gruppiert. Abbildung 3.15 zeigt die zeitliche Entwicklung des Körpergewichts der beiden Gruppen. Dabei wurde für einen Monat alte Mäuse ein signifikanter Unterschied des Körpergewichts festgestellt, der bis Tag 39 anhielt. Diese Daten zeigen, dass bereits der Verlust eines *Dohh*-Allels Auswirkungen auf die Ontogenese hat.

3.2.2. Der *Dohh*-KO bewirkt einen letalen Phänotyp in der frühen Embryogenese

Um die Auswirkung des Verlusts beider *Dohh*-Allele zu untersuchen, wurden Tiere des *Dohh*^{+/-} Genotyps untereinander verpaart. Bei der Genotypisierung des Nachwuchses fiel auf, dass keine Mäuse mit homozygotem *Dohh* KO geboren wurden. Die Auswertung dieser Versuche ist in Abbildung 3.16a dargestellt. In 15 untersuchten Würfen mit insgesamt 80 Tieren wurden 29 Wildtyp-Tiere und 51 Tiere mit heterozygotem *Dohh*-KO geboren. Die durch-

schnittliche Wurfgröße der +/- × +/- Verpaarungen lag mit 5,3 statistisch signifikant unter der durchschnittlichen Wurfgröße von +/flox × +/flox Verpaarungen (8,8, Abb. 3.16b). Der zweite Wert entspricht in etwa der Wurfgröße, die auch bei Wildtyp-Verpaarungen zu erwarten ist (nicht gezeigt, vgl. z. B. Kallikourdis *et al.*¹²⁸). Der Chi-Quadrat-Test gegen die normalerweise zu erwartende Mendelsche Verteilung der Genotypen (1:2:1) ergab mit $1,3 \times 10^{-6}$ eine hohe statistische Signifikanz. Dies lässt darauf schließen, dass der homozygote *Dohh*-KO während der Embryogenese letal wirkt. Darüber hinaus wurden in keinem der Würfe tot geborene Embryonen gefunden. Dies ist ein Indikator dafür, dass die Letalität bereits in einem frühen Entwicklungsstadium einsetzt.

Um den Zeitpunkt der embryonalen Letalität weiter eingrenzen zu können, wurden Embryonen zweier Entwicklungsstadien untersucht (Abb. 3.17). Dafür wurden Blastozysten am Tag 3,5 p. c. gewonnen und zwei Tage kultiviert. Anschließend wurde die genomische DNA isoliert und jede Blastozyste genotypisiert. Aufgrund der geringen DNA-Ausgangsmenge konnten einige Blastozysten nicht eindeutig genotypisiert werden. 13 Blastozysten konnten jedoch einem Genotyp eindeutig zugeordnet werden (Abb. 3.17a, c und d). Dabei wurden auch homozygote *Dohh* KO-Genotypen gefunden und mit einer Verteilung von 3:6:4 eine annähernd Mendelsche Normalverteilung festgestellt. Die für den *Dohh*-KO homozygoten Embryonen sahen etwas kleiner aus und waren unregelmäßiger geformt. Durch die bisher geringen Zahlen kann aus diesen Daten allerdings nur mit Sicherheit geschlossen werden, dass der homozygote *Dohh*-KO bis zum Tag 3,5 p. c. noch keinen letalen Phänotyp bewirkt.

Als nächstes wurden Embryonen am Tag

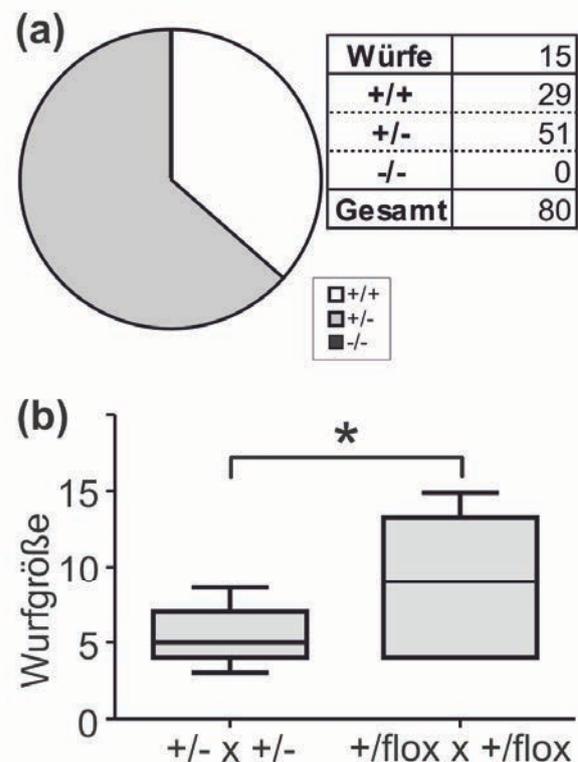


Abbildung 3.16: Der homozygote *Dohh*-KO ist embryonal letal. (a) Die Genotypen aus 15 Würfen mit insgesamt 80 Jungtieren wurden bestimmt und mit den zu erwartenden Genotypen verglichen. Statt der 1:2:1 Verteilung der Genotypen bei normaler Entwicklung aller drei Genotypen war die tatsächlich beobachtete Verteilung annähernd 1:2:0. Der Unterschied zur Normalverteilung ist signifikant (χ^2 -Test). **(b)** Die durchschnittliche Wurfgröße aus Verpaarungen der Genotypen +/- × +/- war signifikant kleiner als die von +/flox × +/flox Verpaarungen (T-Test).

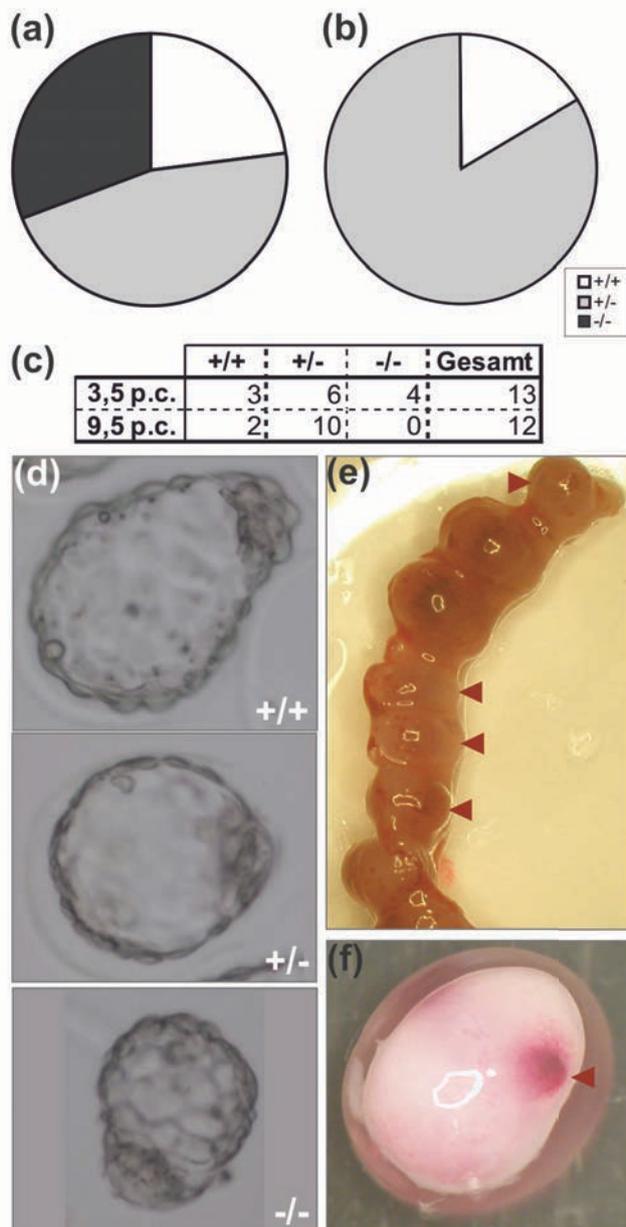


Abbildung 3.17: Die embryonale Letalität tritt nach der Implantation, aber vor dem Tag 9,5 p. c. ein. Blastozysten und Embryonen aus +/- x +/- Verpaarungen, präpariert an Tag 3,5 p. c. und 9,5 p. c. Blastozysten wurden zwei Tage kultiviert und deren Entwicklung täglich dokumentiert. (a) Verteilung der erfolgreich ermittelten Genotypen aus Blastozysten (3,5 p. c. + 2 Tage) (b) Verteilung der erfolgreich ermittelten Genotypen aus Embryonen (9,5 p. c.). (c) Anzahlen der sicher genotypisierten Blastozysten und Embryonen. (d) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Blastozysten zwei Tage nach der Präparation. (e) Präparierter Uterus an Tag 9,5 p. c. Die kleineren Implantationsstellen ohne auffindbare Reste von Embryonen sind mit roten Pfeilspitzen markiert. (f) Frei präpariertes extraembryonales Gewebe aus (e). Die Pfeilspitze markiert einen Ort mutmaßlicher maternalen Infiltration.

9,5 p. c. untersucht. Dafür wurde schwangeren Mäusen zunächst der Uterus entfernt (Abb. 3.17e). Dabei fiel auf, dass die vorhandenen Implantationsstellen in zwei verschiedenen Größen vorlagen.

Während die größeren normal entwickelte Embryonen und extraembryonale Gewebe enthielten, wurden in den kleineren zwar teilweise resorbierte extraembryonale

Gewebe gefunden (Abb. 3.17f), jedoch keine Embryonen. Bei der Genotypisierung konnte aufgrund der fortgeschrittenen Lyse des Gewebes nur der mütterliche, heterozygote Genotyp festgestellt werden. Die normal entwickelten Embryonen hatten Wildtyp- bzw. heterozygote Genotypen (2 bzw. 10 von 12 eindeutig genotypisierten Embryonen, Abb. 3.17b und c). Aufgrund der Beobachtung, dass zum einen keine Embryonen mit *Dohh*^{-/-} Genotyp gefunden werden konnten, aber zum anderen Implantationsstellen mit vollständig lysierten Embryonen vorhanden waren, kann man darauf schließen, dass sich der völlige Verlust des *Dohh*-Allels nach der Implantation (ca. 4,5 p. c.), jedoch einige Zeit vor 9,5 p. c. letal auswirkt.

3.2.3. Histologische Untersuchung von Mäusen mit *Dohh*^{+/-}-Genotyp

Für histologische Analysen wurden je drei Mäuse mit dem *Dohh*^{+/+} und dem *Dohh*^{+/-} Genotyp durch kardiale Perfusion fixiert und ihre Organe entnommen. Von den Milzen und dem Knochenmark aller Tiere wurden Schnitte angefertigt und diese mit Methyleneblau gefärbt. In Abbildung 3.18 sind repräsentative Bildausschnitte der Präparate beider Genotypen gegenübergestellt. Während im Milzgewebe des Wildtyps reife Blutzellen (hauptsächlich Erythrozyten) zu sehen sind, fehlen diese im Gewebe des heterozygoten *Dohh*-KO Genotyps. Gleichzeitig ist das hauptsächlich aus Fibroblasten bestehende retikuläre Grundgewebe der Milz des heterozygoten *Dohh*-KO Genotyps im Vergleich zum Wildtyp verdichtet. Diese Beobachtung spiegelt sich auch in einer weniger intensiven Rotfärbung von frisch präparierten sowie fixierten Milzen des *Dohh*^{+/-}-Genotyps wider. Das Knochenmark von Wildtyp-Mäusen und heterozygoten KO-Tieren zeigt keine offensichtlichen histologischen Unterschiede (nicht gezeigt).

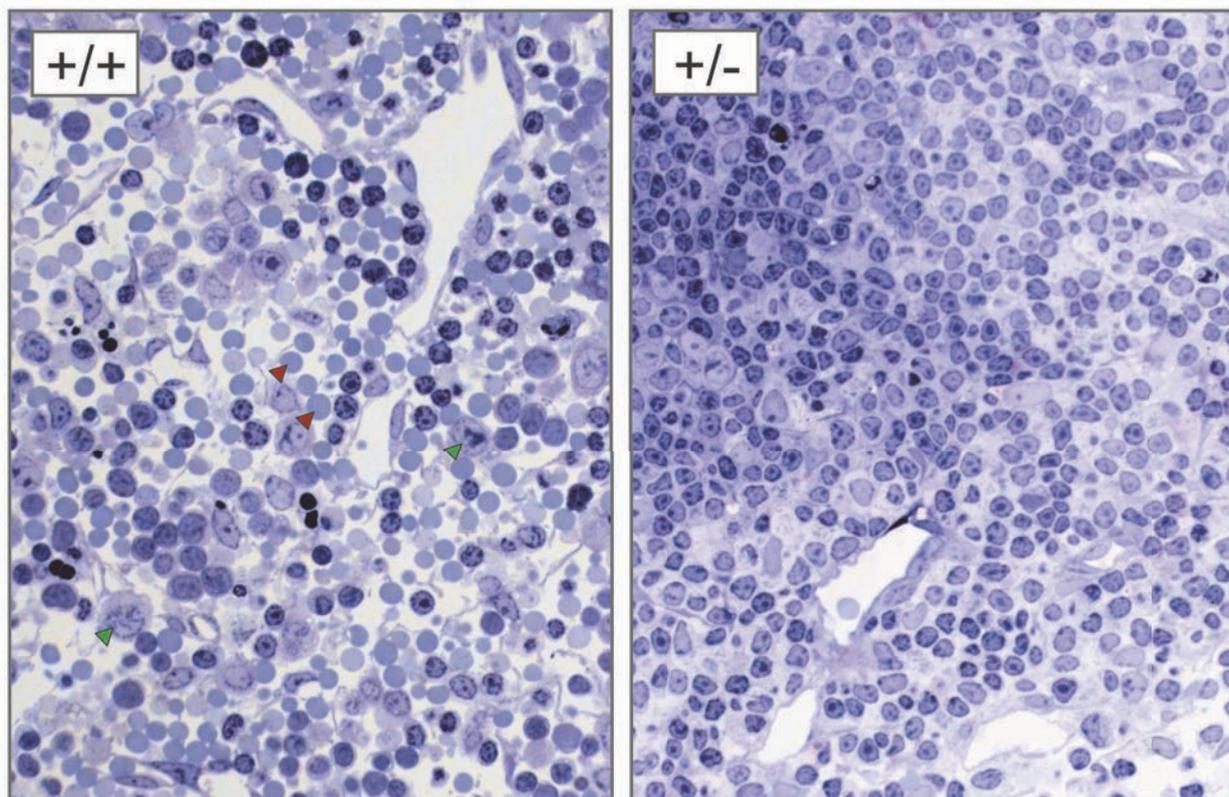


Abbildung 3.18: Histologische Untersuchung von Geweben adulter heterozygoter *Dohh*-KO Tiere. Jeweils drei Mäuse mit Wildtyp- und heterozygotem *Dohh*-KO Genotyp wurden durch kardiale Perfusion fixiert, dann wurden ihre Organe entnommen. Abgebildet sind je ein repräsentativer Schnitt der Milzen beider Genotypen. Färbung mit Methyleneblau. Im Milzgewebe des Wildtyps sind Erythrozyten und Leukozyten (rote bzw. grüne Pfeile) klar zu erkennen. Diese sind im Gewebe des *Dohh*-KOs nicht vorhanden. Die Schnitte und Färbungen wurden von Dr. Michaela Schweizer (ZMNH, Hamburg) angefertigt.

3.2.4. Konditionaler *Knock-out* des *Dohh*-Allels

Um die Auswirkung des *Dohh*-KOs in adulten Tieren zu untersuchen, wurden Tiere mit dem *Dohh*^{+/*flox*}-Genotyp mit *Deleter*-Tieren der Linie B6.Cg-Tg(CAG-cre/*Esrr1**)5Amc/J (CAG-Cre*Esrr1*, vgl. Abschnitt 2.1.8) verpaart. Der daraus resultierende Nachwuchs mit dem *Dohh*^{+/*flox*};CAG-Cre*Esrr1*⁺-Genotyp wurde wiederum mit *Dohh*^{+/*flox*}-Tieren verpaart. In etwa vier Wochen alten Geschwistertieren der Genotypen *Dohh*^{*flox/flox*};CAG-Cre*Esrr1*⁺ (n = 3), *Dohh*^{+/*flox*};CAG-Cre*Esrr1*⁺ (n = 5) und *Dohh*^{+/+};CAG-Cre*Esrr1*⁺ (Wildtyp-Kontrolle, n = 3) konnte nun durch die Behandlung mit Tamoxifen im Futter (1 g Tamoxifen pro kg Futter) der *Dohh*-KO induziert werden. Die Tiere wurden nach dem Beginn der Induktion regelmäßig überwacht und gewogen. Die Entwicklung des Körpergewichts ist in Abbildung 3.19a dargestellt. Mäuse, die homozygot für das gefloxtete *Dohh*-Allel waren, nahmen im Laufe der ersten 14 Tage der Tamoxifen-Behandlung Körpergewicht ab, während die Wildtypen normal zunahmen. Der Unterschied dieser Genotypen war nach 21 und 28 Tagen statistisch signifikant (Faktor 1,6 und 1,9). Die heterozygoten Tiere lagen mit ihrem Körpergewicht etwa in der Mitte (Faktor 1,3 und 1,5 bezogen auf die KO-Tiere). Dieser Unterschied spiegelte sich in Körpergröße und -umfang wider (Abb. 3.19b). Von den bisher untersuchten drei KO-Tieren verstarb eines 28 Tage nach Beginn der Behandlung. Die beiden anderen wurden nach 22 bzw. 30 Tagen aufgrund ihres Gesundheitszustandes getötet. Dieser Verlauf ist in der Kaplan-Meier Überlebenskurve in Abbildung 3.19c dargestellt. Alle Tiere mit einem oder zwei Wildtypallelen zeigten bis zu diesen Zeitpunkten keinerlei Beeinträchtigung in ihrem Verhalten oder Aussehen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression funktioneller DOHH auch für die adulte Maus essentiell ist und bereits der Verlust eines Allels zu einer Beeinträchtigung der normalen Gewichtszunahme führt.

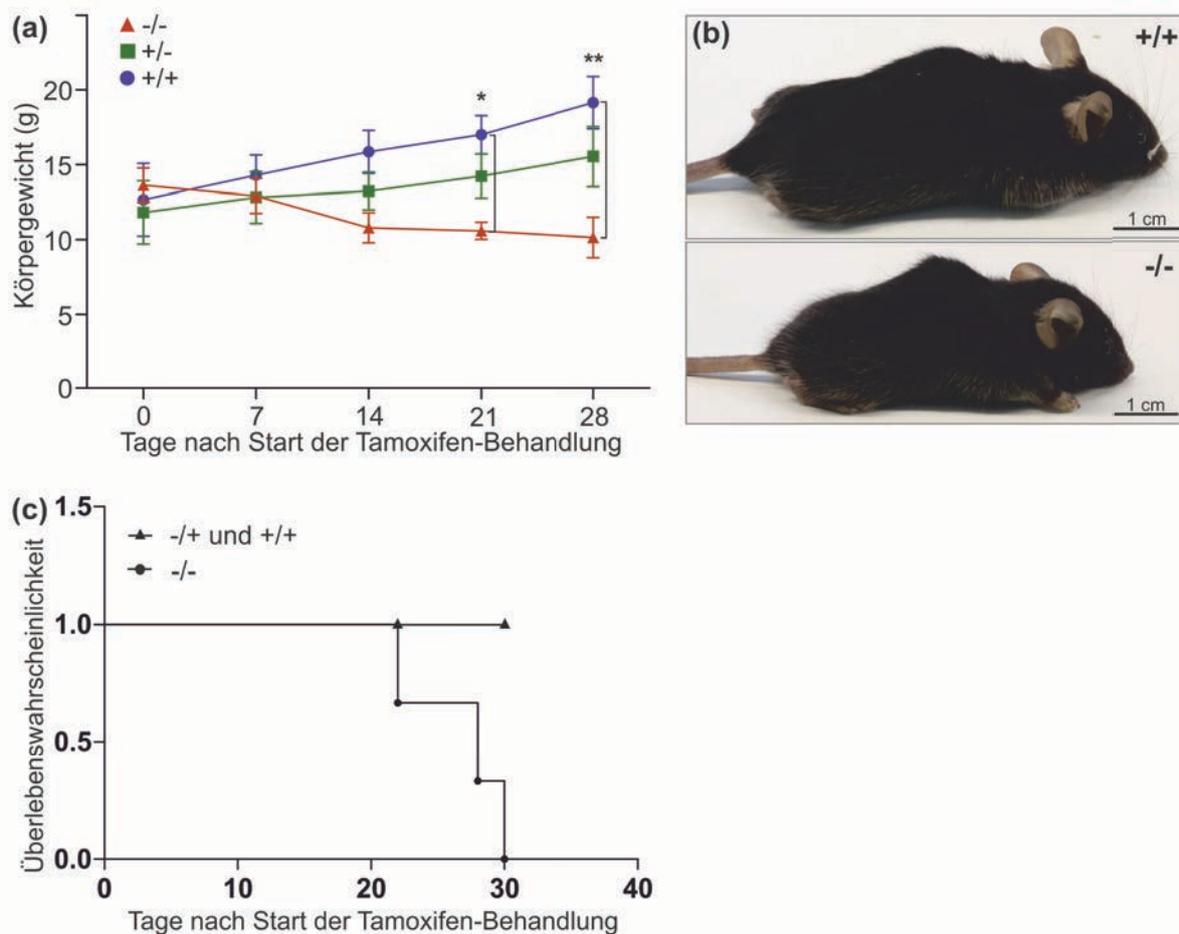


Abbildung 3.19: Phänotyp nach konditionalem *Dohh*-KO in adulten (bzw. juvenilen) Mäusen. Der *Dohh*-KO in CAG-CreEsr1-positiven Geschwistertieren der abgebildeten *Dohh*-Genotypen wurde im Alter von drei bis vier Wochen durch Fütterung mit Tamoxifen-haltigem Futter (1 g/kg) über drei Wochen induziert. **(a)** Die bis dahin normalgewichtigen Tiere mit homozygot gefloxtem *Dohh*-Allel (rote Dreiecke) verloren stark an Gewicht und blieben bei ca. 80% des Ausgangsgewichts ($n = 3$). Die Tiere mit nur einem gefloxten *Dohh*-Allel ($n = 5$) nahmen langsamer Gewicht zu als die Wildtypen ($n = 3$), zeigten ansonsten aber keine gesundheitlichen Auswirkungen. Die Unterschiede zwischen den Genotypen *Dohh*^{+/+} und *Dohh*^{-/-} wurden für jeden Zeitpunkt durch den *two-way* ANOVA Test mit Bonferroni *post-test* statistisch ausgewertet. **(b)** Aufnahme je eines Wildtyp- und KO-Tieres vier Wochen nach Induktion des *Dohh*-KO. **(c)** Kaplan-Meier Überlebenskurve der drei Tiere mit homozygotem KO. Eines der Tiere starb an Tag 28 nach Beginn der Behandlung, die anderen mussten an den Tagen 22 und 30 getötet werden. Tiere der beiden anderen Genotypen wurden zusammen mit den *Dohh*^{-/-} Individuen getötet. Diese zeigten keine erkennbaren Veränderungen in Aussehen oder Verhalten.

3.3. Herstellung einer Zelllinie für den konditionalen *Dohh*-KO *in vitro*

Murine embryonale Fibroblasten (MEF) wurden aus Embryonen von *Dohh*^{+/*flox*} × *Dohh*^{+/*flox*} Verpaarungen am Tag 13,5 p. c. isoliert. Die Zellen einzelner Embryonen wurden zunächst separat kultiviert und später gemäß ihrer Genotypen gruppiert und gemischt. Die Zellen wurden nach dem Protokoll von Todaro und Green¹¹⁴ kultiviert (vgl. Abschnitt 2.2.7). Dadurch ließen sich die Primärzellen, die nur über eine begrenzte Teilungskapazität verfügen,

in eine stabile Fibroblasten-Zelllinie umwandeln. Die daraus entstandenen Zelllinien unterschieden sich im Hinblick auf ihre Wachstumsraten stark voneinander. Diese Unterschiede ließen sich nicht mit dem *Dohh*-Genotyp in Zusammenhang bringen ($Dohh^{+/flox} < Dohh^{+/+} < Dohh^{flox/flox}$). Die Wachstumsrate der $3T3^{\Delta Dohh}$ mit dem $Dohh^{flox/flox}$ Genotyp lag durchschnittlich bei 2,8 Verdoppelungen in drei Tagen ($\log_2(N_3/N_0)$), während die $Dohh^{+/+}$ -Zellen nur etwa 1,9 Verdoppelungen in drei Tagen erreichten. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede wäre, dass unterschiedliche genetische Ereignisse eingetreten sind, die zur Immortalisierung der jeweiligen Zelllinie geführt haben. Daher wurde in der Folge möglichst darauf verzichtet, die neu etablierten Fibroblasten-Zelllinien untereinander zu vergleichen und stattdessen auf Kontrollen desselben *Dohh*-Genotyps zurückgegriffen.

3.3.1. Knock-out des *Dohh*-Allels *in vitro*: Nachweis des *Dohh*-KO

Um weitere experimentelle Möglichkeiten zu erschließen, sollte nun ein Modell etabliert werden, das den induzierbaren KO des geflochtenen *Dohh*-Allels in der Zellkultur ermöglicht. Dazu wurde das bereits in den *in vivo* Versuchen genutzte CreEsr1-Fusionsgen eingesetzt. Das Gen wurde aus der genomischen DNA einer CAG-CreEsr1-Deleter Maus in das pMSCV

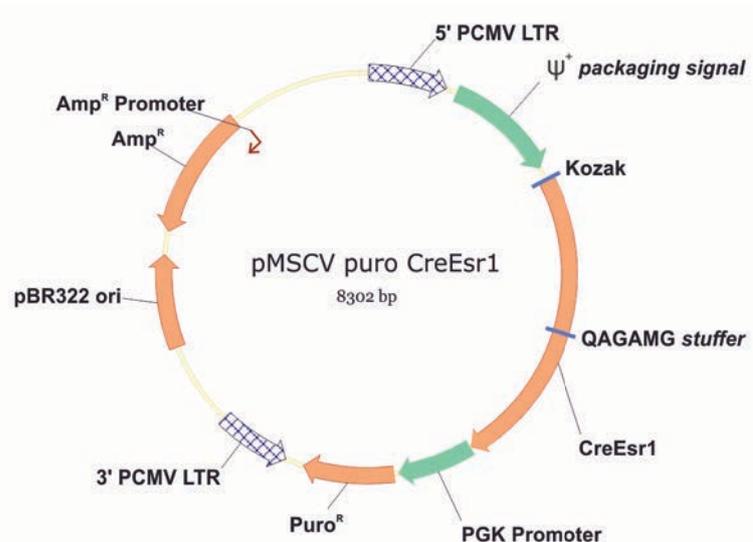


Abbildung 3.20: Vektorkarte des retroviralen pMSCV puro CreEsr1 Plasmids.

puro Plasmid umklontiert (Abb. 3.20) und dieser Expressionsvektor sowie eine Leervektor-kontrolle durch retrovirale Transduktion stabil in das Genom der $Dohh^{flox/flox}$ - und $Dohh^{+/+}$ -Fibroblasten integriert. Anschließend wurde der KO durch Zugabe von 100 nM 4-OHT ins Kulturmedium ausgelöst. Wie in Abbildung 3.21 zu sehen ist, konnte der KO für alle drei Schritte der Genexpression – also auf DNA-, mRNA- und Proteinebene – nachgewiesen werden. Versuche mit höherer Konzentration an 4-OHT (1 μ M) zeigten, dass entweder 4-OHT oder das verwendete Lösungsmittel (95% Ethanol in *A. dest.*) in dieser Konzentration zelltoxisch wirkt (nicht gezeigt). Abbildung 3.21a zeigt die Genotypisierung von $3T3^{\Delta Dohh}$ mit $Dohh^{flox/flox}$ -Genotyp und dem CreEsr1-Gen vor der Behandlung, und sowohl mit und ohne das CreEsr1-Gen nach zwei Tagen unter 4-OHT. Dabei wird deutlich, dass das verwendete System auch ohne Induktion bereits einen Teil der geflochtenen Genabschnitte rekombiniert.

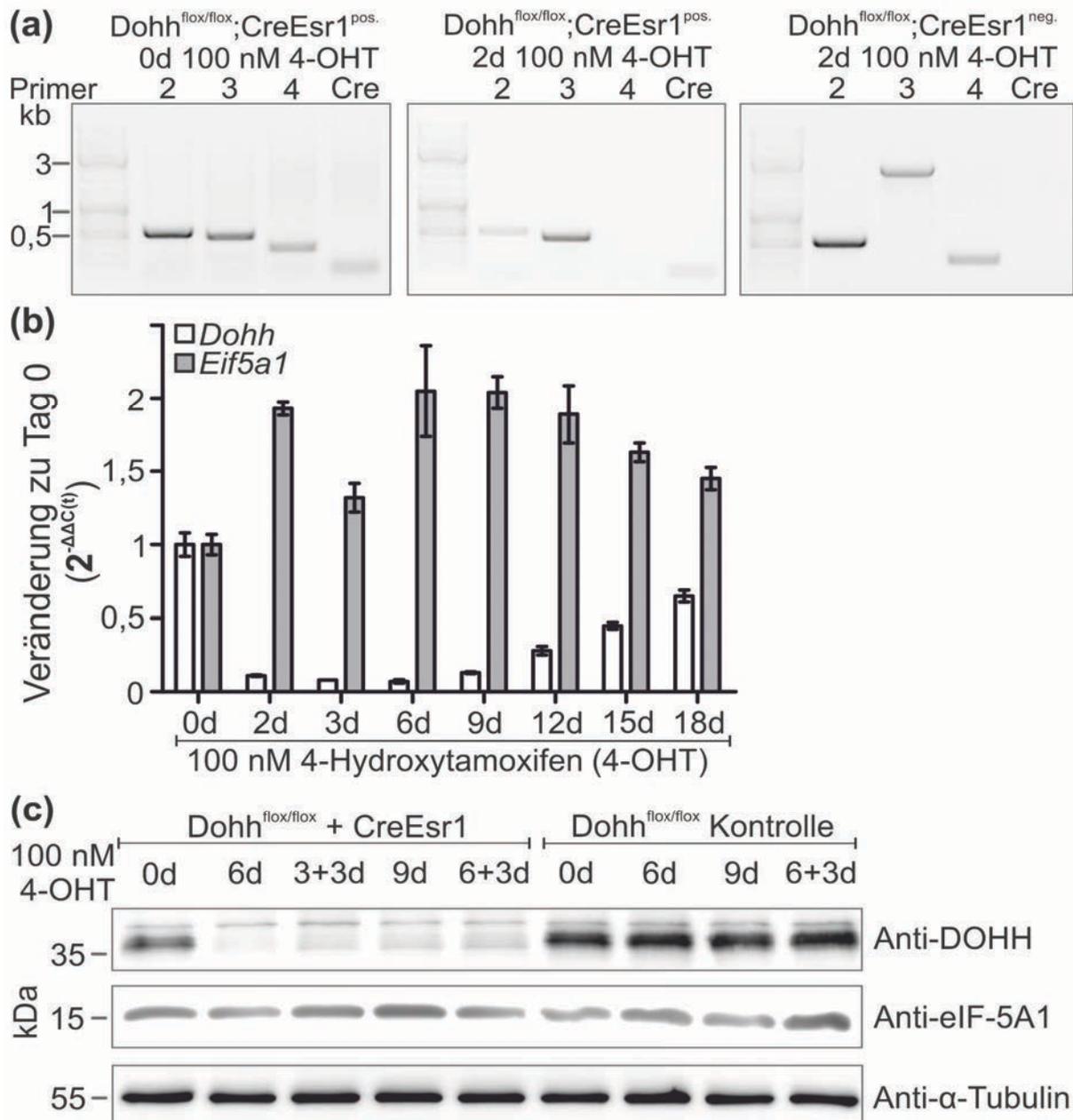


Abbildung 3.21: Untersuchung der DOHH-Expression nach erfolgtem KO in 3T3 ^{Δ Dohh} Fibroblasten mit stabil integriertem CreEsr1 Expressionskonstrukt. (a) Die Genotypisierung zeigt einen Mischgenotyp in unbehandelten Zellen mit CreEsr1, der vermutlich durch eine induktionsunabhängige Basisaktivität der Cre-Rekombinase hervorgerufen wurde. Bereits nach zwei Tagen Induktion durch 4-OHT war nur noch wenig gefloxtes Allel nachweisbar. Zellen ohne CreEsr1 Expression zeigten nach der Induktion keinen Effekt auf ihren Genotyp. **(b)** *Real-time* RT-PCR der *Dohh*- und *Eif5a1*-mRNA-Level im Verlauf der Behandlung mit 100 nM 4-OHT. Die abgebildeten relativen Expressionswerte wurden nach der $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ -Methode¹¹⁶ erst gegen *Gapdh* als Referenzgen und dann gegen den Wert unbehandelter Zellen (0d := 1) normalisiert. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Die abgebildeten Ergebnisse wurden in unabhängigen Versuchen erfolgreich repliziert (nicht gezeigt). **(c)** Western Blots CreEsr1-exprimierender und Kontrollzellen mit *Dohh*^{flox/flox}-Genotyp vor und nach der Behandlung mit 100 nM 4-OHT. Die DOHH-spezifische Bande war nach sechs Tagen kaum mehr nachweisbar, während die DOHH-Expression der Kontrollzellen stabil blieb. Die eIF-5A1-Expression zeigte auf Proteinebene keine detektierbare Veränderung durch die Behandlung mit 4-OHT.

Bereits nach zwei Tagen 4-OHT-Behandlung war das KO-Allel überwiegend vertreten, während das gefloxtete Allel kaum noch nachweisbar war. Der Genotyp der *Dohh*^{flox/flox}; CreEsr^{neg}-Zellen (Leervektorkontrolle) veränderte sich durch die Tamoxifen-Behandlung nicht.

Diese Beobachtungen ließen sich auf der mRNA-Ebene zunächst bestätigen (Abb. 3.21b): 3T3^{ΔDohh} Zellen des *Dohh*^{flox/flox}; CreEsr1⁺-Genotyps wurden zwei bis 18 Tage mit 100 nM 4-OHT behandelt und deren *Dohh*- und *Eif5a1*-mRNA-Level in *real-time* RT-PCR Experimenten mit den Expressionsniveaus unbehandelter Zellen verglichen. Bereits nach zwei Tagen war die *Dohh*-mRNA auf 11% des Ursprungswertes gesunken und blieb bis zu Tag neun auf einem vergleichbaren Niveau (Minimum 7% an Tag sechs). Ab Tag zwölf der Behandlung zeigte sich allerdings ein deutlicher Anstieg der *Dohh*-Expression (auf 28%), der sich im weiteren Verlauf verstärkte und bis Tag 18 wieder 65% der Expression unbehandelter Zellen erreichte. Auf das *Eif5a1*-Expressionsniveau hatte der *Dohh*-KO dagegen keinen detektierbaren Einfluss. Die Werte der *Eif5a1*-mRNA verdoppelten sich zwar bis Tag zwei annähernd und fielen im Verlauf der Behandlung wieder auf etwa das 1,5-fache Niveau unbehandelter Zellen ab, Änderungen dieser Größenordnung können mit der *real-time* RT-PCR allerdings nicht ausreichend zuverlässig bestimmt werden. Der beobachtete Trend korrelierte in seinem zeitlichen Verlauf aber ungefähr mit der Erholung des *Dohh*-mRNA-Niveaus.

Der *Dohh*-KO ließ sich auch auf der Proteinebene nachweisen (Abb. 3.21c). Während das DOHH-Signal in Kontrollzellen während der gesamten Behandlung stabil blieb, war nach sechs Tagen Behandlung in den CreEsr1-positiven Zellen kein DOHH-Signal mehr detektierbar. Das eIF-5A1 Signal wurde in beiden Zelllinien im Verlauf der Tamoxifen-Behandlung nicht signifikant reguliert.

3.3.2. Knock-out des *Dohh*-Allels *in vitro*: Effekt auf die Hypusinmodifikation von eIF-5A1

Anschließend sollte der Effekt des *Dohh*-KOs auf die Hypusinierung von eIF-5A1 untersucht werden. Dazu wurden 2D-Western Blots aus Lysaten der Tamoxifen-behandelten *Dohh*^{flox/flox}; CreEsr1⁺ Zellen angefertigt (Abb. 3.22). Um die Auswirkung des DOHH-KOs mit der der DHS-Inhibition zu vergleichen, wurden weitere Zellen desselben Genotyps drei Tage mit 50 μM des DHS-Inhibitors N1-Guanyl-1,7-Diaminheptan (GC7) behandelt. Auf den 2D-Western Blots war zu sehen, dass die Stärke des einzelnen eIF-5A1-Signals, das 2D-Western Blots normalerweise aufweisen und das hypusiniertes eIF-5A1 repräsentiert (Abb. 3.22: unbehandelte Zellen (0d), vgl. auch Chen *et al.*⁵⁸), im Laufe der Behandlung abnahm.

Stattdessen tauchte in Richtung eines niedrigeren isoelektrischen Punkts (pI) ein zweites Signal auf, das mutmaßlich deoxyhypusiniertes eIF-5A1 (eIF-5A1_{Dhp}) repräsentierte^{28,129}. Am Tag neun der Behandlung war dieses Signal erstmals stärker als das ursprünglich detektierte des reifen eIF-5A1. Nach der Behandlung mit GC7 erschien ein drittes Signal mit noch etwas niedrigerem pI, das vermutlich unhyposiniertes eIF-5A1 (eIF-5A1_{Lys}) repräsentierte. Durch Mischung gleicher Proteinmengen der Lysate der GC7- und 4-OHT-behandelten Zellen wurde deutlich, dass die beiden Signale der *Dohh*-KO Zellen den beiden Signalen der GC7-Zellen mit höherem pI entsprachen.

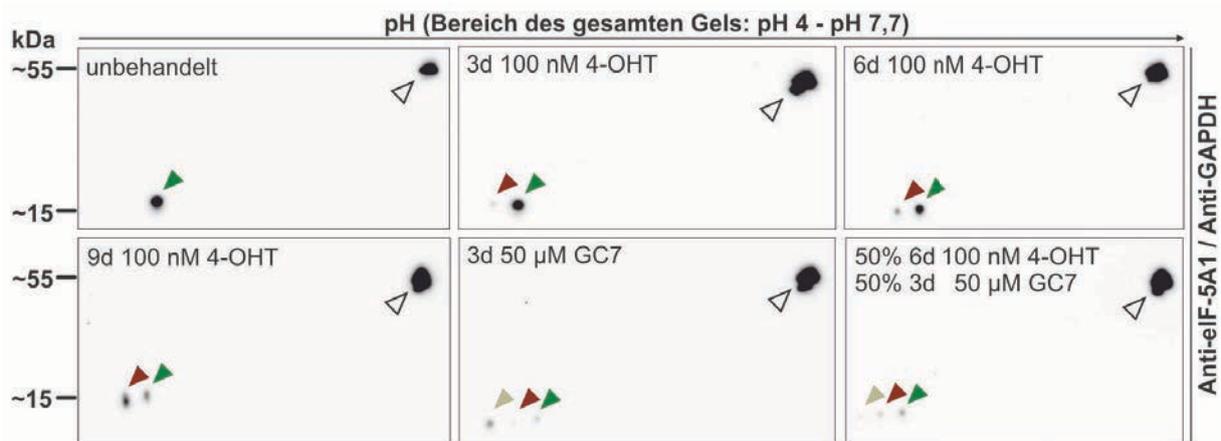


Abbildung 3.22: 2D-Western Blots zur Untersuchung der Hypusinierung von eIF-5A1 nach *Dohh*-KO. Zellen mit dem Genotyp *Dohh*^{flox/flox};CreEsr⁺ wurden wie angegeben behandelt. Signale der 2D-Western Blots wurden erst mit dem Anti-eIF-5A1 Antikörper und anschließend mit dem Anti-GAPDH Antikörper detektiert. Für den Blot unten rechts wurde dieselbe Proteinmenge wie für die anderen verwendet, aber zusammengesetzt jeweils zur Hälfte aus den Lysaten 4-OHT- und GC7-behandelter Zellen. Leere Dreiecke markieren das GAPDH-Signal. Grüne Dreiecke repräsentieren eIF-5A1_{Hyp}, rote symbolisieren eIF-5A1_{Dhp} und gelbe markieren eIF-5A1_{Lys}.

3.3.3. *In vitro* Knock-out des *Dohh*-Allels: Effekt auf die Proliferation

Um den Effekt der fehlenden DOHH auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurden Zellen mit *Dohh*^{flox/flox}-Genotyp, sowohl mit dem pMSCV puro CreEsr1 Expressionsvektor als auch mit der Leervektorkontrolle über mehrere Passagen mit 100 mM 4-OHT im Kulturmedium behandelt und ihr Wachstum über den Zeitraum jeweils einer Passage ermittelt (Abb. 3.23a). Dabei wurde im Vergleich zur Leervektorkontrolle ab der zweiten Passage (Tag sechs) bereits ein deutlicher, statistisch signifikanter Unterschied festgestellt, der bis zur vierten Passage (Tag zwölf) andauerte und im weiteren Verlauf weniger stark ausgeprägt war. Diese Beobachtung entsprach etwa dem Verlauf der *Dohh*-Expression (vgl. Abb. 3.21). Des Weiteren war die Wachstumsrate der unbehandelten Zellen mit dem CreEsr1-Expressionsplasmid gegenüber der Kontrolle ebenfalls leicht beeinträchtigt. Dies könnte zum einen durch den Wachstumsnachteil zu erklären sein, den die Integration des Cre-Esr1- im Gegensatz zum

Kontrollvektor mit sich bringt, zum anderen aber auch durch die oben beschriebene basale Rekombinaseaktivität in unbehandelten CreEsr1⁺ Zellen.

In der lichtmikroskopischen Analyse traten im Laufe der Behandlung zunehmend Zellen mit einer gegenüber normalen Zellen vielfach erhöhten Oberfläche auf. Nach Färbung der Zellen mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 sah man stark vergrößerte und teilweise polynukleäre Zellkerne (Abb. 3.23b). Kontrollzellen ohne CreEsr1-Expression zeigten diese Veränderungen nicht (nicht gezeigt, vgl. Abb. 3.24). Behandelte *Dohh*-Wildtypzellen wurden durch die Behandlung unabhängig von der Expression des CreEsr1 Fusionsproteins ebenfalls nicht beeinträchtigt, (nicht gezeigt). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass der Verlust der DOHH in murinen Fibroblasten einen Proliferationsarrest auslöst.

3.3.4. Knock-out des *Dohh*-Allels *in vitro*: Zelluläre Seneszenz

Um aufzuklären, ob der beobachtete Effekt des *Dohh*-KOs auf das Zellwachstum auf zelluläre Seneszenz zurückzuführen ist, wurden unbehandelte und behandelte 3T3^{Δ*Dohh*}-Zellen sowie entsprechende Kontrollzellen fixiert und auf seneszenz-assoziierte (SA) β-Galaktosidase gefärbt. Bei dieser Methode werden

Zellen mit hoher β-Galaktosidase Aktivität durch die Spaltung von ihrem Substrat X-Gal blau angefärbt. Abbildung 3.24a zeigt die statistische Auswertung von drei Replikaten, wobei jeweils ein Bildausschnitt mit ca. 150 bis 200 Zellen gezählt wurde. Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der jeweiligen Versuchsergebnisse sind in Abbildung 3.24b

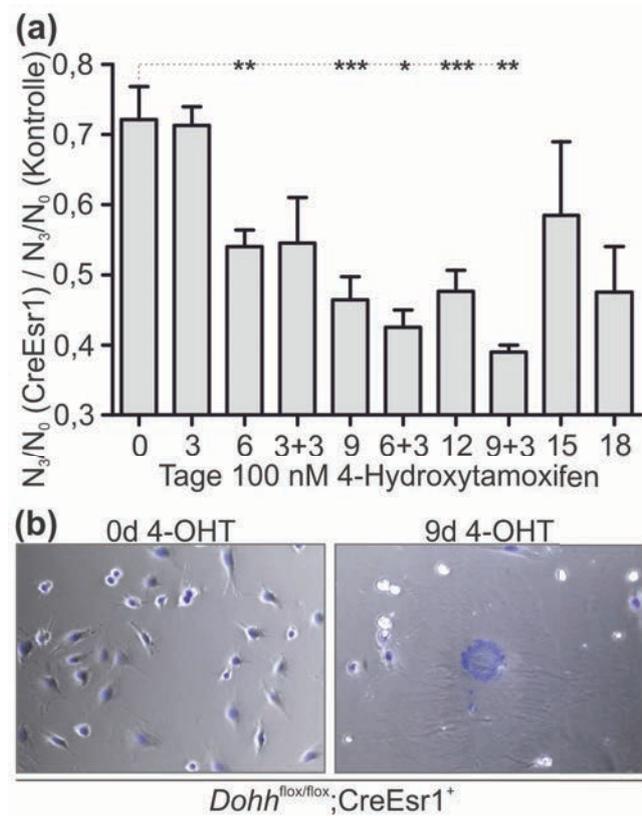


Abbildung 3.23: Zellwachstum und Morphologie nach *Dohh*-KO. (a) Zellen wurden nach dem 3T3-Protokoll¹¹⁴ passagiert und wie angegeben behandelt. Die Zellzahl zum Zeitpunkt der Passage beider Genotypen wurde auf die eingesetzte Zellzahl normiert (N_3/N_0) und der Wert der CreEsr1-exprimierenden Zellen relativ zum Wert der Kontrollzellen ausgedrückt. Anschließend wurde die statistische Signifikanz der Abweichung behandelter Zellen von den unbehandelten Zellen ermittelt (*one-way* ANOVA). (b) Lichtmikroskopische Aufnahmen der morphologischen Veränderungen, ausgelöst durch den *Dohh*-KO. Viele behandelte Zellen vergrößerten ihr Zellvolumen und ihre -oberfläche um ein Vielfaches. Auch der Zellkern (blaue Färbung durch Hoechst 33342) war deutlich vergrößert und teilweise polynukleär. Die Behandlung mit 4-OHT führte in Zellen ohne CreEsr1-Expression nicht zu morphologischen Veränderungen (nicht gezeigt).

dargestellt. Es war deutlich zu sehen, dass die Rate positiv gefärbter Zellen in allen Kontrollzellen unabhängig von der Behandlungsdauer konstant blieb. Die CreEsr1-exprimierenden Zellen wiesen dagegen im Vergleich zu unbehandelten und Kontrollzellen nach sieben und zehn Tagen 4-OHT eine deutlich erhöhte Rate positiver Färbung auf (Faktor 2,1 bzw. 1,6). Diese Unterschiede waren statistisch signifikant. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen zur *Dohh*-Expression und der Wachstumsrate sank der Anteil positiver Zellen nach zwölf Tagen Behandlung wieder ungefähr auf das Ausgangsniveau. Die positive

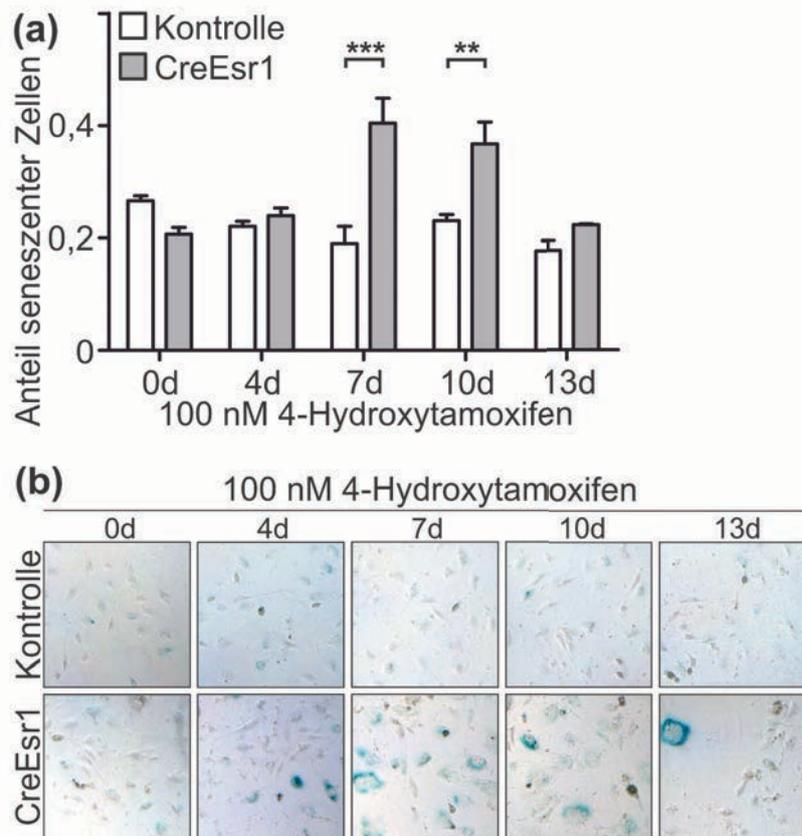


Abbildung 3.24: Bestimmung der zellulären Seneszenz nach *Dohh*-KO durch Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase Färbung. (a) Behandelte Zellen wurden in Triplikaten ausgesät und am nächsten Tag verwendet. Von jedem Triplikat wurde eine repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme gemacht und der Anteil positiver Zellen an der Gesamtzellzahl durch Auszählen bestimmt. Die statistische Signifikanz der Abweichung behandelter Zellen von der jeweiligen Kontrolle wurde bestimmt (*Two-way ANOVA* mit Bonferroni *post-test*). (b) Bildausschnitte der angefertigten SA- β -Gal Färbungen.

SA- β -Gal Färbung der KO-Zellen ist ein Hinweis auf zelluläre Seneszenz. Dabei werden die seneszenten Zellen offenbar von normal proliferierenden, 4-OHT-insensitiven *Dohh*^{flox/flox} Zellen überwachsen.

3.3.5. Knock-out des *Dohh*-Allels *in vitro*: Zellzyklusanalyse

Als nächstes wurde untersucht, ob sich der beobachtete, mutmaßlich auf zelluläre Seneszenz zurückzuführende Phänotyp in der Zellzyklusanalyse nachvollziehen und charakterisieren ließ. Dazu wurden unbehandelte und unterschiedlich lang behandelte Zellen drei Tage nach der letzten Passage mit Propidiumiodid (PI) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3.25). Dabei wurde beobachtet, dass ein Teil der behandelten Zellen (ca. 25-35%) des *Dohh*^{flox/flox};CreEsr1⁺-Genotyps einen DNA-Gehalt hatten, der ungefähr dem tetraploiden Zustand entsprach. Dieser wird im Rahmen der Zellteilung normalerweise am Ende der S-

Phase erreicht und halbiert sich im Rahmen der Mitose (M-Phase) wieder, kann aber auch durch Dysregulation von Zellzyklus und DNA-Synthese im Rahmen der Seneszenz hergestellt werden (siehe Diskussion). Dieser Effekt war von Tag sieben bis Tag zehn der Behandlung am stärksten ausgeprägt und ging bis Tag 13 wieder zurück. Zellen der Leervektorkontrolle zeigten während der Behandlung keine Veränderung. Die Abnahme tetraploider Zellen korrespondierte mit dem klonalen Auswachsen der mutmaßlich 4-OHT-insensitiven Zellen, gemessen an Zellwachstum (N_3/N_0) sowie DOHH- und *Dohh* mRNA-Gehalt.

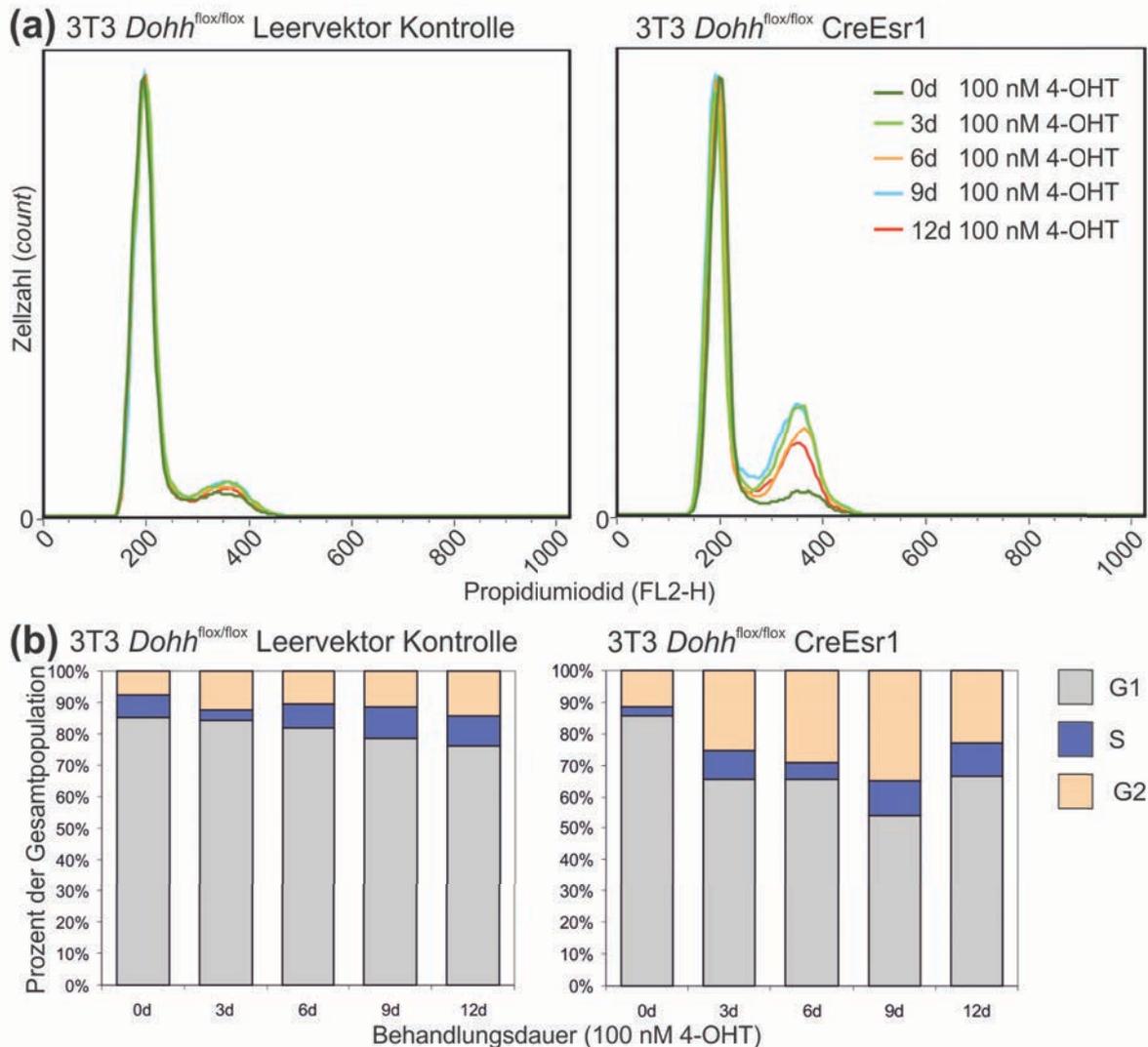


Abbildung 3.25: Propidiumiodid (PI)-Färbungen nach *Dohh*-KO zur Zellzyklusanalyse. (a) Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse nach der PI-Färbung. Normale Zellkerne (2n) erreichen eine Fluoreszenzintensität von ca. 200 (willkürliche Einheiten), tetraploide bzw. G₂-diploide Zellkerne (4n) ca. 400. (b) Gestapeltes Säulendiagramm der Zellzyklusverteilung nach *Dohh*-KO. Die Histogramme der PI-Färbungen wurden in FlowJo (Treestar, Ashland, OR) ausgewertet (Zellzyklus nach Dean-Jett-Fox¹³⁰). Die Gesamtpopulation (100%) bezieht sich auf lebende Einzelzellen (Selektiert durch Gates in den FSC/SSC- und FL3-W/FL3-A-Plots der FACS-Analyse).

3.4. Bestimmung des Hypusin-Interaktionsnetzwerks

Die Vermittlung vieler zellulärer Proteinfunktionen erfolgt nicht durch ein jeweils einziges Protein, sondern durch die spezifischen, komplexen Wechselwirkungen vieler verschiedener Proteine. Kennt man die verschiedenen Bindungspartner eines Zielproteins, kann man durch die Analyse der Funktionen der Bindungspartner versuchen, Erkenntnisse über die Funktion des Zielproteins zu gewinnen. Darüber hinaus kann die Kenntnis zellulärer Bindungspartner eines Proteins auch helfen, die molekularen Mechanismen zu erkennen, über die seine Funktionen vermittelt werden. Im Fall von eIF-5A und den Enzymen der Hypusinsynthese ist die Aufklärung sowohl der Mechanismen der unterschiedlichen eIF-5A-Funktionen als auch neuer, bisher unbekannter Funktionen aller Proteine erstrebenswert (vgl. Abschnitt 1.4). Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit befasste sich daher mit den Protein-Protein Interaktionen (PPI) von eIF-5A1, eIF-5A2, DHS und DOHH sowie der Erstellung eines Interaktionsnetzwerkes für diese Proteine.

3.4.1. Etablierung eines hochsensitiven Assays zur Ermittlung von Protein-Protein Interaktionen: ‚Bioreaktor-TAP-MS/MS‘

Das Protein eIF-5A übt eine Vielzahl verschiedener Funktionen aus. Die Hauptfunktion liegt vermutlich in der Regulation der Proteintranslation, und es wurde bereits gezeigt, dass ein Teil an Ribosomen und Polyribosomen gebunden vorliegt¹³. Weiterhin wurde gezeigt, dass eIF-5A sowohl im Kern als auch im Zytoplasma lokalisiert ist. Es ist daher naheliegend, dass dieses Protein für die Regulation verschiedener Mechanismen auch verschiedene Interaktionen eingeht.

Für die Adressierung dieser Fragestellung wurde daher eine Methode benötigt, die einerseits hochsensitiv in der Identifikation von PPI ist, gleichzeitig aber eine niedrige falsch-positive Erkennungsrate aufweist. Eine gängige Methode, die häufig in Säugerzellen Anwendung findet, ist die Affinitätsaufreinigung von Proteinkomplexen (vgl. Abschnitt 1.5.1.). Für die hier bearbeitete Fragestellung wurde die Tandemaffinitätsaufreinigung (*tandem affinity purification*, TAP) mit anschließender Identifikation der aufgereinigten Proteine durch Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) angewandt. Bei dieser Methode wird ein *Tag* verwendet, das nach dem Binden an eine Matrix spezifisch eluiert werden und anschließend mit einer weiteren Region des *Tags* an eine zweite Matrix gebunden werden kann (vgl. Abschnitt 2.2.6). Die verschiedenen Schritte des für die vorliegende Arbeit etablierten Protokolls sind in Abbildung 3.26 dargestellt und kurz erläutert. Für die Aufreinigung wurde ein von Bürckstümmer *et al.* entwickeltes System verwendet, das auf einer Domäne des

Proteins G und dem Streptavidin-bindenden Peptid (SBP) sowie der Aktivität der TEV-Protease beruht¹³¹.

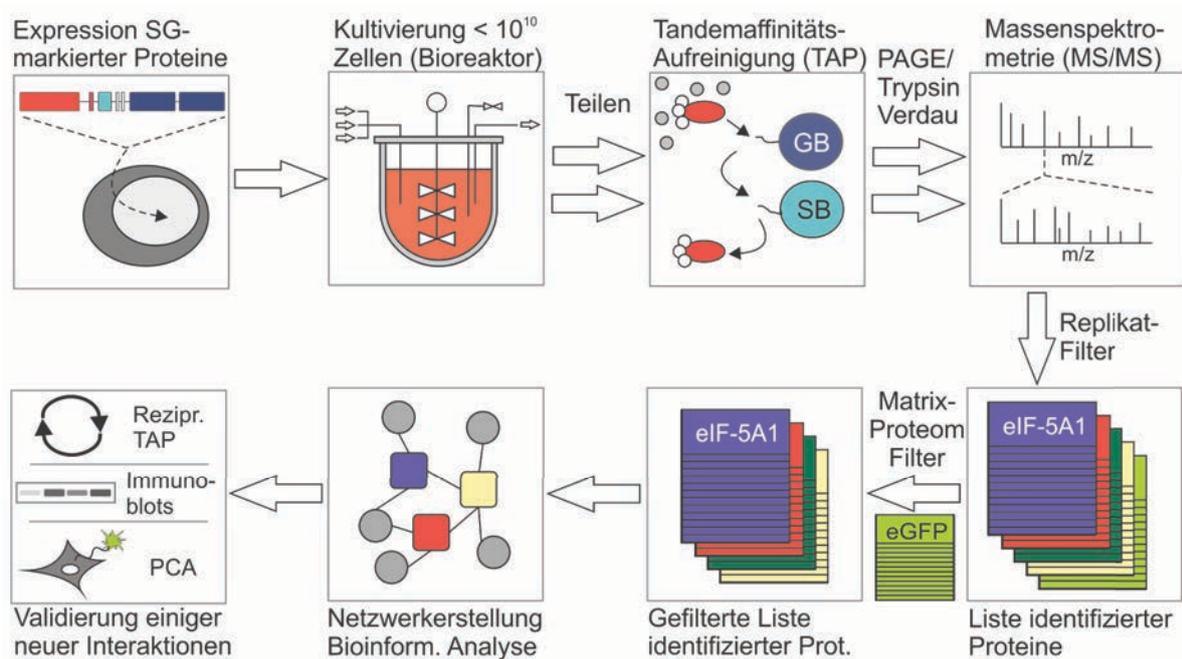


Abbildung 3.26: Schematische Darstellung des Bioreaktor-TAP-MS/MS Protokolls mit anschließender Netzwerkanalyse und Validierung. BaF/3 p210 Zellen wurden retroviral mit pCeMM (SG) Expressionskonstrukten transduziert und die *Bait*-Proteine dadurch stabil exprimiert. Pro Zelllinie wurden bis zu 10^{10} Zellen in einem 5 l-Bioreaktor kultiviert, in Replikate aufgeteilt und als Ausgangsmaterial zur TAP-Aufreinigung verwendet. Die Eluate wurden im Gel über 2 bis 4 cm aufgetrennt (PAGE) und die enthaltenen Proteine im FTICR-Massenspektrometer identifiziert. Die Datensätze wurden zweifach gefiltert (Matrix-Proteom und technische Replikate) und durch Anreicherung mit bereits bekannten Interaktionen der verbliebenen Proteine ein Interaktionsnetzwerk erstellt. Schließlich wurden einzelne neu identifizierte Interaktionen validiert. GB = IgG-Beads; SB = Streptavidin-Beads; PCA = *protein fragment complementation assay*.

Dabei wird die kodierende Sequenz der cDNA des *Bait*-Proteins so in das pCEMM (SG) Plasmid kloniert, dass das entstehende Fusionsgen ein Protein kodiert, das aus dem *Bait*-Protein und einem C-terminalen TAP-Tag besteht. Für die Bioreaktor-TAP-MS/MS Experimente wurden fünf Konstrukte hergestellt und stabil in Zellen der BaF/3 p210 Zelllinie transduziert: eIF-5A1-CTAP (SG), eIF-5A2-CTAP (SG), DHS-CTAP (SG), DOHH-CTAP (SG) und eGFP-CTAP (SG).

Zusätzlich wurden Punkt- und Deletionsmutanten von eIF-5A1 und eIF-5A2 hergestellt, um in Folgeexperimenten auch den Einfluss der Hypusinmodifikation auf identifizierte PPI untersuchen zu können. Dabei handelte es sich um die Mutanten K50R (Austausch des hypusinierten Lysinrestes durch Arginin) und G52A (Austausch des Glycinrestes durch Alanin an der Position 52) sowie mit den Aminosäuren 1-83 bzw. 84-154 der N- und C-Terminus des Proteins (Abb. 3.27a). Durch Western Blot-Analyse wurde überprüft, ob die Konstrukte effizient und auf vergleichbarem Niveau exprimiert wurden (Abb. 3.27b). Für die

Punktmutanten konnte bereits gezeigt werden, dass diese nicht bzw. kaum hypusiniert werden¹³². Ein kürzlich erschienenes Modell humanen eIF-5As zeigt, dass sich das Protein in zwei strukturell sowie funktionell voneinander verschiedene Domänen aufteilt, die sich an den Aminosäuren 83 und 84 treffen¹³³.

Das eGFP-CTAP (SG) Konstrukt diente als Negativkontrolle: Alle Proteine, die in TAP-Eluaten der BaF/3-p210-eGFP-CTAP (SG) Zelllinie identifiziert wurden, wurden als ‚Matrix-Proteom‘, also als *baitunabhängig* klassifiziert. Diese Negativliste wurde dann von allen anderen Datensätzen subtrahiert. Um die Spezifität der identifizierten Proteine weiter zu erhöhen, wurden alle Proteinlysate

zu Beginn der TAP-Aufreinigungen in zwei gleiche Teile aufgeteilt und im weiteren Verlauf separat behandelt. Auf diese Weise entstanden technische Replikate des gesamten Vorgangs von der Aufreinigung bis hin zur massenspektrometrischen Identifikation der aufgereinigten Proteine. Für die weitere Analyse wurden alle Proteine entfernt, die nicht in beiden technischen Replikaten mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 95% identifiziert werden konnten. Diese Kontrolle diente somit dem Ausschluss von *bait*- und matrixunspezifisch aufgereinigten Proteinen, also Verunreinigungen, die trotz der zahlreichen Waschvorgänge nicht entfernt werden konnten. Zusammen genommen wurden zwei Filter angewandt um sowohl matrixspezifische als auch matrixunspezifische Verunreinigungen der TAP-Eluate zu identifizieren und von der weiteren Analyse auszuschließen.

Aufgrund der bei jedem Schritt entstehenden Verluste war es notwendig, relativ hohe Mengen an Material einzusetzen. Gängige Protokolle aus Säugersystemen setzen üblicherweise zwischen 5×10^7 und 10^8 Zellen ein^{131,134}. Da im Fall von eIF-5A zu erwarten war, dass die einzelnen PPI in einem für die Detektion ungünstigen Maßstab vorliegen, und gerade diese – bisher unbekannt – Interaktionen in dieser Arbeit aufgeklärt werden sollten, wurde die beschriebene TAP-Methode für diesen Zweck angepasst. Dafür sollte die für die Aufreinigung eingesetzte Zellzahl um bis zu zwei dezimale Größenordnungen auf $0,5 \times 10^9$ bis

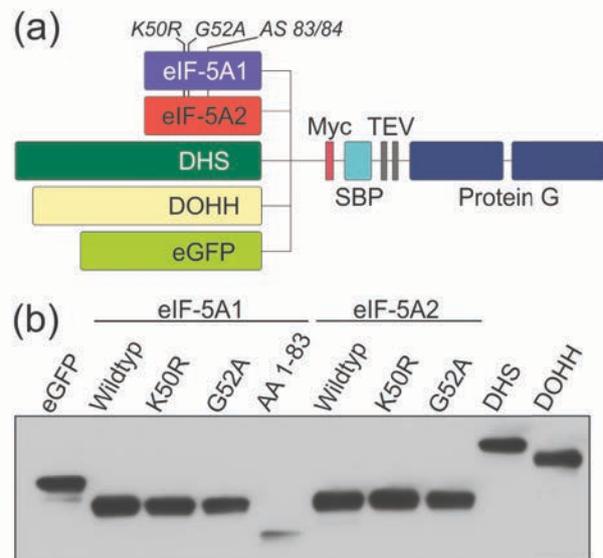
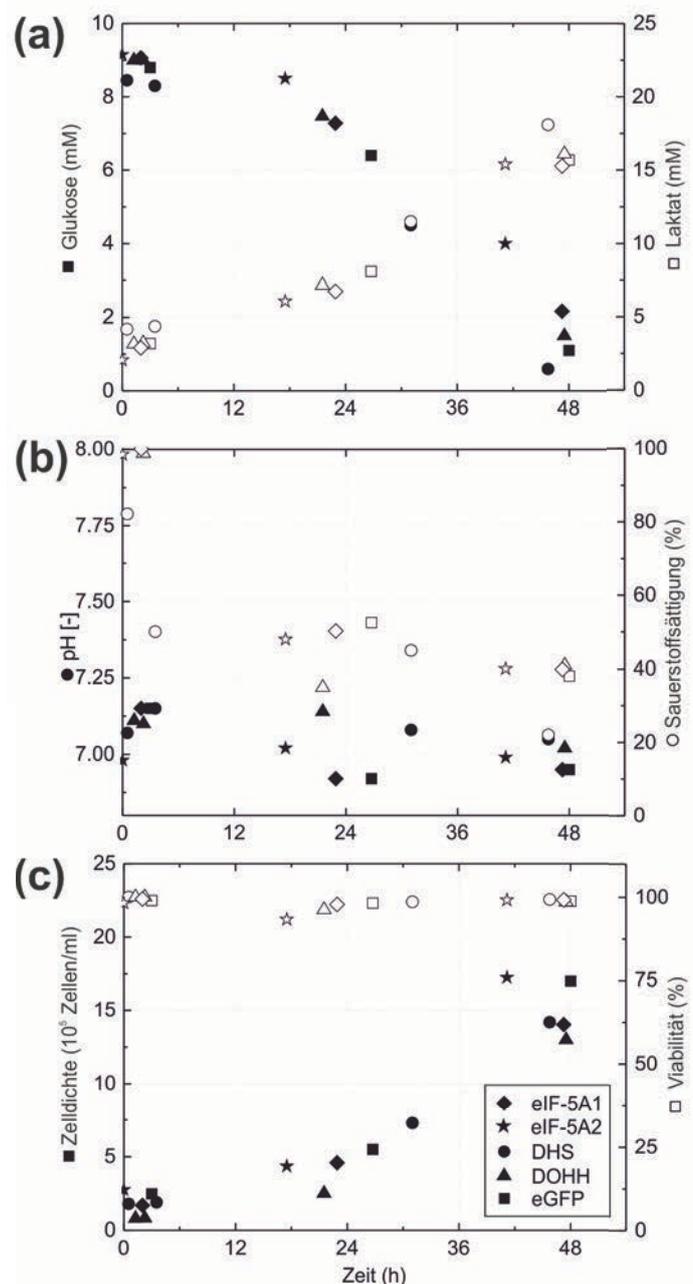


Abbildung 3.27: Struktur und Expression der pCeMM (SG) CTAP Inserts. (a) Struktur der SG-markierten Fusionsgene. Die Positionen der für die Folgeversuche erzeugten Mutationen sind kursiv beschriftet. (b) Anti-Myc-Tag Western Blot aus BaF/3 p210 Lysaten der retroviral transduzierten Zellen zur relativen Quantifikation der *Bait*-Expression.

10^{10} Zellen erhöht werden. Eine große Herausforderung bei der Kultivierung einer solchen Zellzahl ist die gleichmäßige Aufrechterhaltung der Wachstumsbedingungen. Dies ist nicht nur notwendig, um eine gute Wachstumsrate zu erreichen. Da die Umgebungsbedingungen einer Zelle einen großen Einfluss auf die intrazellulären biochemischen Vorgänge ausüben, sind vor allem regulatorisch wirkende PPI, zum Beispiel in der Signaltransduktion, stark von solchen Veränderungen betroffen. Diese Interaktionen können demnach in Abhängigkeit von den Umgebungsvariablen variieren. Es ist also sowohl für die Sensitivität als auch für die Spezifität der Ergebnisse von hoher Bedeutung, die Zellkulturbedingungen bis zum Ende der Kultivierung konstant zu halten.

Um all diese Voraussetzungen erfüllen zu können, wurde eine schnell wachsende Suspensionszelllinie (BaF/3 p210) gewählt, die in einem Bioreaktor mit einem effektiven Volumen von 5 l kultiviert wurde. Die Zelllinie stellt ein Modellsystem für die chronische myeloische Leukämie dar und wurde auch deshalb gewählt, weil in Vorarbeiten zu dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass eIF-5A auf ein Zellmodell dieser Erkrankung einen spezifischen Effekt ausübt⁶¹. In Abbildung 3.28 ist zu sehen, dass die Kultivierung im Bioreaktor die Messung und Anpassung des pH-

Abbildung 3.28: Verlauf der Kultivierung der BaF/3 p210 SG Zellen im Bioreaktor. Während der Kultivierung wurden von der Inokulation (Zeitpunkt 0 h) zur Ernte (ca. 48 h) täglich Proben gezogen und verschiedene Parameter bestimmt. **(a)** Messung von Glukose (schwarze Symbole) und Laktat (weiße Symbole) im Kulturmedium. **(b)** Verlauf von pH (schwarze Symbole) und Sauerstoffsättigung (weiße Symbole) des Kulturmediums **(c)** Zellwachstum schwarze Symbole) und -viabilität (weiße Symbole) während der Kultivierung. Die Abbildungen wurden freundlicherweise von Oscar Platas-Barradas (TU Hamburg-Harburg) zur Verfügung gestellt.



Wertes des Mediums sowie des gelösten Sauerstoffs (*dissolved oxygen*, DO) erlaubte. Weiterhin konnte eine Ausbeute von bis zu 10^{10} Zellen erzielt werden, bevor die im Medium enthaltene Glukose aufgebraucht und das Zellwachstum dadurch limitiert wurde. Zusammenfassend bedeutet dies, dass durch die Verwendung des Bioreaktors eine Zellzahl von 10^{10} Zellen in ca. 48 Stunden unter optimalen Bedingungen kultiviert werden konnte.

Da die Funktion von eIF-5A in hohem Maße von der Hypusinmodifikation abhängt, ist es wahrscheinlich, dass auch die PPI von eIF-5A durch seinen Hypusinstatus beeinflusst werden. Daher wurde zunächst untersucht, ob die Fusionsproteine eIF-5A-CTAP (SG) und eIF-5A2-CTAP (SG) sowie die N-terminale Deletionsmutante trotz des relativ großen *Tags* weiterhin modifiziert wurden. Dazu wurde der Einbau von radioaktiv markiertem Spermidin im ersten Schritt der Hypusinsynthese gemessen. In Abbildung 3.29a ist deutlich zu sehen, dass sowohl eIF-5A1-CTAP (SG) als auch eIF-5A2-CTAP (SG) und die Deletionsmutante eIF-5A1₁₋₈₃-CTAP (SG) im Gegensatz zu den hypusindefizienten Punktmutanten radioaktiv markiert wurden.

Die in der 1D SDS-PAGE aufgetrennten und Coomassie-gefärbten TAP-Eluate sind in Abbildung 3.29b dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass die

verschiedenen *Bait*-Proteine verschiedene Bandenmuster erzeugten. Dies deutet darauf hin, dass die beschriebene TAP-Methode es ermöglicht, spezifische PPI zu identifizieren.

3.4.2. Erstellung eines Interaktionsnetzwerkes für alle an der Hypusinsynthese beteiligten Proteine

Nachdem die beiden beschriebenen Filter auf die Liste der durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine aller TAP-Eluate angewandt worden waren, blieb eine nicht-

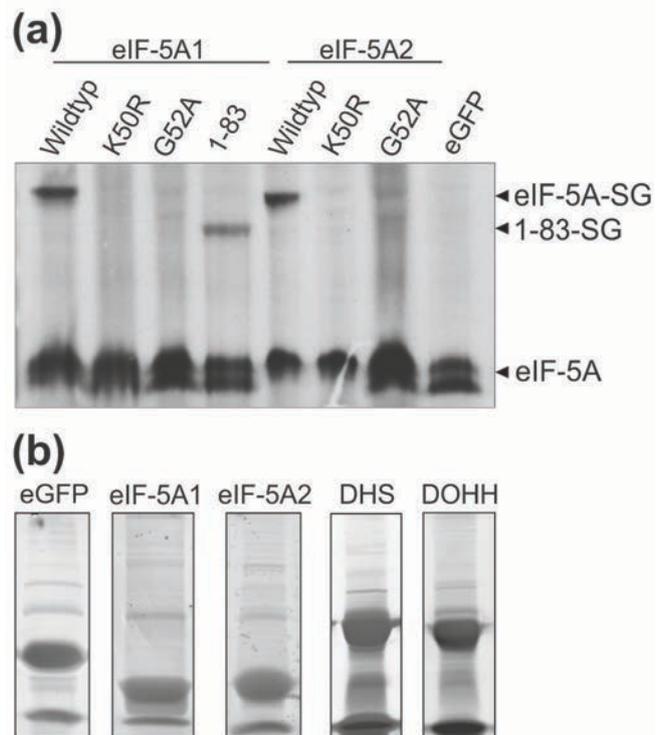


Abbildung 3.29: Einbau von radioaktiv markiertem Spermidin und PAGE der TAP-Eluate. (a) Nachweis der Hypusinierung des SG-markierten eIF-5A Proteins. Durch Zugabe von radioaktiv markiertem Spermidin wird eIF-5A als einziges Protein (im Rahmen der Hypusinierung) spezifisch markiert. Die Pfeilspitzen markieren die Position endogenen sowie zusätzlich exprimierten eIF-5As. (b) Coomassie-gefärbte Gele der in der MS/MS analysierten TAP-Eluate. Die Proben wurden per 1D-PAGE ca. 2-4 cm aufgetrennt und anschließend gefärbt.

redundante Liste mit 261 Proteinen, die mit einem oder mehreren der als *Bait* verwandten Proteine entweder direkt oder über gemeinsame Proteinkomplexe interagieren (Tabelle 3, s. Anhang). Tabelle 2 stellt diesen Prozess für den gemeinsamen sowie für die einzelnen Datensätze in Zahlen dar.

Tabelle 2: Matrix-Proteom- und Replikant-Filterprozess der einzelnen Datensätze

| Bait | Vor dem Matrix-Proteom-Filter | Nach dem Matrix-Proteom-Filter | Anteil nach dem Matrix-Proteom-Filter |
|-------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--|
| Alle | 504 | 436 | 86.5% |
| eIF-5A1 | 394 | 348 | 88.3% |
| eIF-5A2 | 130 | 105 | 80.8% |
| DHS | 61 | 31 | 50.8% |
| DOHH | 90 | 52 | 57.8% |
| eGFP | 63 | - | - |
| | Vor dem Replikatfilter | Nach dem Replikatfilter | Anteil nach dem Replikatfilter |
| Alle | 436 | 261 | 59.9% |
| eIF-5A1 | 348 | 228 | 65.5% |
| eIF-5A2 | 105 | 91 | 86.7% |
| DHS | 31 | 17 | 54.8% |
| DOHH | 52 | 20 | 38.5% |

Der direkte Vergleich der Anzahl identifizierter Interaktionspartner für die verschiedenen *Bait*-Proteine zeigte eine signifikante Überschneidung von 73 Proteinen für die beiden eIF-5A-Isoformen. Dies entspricht einem Anteil von 32% des eIF-5A1 und 80,2% des eIF-5A2 Datensatzes. Der überwiegende Teil der Proteine, nämlich 147 bzw. 64,5%, wurden ausschließlich als potentielle Interaktionspartner von eIF-5A1 identifiziert (Abb. 3.30).

Um diesen Datensatz zu strukturieren und auf seine biologische Relevanz hin zu untersuchen, wurde er auf verschiedene Arten analysiert: Zunächst wurde ein Interaktionsnetzwerk hergestellt, dass sowohl die in dieser Arbeit identifizierten als auch bereits bekannte Interaktionen beinhaltet und die miteinander in Beziehung stehenden Proteine vernetzt. Dazu wurden die Listen identifizierter Proteine in die STRING Datenbank¹¹⁸ eingespeist und von dieser auf bekannte Inter-

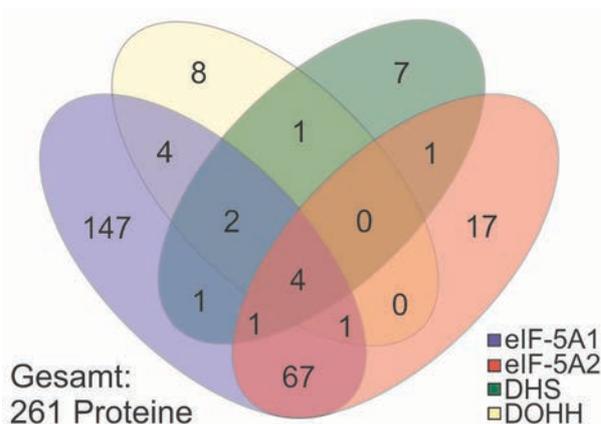


Abbildung 3.30: Übereinstimmungen zwischen den in den verschiedenen TAP-Eluat-Datensätzen identifizierten Proteinen. Das dargestellte Venn-Diagramm bildet die Überschneidungen der in den Tabellen 4 bis 7 angegebenen Bioreaktor-TAP-MS/MS Datensätze ab (siehe Anhang).

aktionen der darin enthaltenen Proteine untersucht. Weitere bereits bekannte Interaktionen wurden durch die Suche nach den *Bait*-Proteinen in der IntAct¹¹⁹ Datenbank ermittelt.

Dabei wurden an dieser Stelle nur Ergebnisse berücksichtigt, die unter Verwendung von Säugerzellen gewonnen wurden. Der direkte Vergleich der Anzahl bereits bekannter und der in dieser Arbeit identifizierten Interaktionspartner zeigt deutlich, dass die Anzahl bekannter Proteine, die potentiell in funktioneller Beziehung zu den hypusinierungsrelevanten Proteinen stehen, etwa um den Faktor 7,5 erweitert werden konnte (Abb. 3.31). Die Datenbanksuche ergab unter den beschriebenen Bedingungen nur 35 Treffer, von denen zehn auch in der vorliegenden Arbeit identifiziert werden konnten.

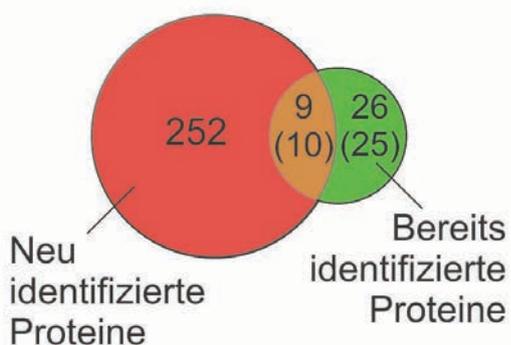
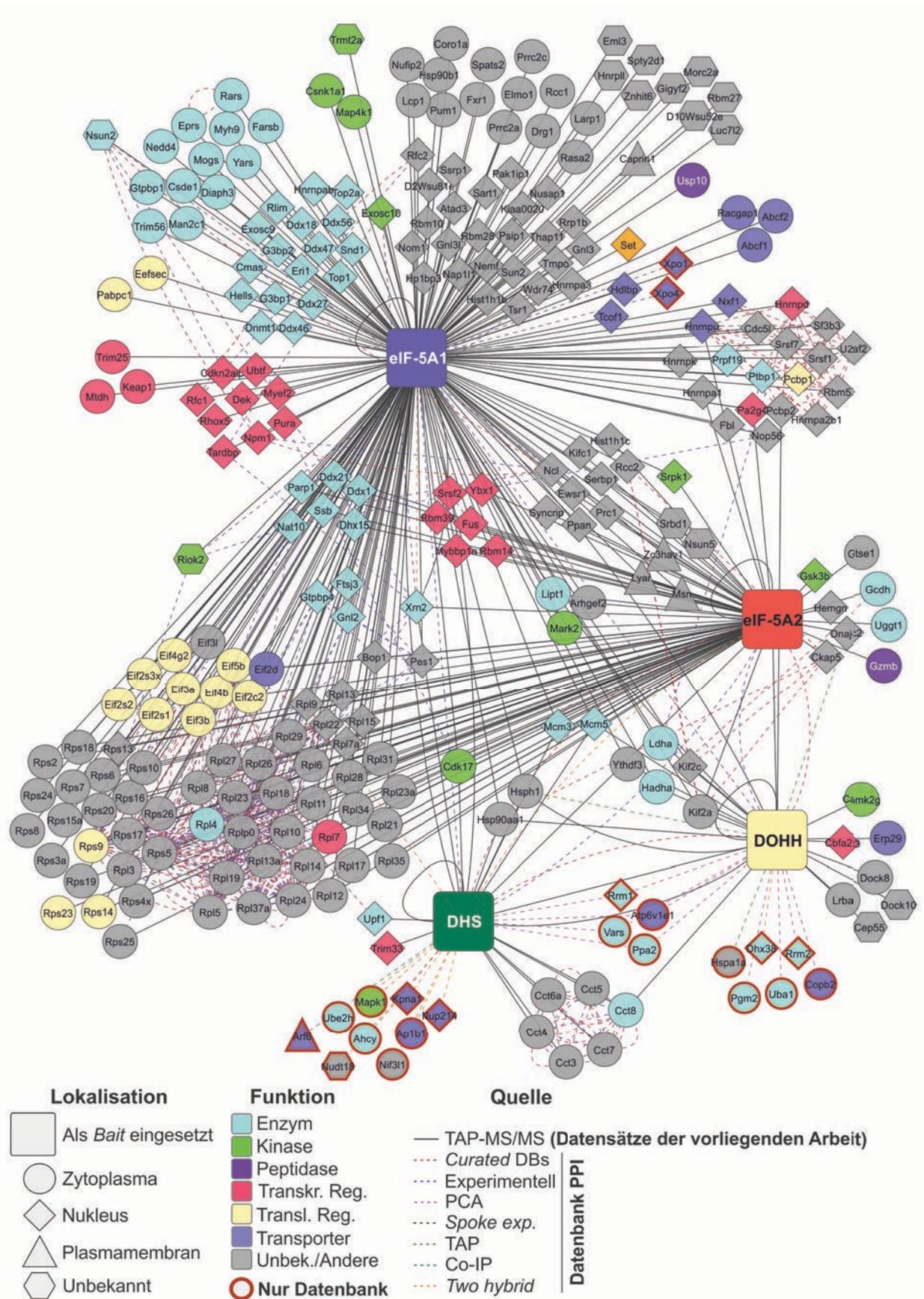


Abbildung 3.31: Übereinstimmungen und Differenzen der in der vorliegenden Arbeit und früheren Studien als Interaktionspartner der vier *Bait*-Proteine identifizierten Säugerproteine. Die Zahlen in Klammern beinhalten ein auch im Matrix-Proteom enthaltenes Protein (eEF-2). Dies wurde aufgrund dessen aus dem Datensatz entfernt. Allerdings ist möglich, dass dieses Protein nicht nur mit der Matrix, sondern auch spezifisch mit einem oder mehreren *Bait*-Proteinen interagiert.

Die Liste aller identifizierten Proteine wurde anschließend in die *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) Software importiert und von dieser mit biologischen Funktionen und intrazellulärer Lokalisation annotiert. Die gewonnenen Informationen wurden in Excel zusammengefasst, strukturiert und anschließend mithilfe der Cytoscape Software¹²⁵ in einem Interaktionsnetzwerk visualisiert (Abbildung 3.32). In der Abbildung sind Proteine, die zwar in den genannten Datenbanken als Interaktionspartner geführt, aber nicht in dieser Studie identifiziert wurden, durch einen roten Rahmen markiert. Diese Proteine wurden in der weiteren Analyse nicht berücksichtigt.

Abbildung 3.32: Protein-Protein Interaktionsnetzwerk der an der Hypusinmodifikation beteiligten Proteine. Ein aus den Datensätzen der vier *Bait*-Proteine (quadratische Knotenflächen) konstruiertes Speichennetzwerk (*spoke network*, durchgezogene Linien) wurde durch Datenbankabfragen der STRING und IntAct Datenbanken mit bekannten Interaktionen aller Knoten (gestrichelte Linien) erweitert. Hauptlokalisierung (Form der Knotenpunkte) und -funktion (Knotenfarbe) wurden der *Ingenuity Pathway Analysis* Datenbank entnommen (siehe Legende). Rot umrandete Proteine wurden nur in den verwendeten Datenbanken und nicht in dieser Arbeit identifiziert.



3.4.3. Cluster-Analyse des Protein-Protein Interaktionsnetzwerkes

Proteininteraktionsnetzwerke spiegeln zumeist die funktionellen Beziehungen von Proteinen untereinander wider. Gruppen funktionell in Beziehung stehender Proteine bilden in Interaktionsnetzwerken somit Module, so genannte *Cluster*, und die Integration eines Proteins in ein solches Modul lässt zumeist Rückschlüsse auf eine funktionale oder regulative Rolle darin zu. Das Interaktionsnetzwerk der an der Hypusinmodifikation beteiligten Proteine wurde deshalb auf Module funktionell in Beziehung stehender Proteine untersucht. Dazu wurde die Cytoscape-Erweiterung ClusterONE^{††} verwendet. Die Analyse des Gesamtnetzwerkes ergab fünf statistisch signifikante funktionelle *Cluster* untereinander hoch vernetzter Proteine (Abb. 3.33).

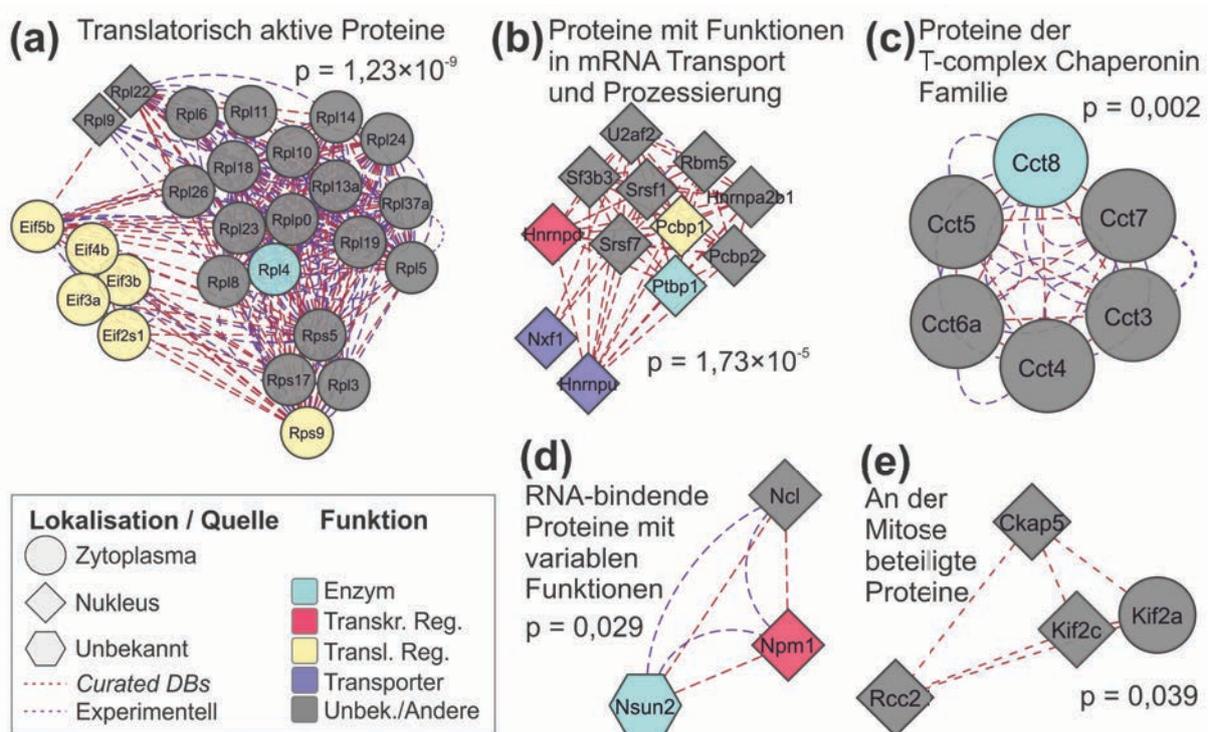


Abbildung 3.33: Cluster-Analyse des in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Netzwerkes. (a - e) Das in Abbildung 36 dargestellte Netzwerk wurde mit der ClusterONE Cytoscape-Erweiterung auf das Vorhandensein statistisch signifikanter *Cluster*bildung untersucht. Alle Cluster mit einem p-Wert unter 0,05 wurden aus dem Netzwerk extrahiert und auf gemeinsame Funktionen der enthaltenen Proteine analysiert. Die Darstellung entspricht der in Abbildung 36 (siehe Legende).

Das größte *Cluster* bestand aus 17 ribosomalen Proteinen der großen und vier Proteinen der kleinen ribosomalen Untereinheit sowie den Initiationsfaktoren eIF2s1 (eIF2 α), eIF3A und -B, eIF4B und eIF5B. Der p-Wert, der die statistische Signifikanz der Vernetzung dieser 27 Proteine angibt, betrug $1,23 \times 10^{-9}$ (Abb 3.33a). Das zweite *Cluster* bestand aus zwölf nuklear

^{††} Bisher ist keine Publikation verfügbar. Die Dokumentation und der Quellcode der Software sind einsehbar unter <http://www.paccanarolab.org/software/cluster-one/index.html>

lokalisierten Proteinen, deren gemeinsame Hauptfunktion in der Prozessierung und dem Transport von mRNAs besteht ($p = 1,73 \times 10^{-5}$), im Einzelnen waren dies U2af2, Rbm5, Sf3b3, Srsf1 und -7, Hnrnpa2bl, -d und -u, Pcbp1 und -2, Ptbp1 sowie Nxf1 (Abb. 3.33b). Weiterhin bildeten sechs Mitglieder der T-Komplex Chaperonfamilie ein drittes *Cluster* ($p = 0,002$): Cct3, -4, -5, 6a, -7 und -8 (Abb. 3.33c). Die letzten beiden *Cluster* bestanden aus den RNA-bindenden Proteinen Ncl, Npm1 und Nsun2 ($p = 0,029$, Abb. 3.33d) sowie vier an Mitose und Zellzyklusregulation beteiligten Proteinen (Ckap5, Rcc2, Kif2a und -2c; $p = 0,039$, Abb. 3.33e). Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass die wichtigsten Funktionen von eIF-5A in der Säugerzelle die Regulation der Proteinsynthese, des mRNA-Stoffwechsels und damit letztendlich der Zellteilung sind. Weiterhin liefern diese Daten Hinweise, dass die Bedeutung für das Zellwachstum sich nicht ausschließlich indirekt über Proteinsynthese und RNA-Stoffwechsel ergibt, sondern dass eIF-5A auch direkt in die Regulation des Zellzyklus eingreift. Diese Beobachtung könnte helfen, die nach der Inhibition der Hypusinsynthese beobachteten Phänotypen auf molekularer Ebene zu verstehen.

3.4.4. Gene Ontology Analyse der potentiellen Interaktionspartner von eIF-5A1, eIF-5A2, DHS und DOHH

Die Gesamtheit der in dieser Arbeit identifizierten potentiellen Interaktionspartner der eingesetzten *Bait*-Proteine (siehe Anhang, Tabelle 3) wurde durch die *Gene Ontology* (GO) Analyse auf die Anreicherung bestimmter Funktionen und biologischer Prozesse, an deren Vermittlung diese Proteine beteiligt sind, untersucht. Dazu wurden zwei Datenbanken verwendet, die auf unterschiedlichen Algorithmen beruhen: Die PANTHER Datenbank ermittelt die GO-Annotationen der in einer hochgeladenen Liste enthaltenen Proteine und stellt diese Informationen grafisch zusammen. Die GeneMANIA Datenbank erhält ebenfalls eine Liste mit Proteinbezeichnungen, erstellt aus dieser aber zunächst ein Netzwerk, das um zusätzliche Proteine erweitert wird, die mit den in der ursprünglichen Liste enthaltenen Proteinen in enger Beziehung stehen. Für dieses Netzwerk werden GO-Kategorien ermittelt und in der Reihenfolge ihrer *false discovery rate* (FDR, ausgedrückt durch q-Werte) angeordnet. Die Abbildungen 3.34 bis 3.37 zeigen die auf diese Weise ermittelten, angereicherten GO-Kategorien sowie die separaten, erweiterten Netzwerke für die in dieser Arbeit untersuchten *Bait*-Proteine. Anhand der ersten 20 GO Kategorien der GeneMANIA-Netzwerke beider eIF-5A Isoformen wurde deutlich, dass deren Interaktionspartner überwiegend Funktionen zugeordnet werden, die den Oberkategorien ‚Proteinbiosynthese‘ und ‚RNA-Metabolismus und -Prozessierung‘ zugeordnet werden (Abb. 3.34+3.35). Im Gegensatz dazu waren die für die DHS identifizierten Interaktionspartner überwiegend Funktionen aus den Bereichen ‚DNA-

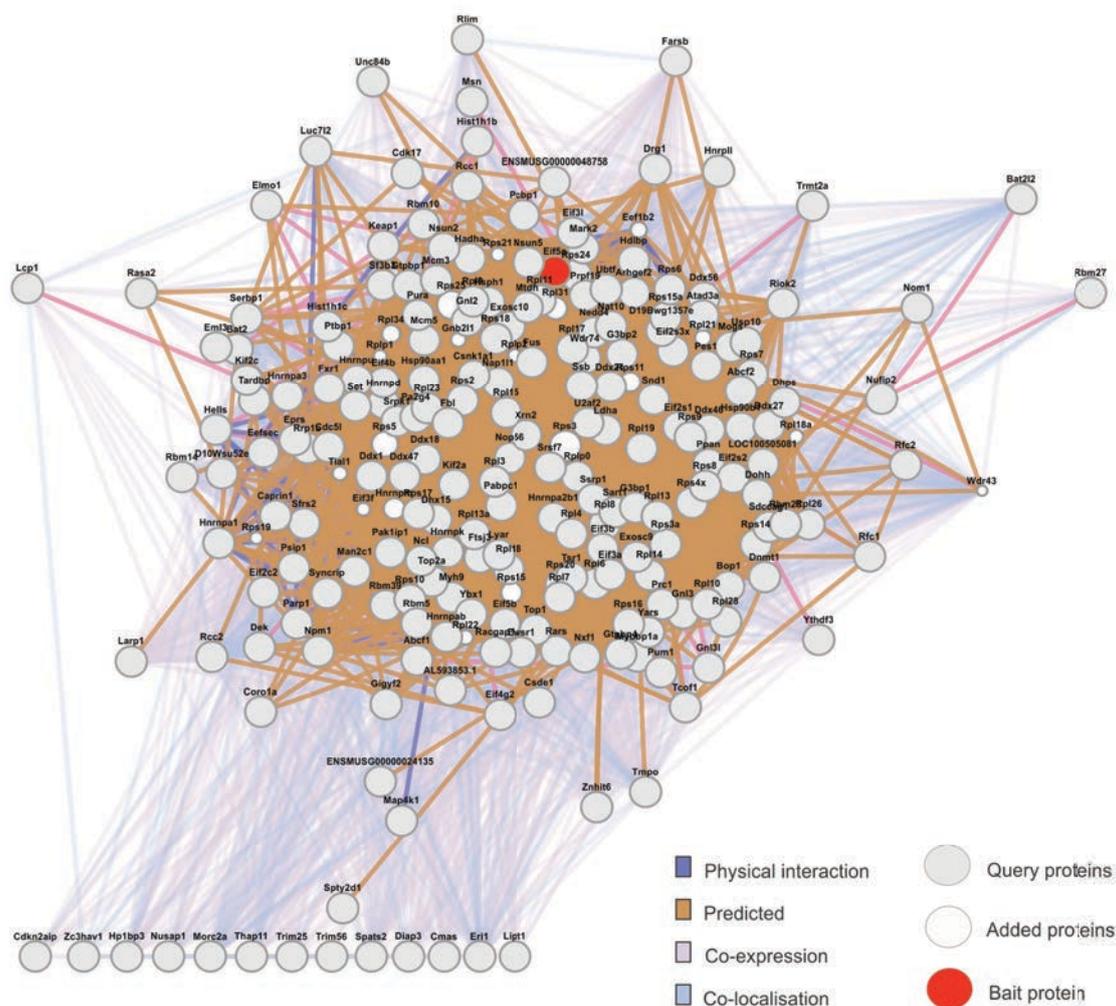
Replikation und -Transkription' sowie ‚Biosynthese und Modifikation von Aminosäuren' zugeordnet (Abb. 3.36). Die Zuordnung zu der zweiten Kategorie hängt vermutlich mit der bekannten DHS-Funktion in der Biosynthese von Hypusin zusammen und wurde auch für DOHH ermittelt. Für die Interaktionspartner der DOHH wurden außerdem die Anreicherung von Proteinen weiterer Arten des Aminosäure-Metabolismus sowie RNA-bindende und an der DNA-Replikation beteiligte Proteine gezeigt (Abb. 3.37). Durch die Analyse des Datensatzes durch die PANTHER Datenbank wurden diese Beobachtungen weitgehend gefestigt (Abb. 3.38).

Zusammen genommen unterstützen diese Ergebnisse die vorgeschlagenen Proteinfunktionen von eIF-5A in Proteinsynthese, RNA Metabolismus und Transport sowie Zellzyklusregulation. Darüber hinaus sind in den vorliegenden Datensätzen weitere Ontologien angereichert, die Hinweise auf weitere hypothetische Funktionen der untersuchten Proteine geben könnten.

Abbildungen 3.34 - 3.37: GeneMANIA-Analysen der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Interaktionspartner von eIF-5A1 (3.34), eIF-5A2 (3.35), DHS (3.36) und DOHH (3.37). (a) Der jeweilige Datensatz wurde in die GeneMANIA Datenbank importiert und von dieser automatisch um mit den eingegebenen Proteinen in funktioneller Verbindung stehende Proteine erweitert (*functional enrichment*). Die Elemente der erweiterten Liste wurden durch in der GeneMANIA Datenbank hinterlegte Interaktionen verknüpft und die hier abgebildeten Netzwerk ausgegeben. (b) Das Netzwerk wurde auf *Gene Ontology* Annotationen überprüft und überrepräsentierte Kategorien anhand ihrer *false discovery rate* (FDR, q-Wert) geordnet. Maximal 20 der Kategorien mit den niedrigsten q-Werten sind abgebildet.

Abbildung 3.38: Gene Ontology (GO) Analyse der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Interaktionspartner durch die PANTHER Datenbank. Die Matrix-Proteom- und Replikat-bereinigten Datensätze (Tabellen 3 bis 7, s. Anhang) wurden einzeln (gefärbte Balken) und kombiniert (weiße Balken) in die PANTHER Datenbank hochgeladen und automatisch auf die mit den einzelnen Elementen assoziierten GO Kategorien untersucht. Die zwei am stärksten überrepräsentierten Annotationen einer Kategorie wurden in Unterkategorien aufgegliedert (Kleine Diagramme, durch Fettdruck und graue Pfeile markiert). Die Werte sind in Prozent der Anzahl Proteine im Datensatz bzw. (für die Unterkategorien) in Prozent der Superklasse ausgedrückt. Die Anzahl der Proteine in den einzelnen Datensätzen ist in Tabelle 2 angegeben. (a) GO Analyse für die Kategorie ‚*Biological Process*' (b) GO Analyse für die Kategorie ‚*Molecular Function*'.

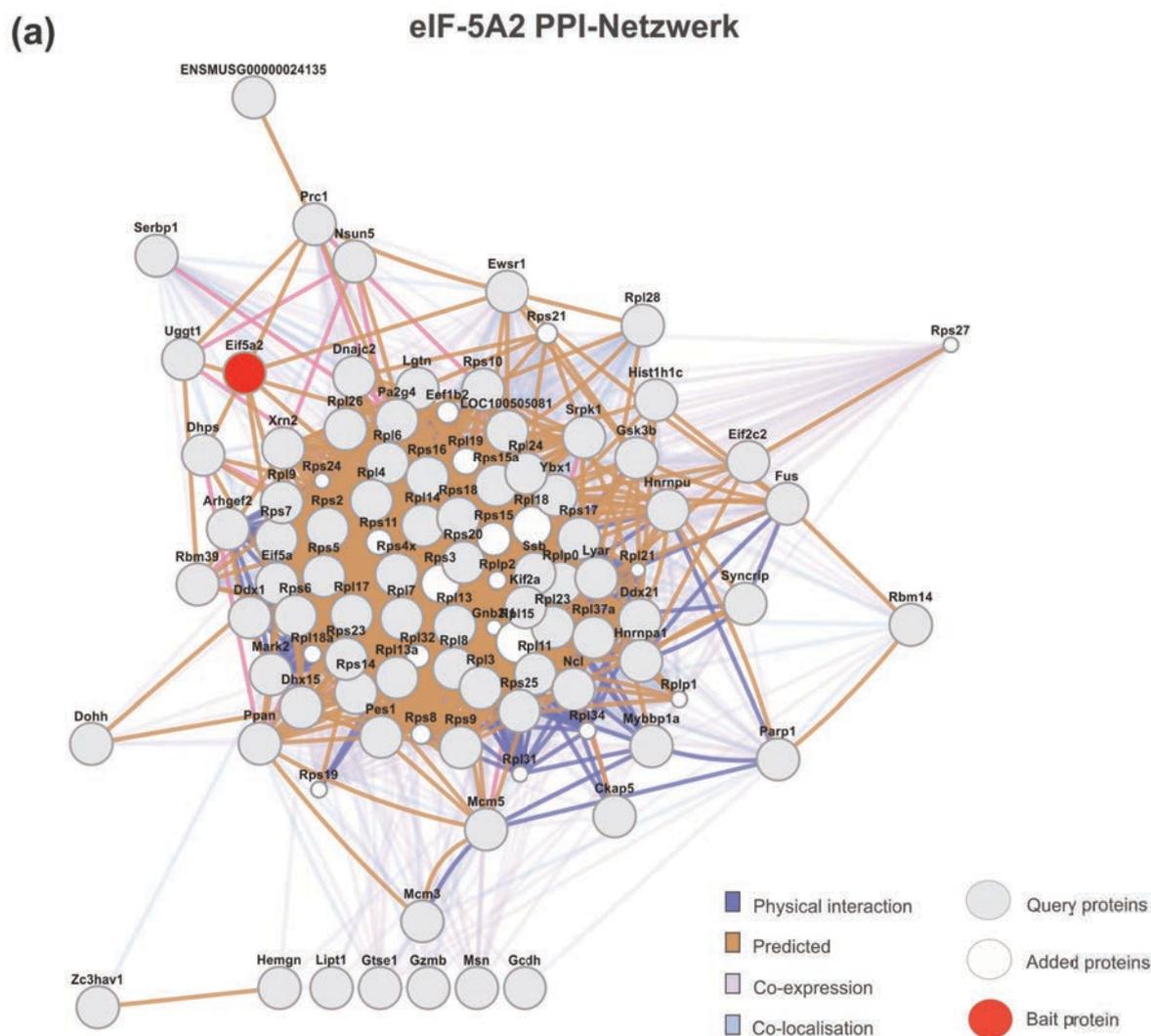
(a) eIF-5A1 PPI-Netzwerk



(b)

| Go annotation | Q-value | Genes in network | Genes in genome |
|---|----------|------------------|-----------------|
| translational elongation | 3.32E-72 | 49 | 89 |
| translation | 5.93E-70 | 63 | 237 |
| cytosolic ribosome | 1.58E-39 | 28 | 52 |
| ribosome | 5.15E-38 | 33 | 102 |
| RNA binding | 6.55E-38 | 45 | 284 |
| RNA processing | 3.91E-33 | 42 | 296 |
| cytosolic small ribosomal subunit | 2.15E-31 | 22 | 39 |
| small ribosomal subunit | 1.79E-29 | 23 | 53 |
| cytosolic part | 1.96E-29 | 28 | 105 |
| ribosome biogenesis | 1.93E-25 | 22 | 64 |
| ribonucleoprotein complex biogenesis | 2.40E-24 | 26 | 123 |
| structural constituent of ribosome | 2.84E-24 | 21 | 61 |
| cellular component biogenesis at cellular level | 1.80E-23 | 26 | 133 |
| ncRNA metabolic process | 1.50E-21 | 23 | 107 |
| rRNA metabolic process | 2.17E-21 | 18 | 48 |
| ncRNA processing | 8.16E-21 | 21 | 86 |
| rRNA processing | 1.28E-20 | 17 | 43 |
| ribosomal small subunit biogenesis | 5.78E-18 | 13 | 23 |
| RNA splicing | 6.46E-14 | 21 | 179 |
| structural molecule activity | 2.10E-13 | 21 | 190 |

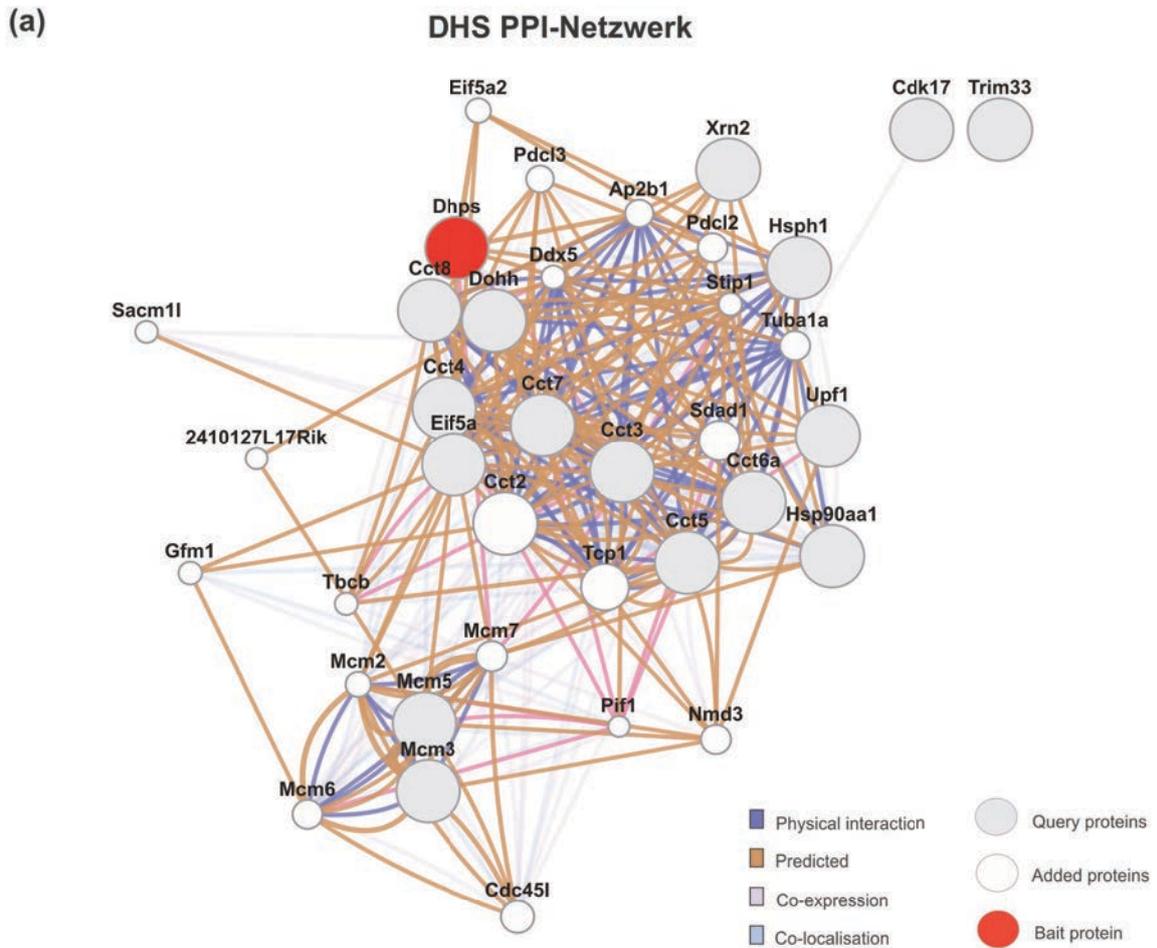
Abbildung 3.34



(b)

| Go annotation | Q-value | Genes in network | Genes in genome |
|---|----------|------------------|-----------------|
| translational elongation | 8.76E-94 | 49 | 89 |
| translation | 1.09E-72 | 51 | 237 |
| cytosolic ribosome | 2.33E-53 | 29 | 52 |
| ribosome | 7.54E-45 | 30 | 102 |
| cytosolic small ribosomal subunit | 1.74E-42 | 23 | 39 |
| cytosolic part | 1.84E-42 | 29 | 105 |
| small ribosomal subunit | 1.97E-38 | 23 | 53 |
| structural constituent of ribosome | 1.01E-36 | 23 | 61 |
| ribosome biogenesis | 2.08E-25 | 18 | 64 |
| structural molecule activity | 3.61E-24 | 23 | 190 |
| ribosomal small subunit biogenesis | 3.64E-20 | 12 | 23 |
| ribonucleoprotein complex biogenesis | 6.30E-20 | 18 | 123 |
| cellular component biogenesis at cellular level | 2.55E-19 | 18 | 133 |
| rRNA processing | 2.64E-18 | 13 | 43 |
| rRNA metabolic process | 1.28E-17 | 13 | 48 |
| ncRNA processing | 1.54E-17 | 15 | 86 |
| ncRNA metabolic process | 4.70E-16 | 15 | 107 |
| RNA processing | 9.07E-16 | 20 | 296 |
| ribosome assembly | 6.97E-12 | 7 | 11 |
| RNA binding | 5.82E-11 | 16 | 284 |

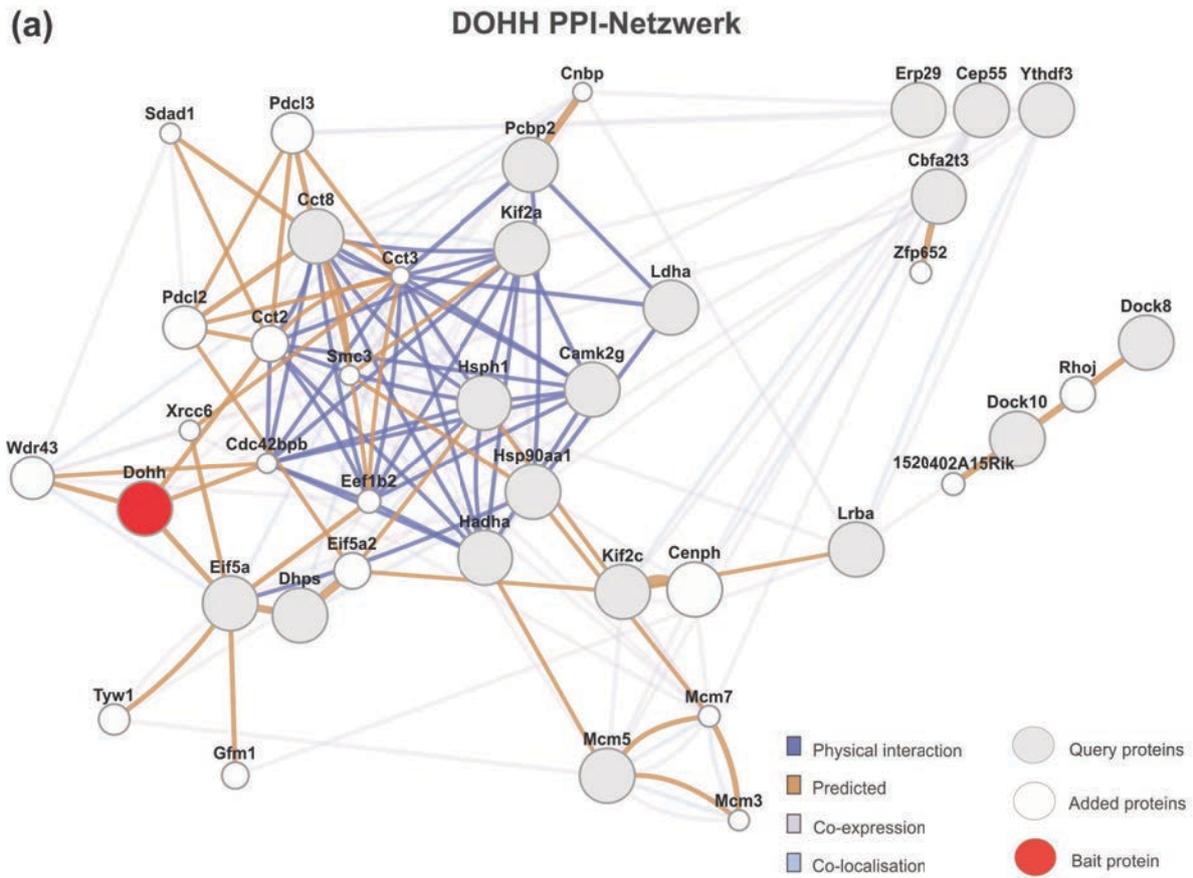
Abbildung 3.35



(b)

| Go annotation | Q-value | Genes in network | Genes in genome |
|---|---------|------------------|-----------------|
| cytosolic part | 4.98E-6 | 7 | 105 |
| helicase activity | 1.43E-5 | 5 | 32 |
| DNA replication | 4.50E-5 | 7 | 168 |
| cellular modified amino acid biosynthetic process | 5.09E-5 | 4 | 17 |
| nuclear chromosome part | 5.09E-5 | 7 | 181 |
| nuclear chromosome | 8.92E-5 | 7 | 205 |
| cellular amino acid biosynthetic process | 2.01E-3 | 4 | 44 |
| DNA duplex unwinding | 4.38E-3 | 3 | 15 |
| purine NTP-dependent helicase activity | 4.75E-3 | 3 | 17 |
| ATP-dependent helicase activity | 4.75E-3 | 3 | 17 |
| DNA geometric change | 4.75E-3 | 3 | 17 |
| nucleoside-triphosphatase activity | 5.36E-3 | 6 | 264 |
| amine biosynthetic process | 5.97E-3 | 4 | 67 |
| DNA helicase activity | 6.00E-3 | 3 | 21 |
| pyrophosphatase activity | 6.00E-3 | 6 | 286 |
| hydrolase activity, acting on acid anhydrides | 6.00E-3 | 6 | 286 |
| hydrolase activity, acting on acid anhydrides | 6.00E-3 | 6 | 286 |
| cellular modified amino acid metabolic process | 1.59E-2 | 4 | 93 |
| peptidyl-lysine modification | 2.73E-2 | 4 | 108 |
| DNA-dependent DNA replication | 6.04E-2 | 3 | 47 |

Abbildung 3.36



(b)

| Go annotation | Q-value | Genes in network | Genes in genome |
|---|---------|------------------|-----------------|
| cellular modified amino acid biosynthetic process | 3.52E-4 | 4 | 17 |
| cellular amino acid biosynthetic process | 9.72E-3 | 4 | 44 |
| amine biosynthetic process | 3.56E-2 | 4 | 67 |
| cellular modified amino acid metabolic process | 9.87E-2 | 4 | 93 |
| peptidyl-lysine modification | 1.42E-1 | 4 | 108 |
| organic acid biosynthetic process | 3.20E-1 | 4 | 150 |
| RNA binding | 3.20E-1 | 5 | 284 |
| carboxylic acid biosynthetic process | 3.20E-1 | 4 | 150 |
| DNA replication | 4.40E-1 | 4 | 168 |
| nuclear chromosome part | 5.27E-1 | 4 | 181 |

Abbildung 3.37

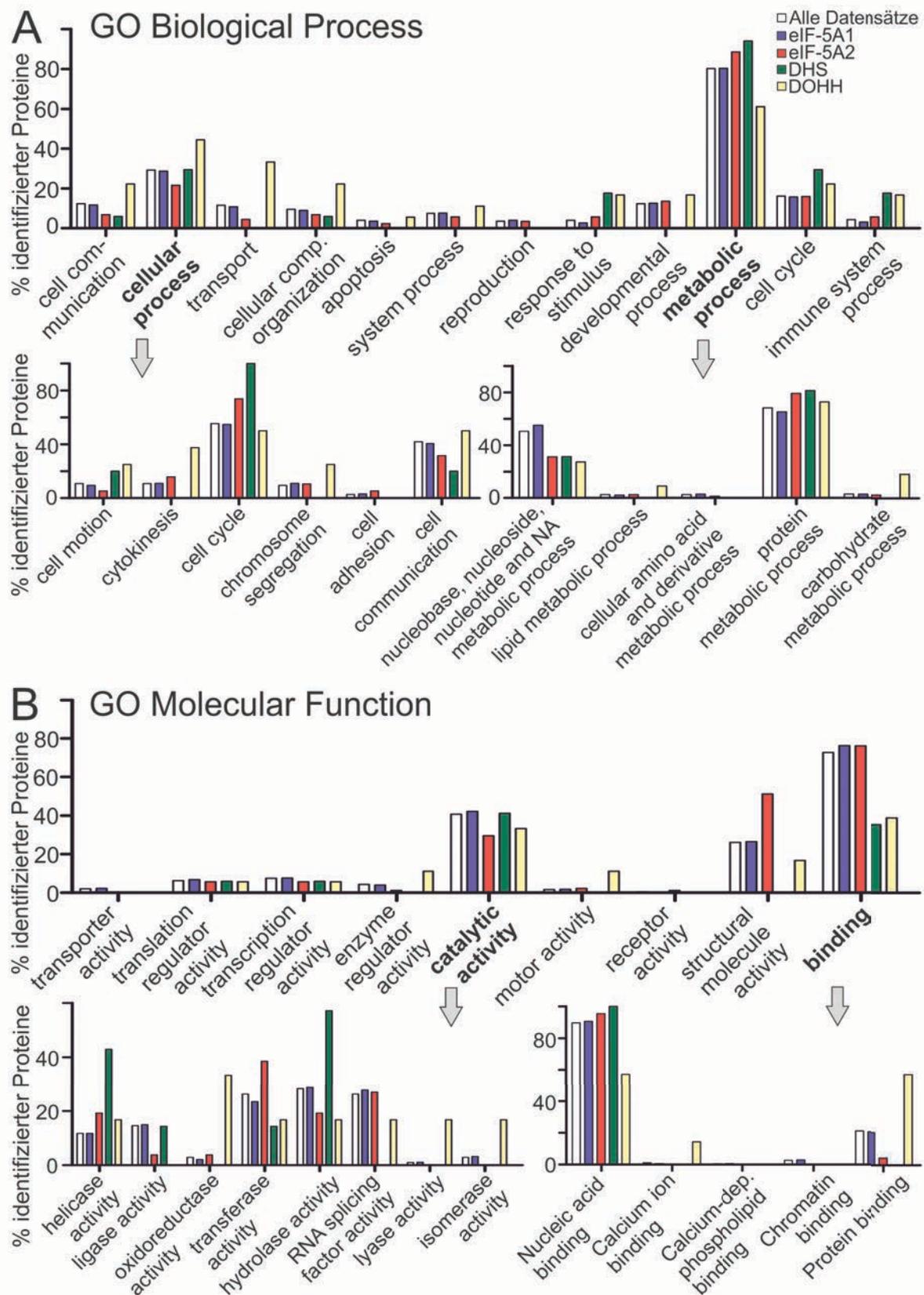


Abbildung 3.38

3.4.5. Evolutionäre Entwicklung des Interaktionsnetzwerks hypusininierungsrelevanter Proteine

Sowohl eIF-5A als auch dessen Hypusinmodifikation sind in allen bisher untersuchten Eukaryoten essentiell (vgl. Abschnitt 1.1.1) und die Proteinsequenz – insbesondere der Bereich um das modifizierte Lysin – ist hoch konserviert. Dies deutet auf eine gemeinsame, essentielle Funktion der verschiedenen eIF-5A Orthologe hin. Andererseits gibt es auch Hinweise auf eine Diversifizierung der eIF-5A-Funktion in der evolutionären Entwicklung mehrzelliger Eukaryoten, wie zum Beispiel die nicht-essentielle Rolle der DOHH in *S. cerevisiae* (vgl. Abschnitt 1.1.3). Um Hinweise auf die konservierten eIF-5A-Funktionen zu erhalten, wurde ein Vergleich der PPI der hypusinrelevanten Proteine der Hefen und Säugetiere angestellt.

Dazu wurde ein weiteres Interaktionsnetzwerk mit Hefe-Proteinen aus Datenbankinformationen zusammengestellt. Für dieses wurden in Hochdurchsatz-Experimenten mit Hefezellen ermittelte Interaktionspartner der Hefe-Orthologe von eIF-5A1 (TIF51A) und eIF-5A2 (TIF51B) sowie der DHS (DYS1) und DOHH (LIA1) aus den Datenbanken STRING und IntAct extrahiert. Auf diese Weise konnten 115 Proteine ermittelt werden. Für diese wurden wiederum über die OMA *browser* Datenbank¹²⁴ Orthologe aus Säugetieren ermittelt, was für 68 dieser 115 Proteine gelang. Von diesen 68 Proteinen fanden sich 26 bzw. 38,2% in den in dieser Arbeit erhobenen Datensätzen wieder. Drei dieser 26 Proteine waren als ‚Matrix-Proteom‘ klassifiziert und sind daher nicht im Interaktionsnetzwerk zu finden (Abb. 3.39). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese Proteine nicht nur an die für die Aufreinigung verwendete Matrix binden,

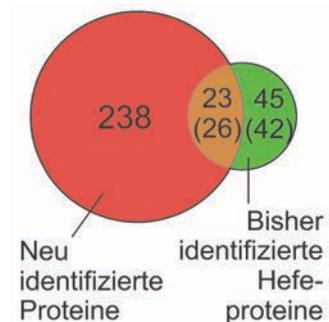


Abbildung 3.39: Übereinstimmungen und Differenzen der in dieser Arbeit und in früheren, an Hefen durchgeführten Studien identifizierten Proteine. In dieser Gegenüberstellung wurden nur Proteine aus Hefearten analysiert, für die ein Ortholog der Maus (*M. musculus*) identifiziert werden konnte. Die Zahlen in Klammern beinhalten ein auch im Matrix-Proteom enthaltenes Protein (eEF-2). Dies wurde daher aus dem Datensatz entfernt. Allerdings ist möglich, dass dieses Protein nicht nur mit der Matrix, sondern auch spezifisch mit einem oder mehreren *Bait*-Proteinen interagiert.

sondern auch spezifisch mit den *Bait*-Proteinen interagieren. Die 26 ermittelten, sich überschneidenden Hefe- und Säugerproteine wurden analog zur Herstellung des Interaktionsnetzwerks in Abschnitt 3.4.2 untereinander vernetzt und die dabei entstandenen Netzwerke miteinander verglichen (Abb. 3.40). Dabei wurde deutlich, dass die Interaktionen von eIF-5A zu ribosomalen Proteinen hoch konserviert sind und wahrscheinlich die ursprüngliche Funktion dieses Proteins widerspiegeln. Dagegen sind Interaktionspartner, die

Hinweise auf weitere Funktionen von eIF-5A geben, in der Hefe nicht gefunden worden. Eine Erklärung dieser Beobachtung wäre, dass diese Funktionen erst in der Entwicklung hin zu komplexeren Organismen entwickelt wurden.

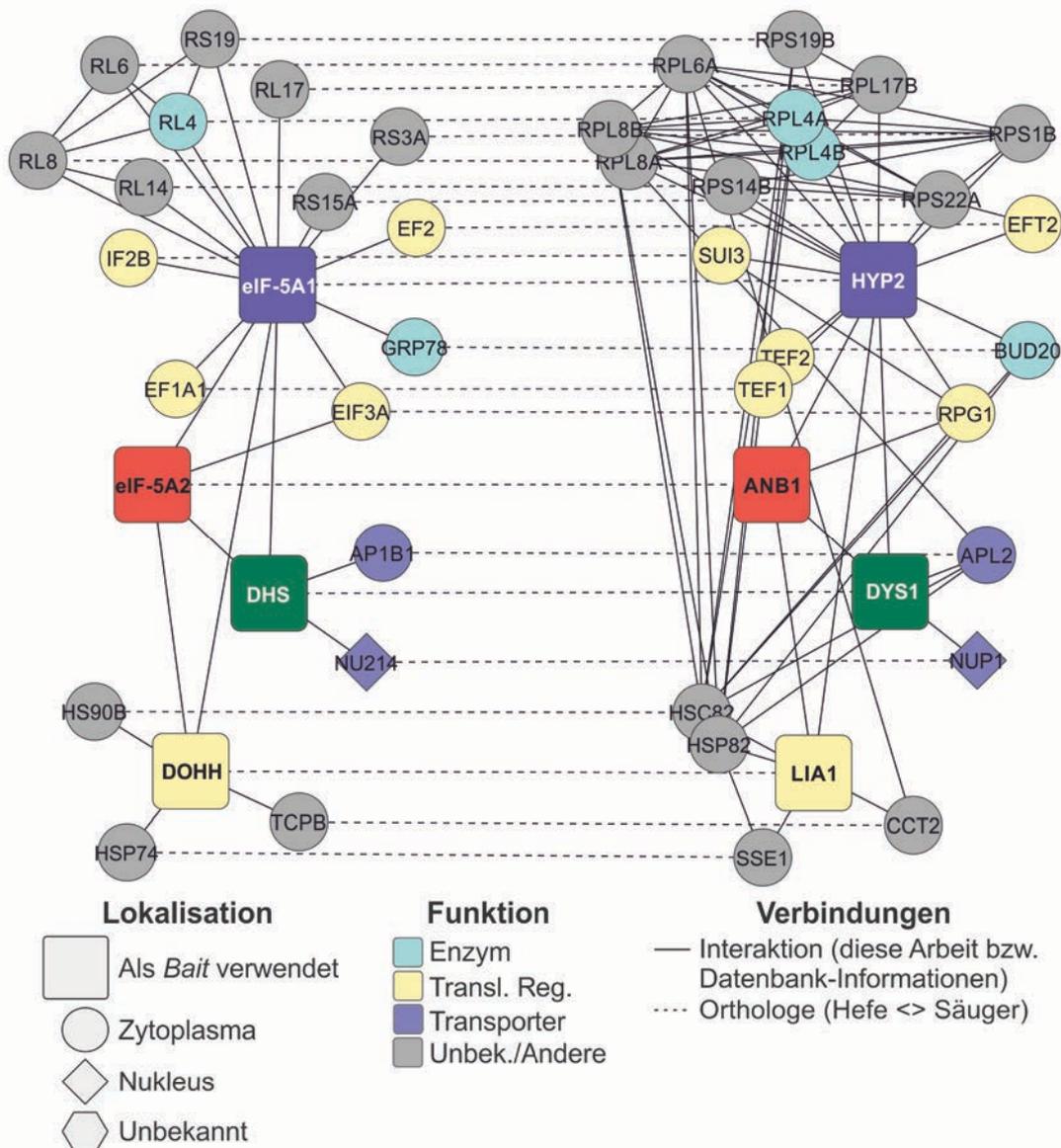


Abbildung 3.40: Evolutionäre Konservierung des Interaktionsnetzwerks der an der Hypusinmodifikation beteiligten Proteine. Interaktionen der Hefeorthologe von eIF-5A1, eIF-5A2, DHS und DOHH wurden von den STRING und IntAct Datenbanken abgefragt. Aus den ebenfalls in dieser Studie identifizierten Proteinen wurde jeweils ein Netzwerk für die Hefe- (rechts) und Säugerorthologe (links) gebildet (Knoten, durchgezogene Linien). Die erhaltenen Netzwerke wurden nebeneinander gestellt und die orthologen Proteine miteinander verbunden (gestrichelte Linien).

3.4.6. Experimentelle Validierung eines Teils der identifizierten Interaktionspartner von eIF-5A, DHS und DOHH

Abgesehen von der mit der TAP-Methode einhergehenden Gefahr, unspezifisch aufgereinigte Proteine falsch-positiv als Interaktionspartner des *Bait*-Proteins zu identifizieren, haben die Bedingungen z. B. im Lysis- und Bindepuffer Einfluss auf die Wechselwirkungen der darin gelösten Proteine¹³. Daher wurde durch weitere Methoden untersucht, ob die auf dem Bioreaktor-TAP-MS/MS Protokoll beruhenden Daten sich durch weitere Versuche in lebenden Zellen, also unter physiologischen Bedingungen, reproduzieren lassen.

Dazu wurde ein *protein fragment complementation assay* (PCA) verwendet, der auf der Fusion zweier potentieller Interaktionspartner mit der N- bzw. C-terminalen Domäne (YFP₁ bzw. YFP₂) des *yellow fluorescent protein* (YFP) basiert^{108,135}. Entsprechende Konstrukte wurden in den pcDNA3 Expressionsvektor kloniert und dann paarweise transient in Zellen der NIH3T3 Zelllinie transfiziert. Stabile räumliche Nähe, also direkte oder indirekte Interaktion zweier Fusionsproteine mit jeweils einem YFP₁- und einem YFP₂-Terminus ermöglicht den beiden Domänen, die aktive Konformation des YFP-Proteins einzuneh-

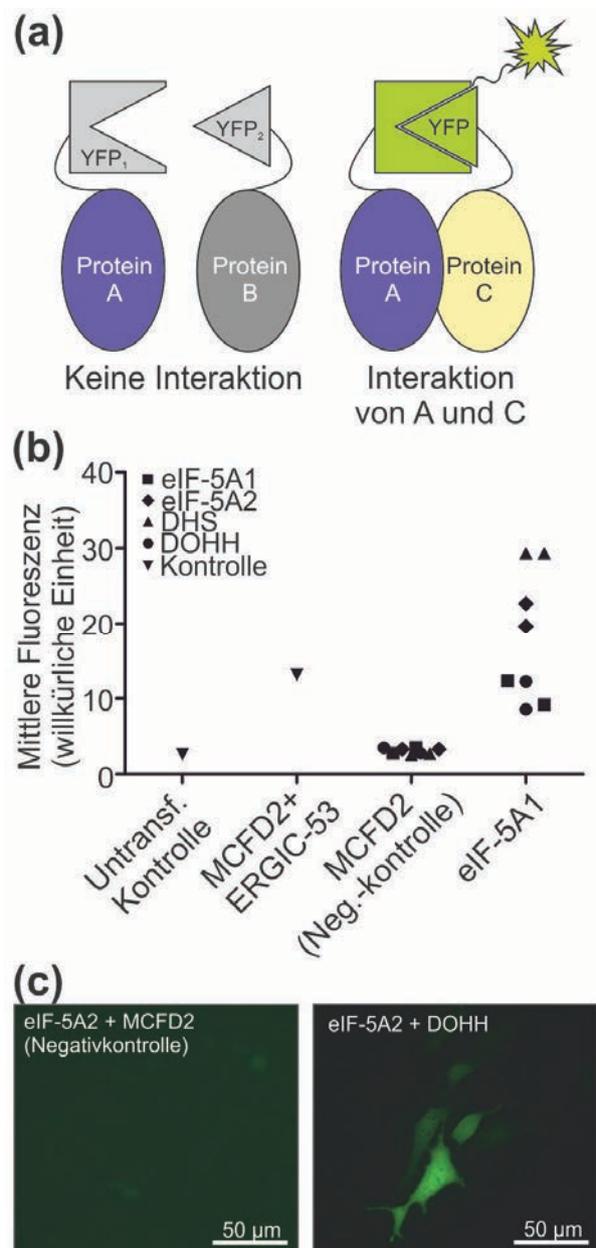


Abbildung 3.41: Etablierung des *protein fragment complementation assay* (PCA) für das verwandte Zellsystem. (a) Prinzip des PCA. Durch räumliche Nähe der interagierenden Proteine A und C können sich die daran fusionierten YFP-Fragmente komplementieren und ergeben den funktionalen Fluorophor. **(b)** Test des PCA-Systems und Etablierung einer Negativkontrolle. MCFD2 wurde unter Verwendung des vorliegenden Systems als Interaktionspartner von ERGIC-53 beschrieben¹⁰⁸ (bekannte Positivkontrolle). Interaktionen mit Komponenten der Hypusinsynthese sind dagegen nicht zu erwarten (Negativkontrolle). Diese interagieren jedoch im Rahmen der Hypusinsynthese mit eIF-5A, welches wiederum Dimere bildet (Interaktionen mit eIF-5A, DHS und DOHH im PCA nachvollziehbar). **(c)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Negativkontrolle und einer nachweisbaren bekannten Interaktion.

men und lässt sich so fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch detektieren (Abb. 3.41).

Um die Zuverlässigkeit dieses Assays unter den vorherrschenden Bedingungen zu überprüfen, wurden verschiedene Kombinationen als Positiv- und Negativkontrollen verwendet. Abbildung 3.41b zeigt, dass die Kombination von Fusionsproteinen der DHS und DOHH mit eIF-5A1 zu einer signifikanten Erhöhung des Fluoreszenzsignals führte. Kombinationen mit MCFD2 (*Multiple coagulation factor deficiency protein 2*) statt eIF-5A1, einem Protein, für das keine Interaktionen mit den hier untersuchten anderen Proteinen beschrieben wurden oder zu erwarten waren, ergaben keine Veränderung gegenüber der Hintergrundfluoreszenz. Zuletzt wurde überprüft, ob das MCFD2-Fusionsprotein mit einem bekannten Interaktionspartner in der Lage war, ein ähnliches Fluoreszenzsignal hervorzurufen. Hierfür wurde ERGIC-53 verwandt. Diese Kombination wurde in der Originalarbeit zu diesem System bereits beschrieben¹⁰⁸. Für diese Kombination konnte eine deutliche Fluoreszenzintensität festgestellt werden. Die abgebildeten durchflusszytometrischen Daten konnten in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen qualitativ bestätigt werden (Abb. 3.41c). Diese Kontrollversuche belegten, dass die hier beschriebene PCA-Methode geeignet ist, Interaktionen der Enzyme der Hypusinsynthese und ihres Zielproteins eIF-5A gegenüber einer validierten Negativkontrolle spezifisch zu detektieren.

Anschließend konnten auf analoge Weise ausgewählte Proteine des Interaktionsnetzwerks auf intrazelluläre Interaktionen mit eIF-5A1, eIF-5A2, DHS und DOHH untersucht werden. Dabei wurden Proteine gewählt, die durch ihre beschriebene oder vermutete Funktion in pathophysiologischen Zuständen zu den durch GO-Analyse ermittelten zentralen Funktionen des Interaktionsnetzwerks in Beziehung gesetzt werden konnten. Abbildung 3.42 bildet die durchflusszytometrischen Daten der untersuchten Kombinationen relativ zur jeweiligen Negativkontrolle ab. Es ist zu sehen, dass alle bekannten Interaktionen erneut bestätigt werden konnten: Die Interaktion von eIF-5A mit DHS und DOHH sowie die Homodimerisierung von jeweils eIF-5A und DHS. Während einige Kombinationen nicht zu erhöhter PCA-Fluoreszenz führten und damit vermutlich keine Interaktionspartner der jeweiligen *Bait*-Proteine darstellen oder indirekt über eine große räumliche Distanz interagieren, wies die Mehrheit der untersuchten Proteine ebenfalls positive PCA-Signale auf. Einige Proteine, zum Beispiel die Glutaryl-CoA Dehydrogenase (GCDH), zeigten zwar eine positive Tendenz, jedoch kein statistisch signifikantes Signal. Gleichwohl bestätigten die PCA-Experimente durch die positiven Signale der meisten überprüften potentiellen Interaktionspartner die generelle Validität des Bioreaktor-TAP-MS/MS Datensatzes.

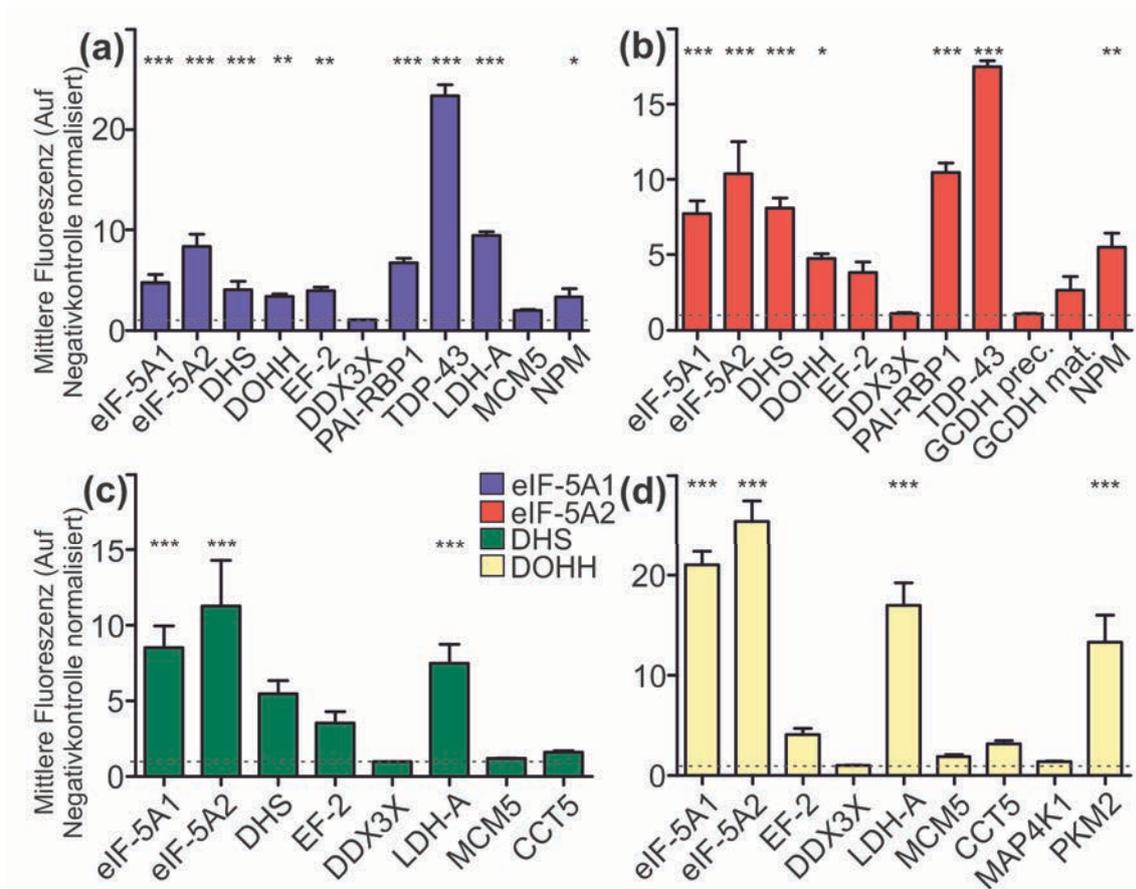


Abbildung 3.42: Bestätigung ausgewählter, in dieser Arbeit identifizierter PPI. PCA-Versuche wurden mit eIF-5A1 (a), eIF-5A2 (b) DHS (c) und DOHH (d) in Kombination mit verschiedenen im Bioreaktor-TAP-MS/MS-Assay identifizierten Proteinen durchgeführt. Die durchschnittliche Fluoreszenz der gesamten Zellpopulation wurde im Durchflusszytometer gemessen und gegen eine parallel durchgeführte Negativkontrolle (entsprechende Kombination mit MCFD2) normalisiert. Der Test auf statistische Signifikanz bezieht sich auf die Unterschiede der jeweiligen Kontrolle (*one-way ANOVA* mit *Dunett's Multiple Comparison Test*).

3.4.7. Untersuchung der Hypusinabhängigkeit von und weitere Validierung einiger in dieser Arbeit identifizierter Interaktionen mit eIF-5A

Anhand der in dieser Arbeit eingesetzten TAP- und PCA-Assays in Verbindung mit den in Abschnitt 3.4.1 beschriebenen Punkt- und Deletionsmutanten der beiden eIF-5A Isoformen wurde weiterhin die Hypusinabhängigkeit bekannter und neu identifizierter Interaktionen von eIF-5A untersucht.

In den Datensätzen der eIF-5A Isoformen wurde eine Vielzahl ribosomaler Proteine gefunden. Diese Beobachtung deckt sich mit der bekannten regulatorischen Funktion von eIF-5A in der Proteintranslation. Daher wurde zunächst von jeder ribosomalen Untereinheit je ein Protein ausgewählt, um die Interaktion von eIF-5A mit dem Ribosomenkomplex zu modellieren und ihre Hypusinabhängigkeit zu testen. In einer aktuellen Publikation wurde die Struktur des bakteriellen Ribosoms mit daran gebundenem EF-P, dem bakteriellen Ortholog

von eIF-5A, beschrieben¹³⁶. In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die Interaktion von EF-P mit dem 70S-Ribosom in enger räumlicher Nähe zu den ribosomalen Proteinen RS7p und RL1p stattfindet. Die Säugetier-Orthologe dieser Proteine wurden mittels des OMA *browsers* als die ribosomalen Proteine S5 (RS5) und L10a (RL10a) identifiziert. Da beide Proteine ebenfalls in der Massenspektrometrie identifiziert worden waren (siehe Anhang, Tabelle 3), wurden sie für die detaillierte Untersuchung ausgewählt (Abb. 3.43).

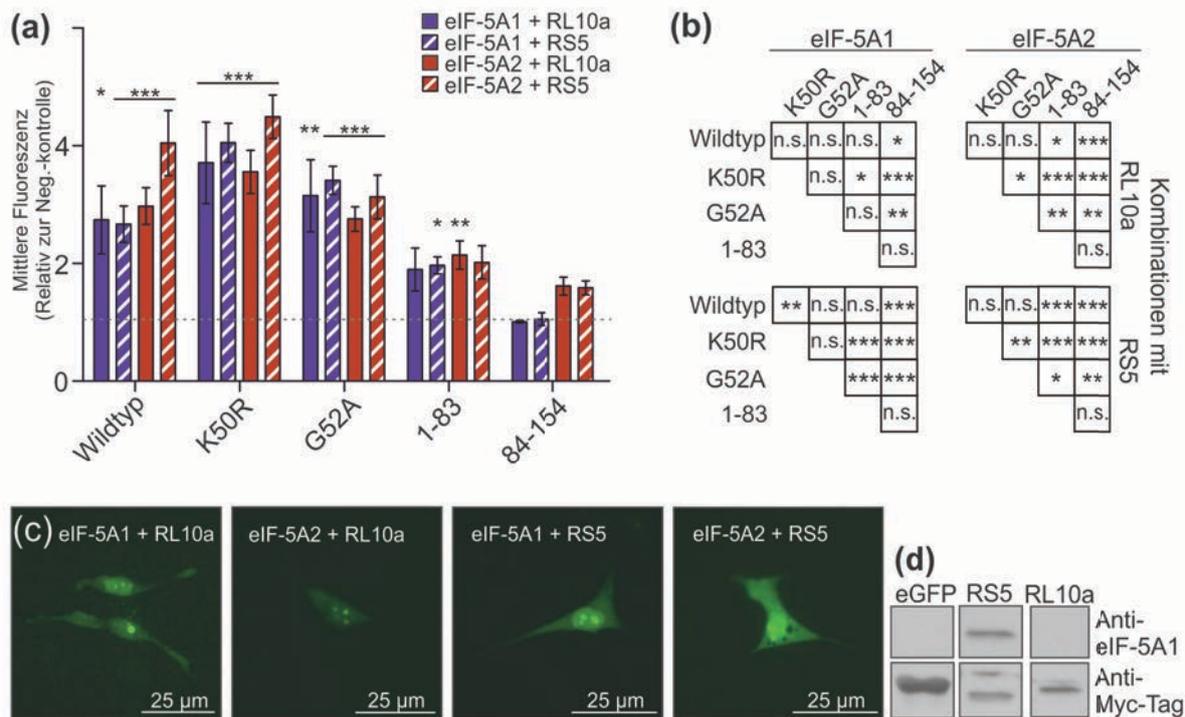


Abbildung 3.43: Weitere Untersuchung der eIF-5A-Interaktion mit RPS5 und RPL10a. **(a)** Durchflusszytometrische Auswertung von PCA-Experimenten. Die verschiedenen Kombinationen sind durch Färbung der Säulen kodiert (siehe Legende). Die Höhen der Säulen repräsentieren die mittlere Fluoreszenz lebender Zellen, normalisiert gegen entsprechende Kontrollexperimente (MCFD2, grau gestrichelte Linie). Der Test auf statistische Signifikanz bezieht sich auf die Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle (*one-way ANOVA* mit Bonferroni's *Multiple Comparison Test*) **(b)** Vergleich der Interaktionsstärke der verschiedenen eIF-5A-Mutanten mit RS5 bzw. RL10a. Jedes Matrixelement repräsentiert die statistische Signifikanz der PCA-Signalvariation zweier eIF-5A-Mutanten in Kombination mit demselben Interaktionspartner. (*one-way ANOVA* mit Bonferroni's *Multiple Comparison Test*) **(c)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Zellen aus PCA-Experimenten. Die jeweilige Kombination ist in der Beschriftung angegeben. **(d)** Anti-eIF-5A (*prey*) und Anti-Myc-Tag (*bait*) Western Blots aus Eluaten reziproker TAP-Experimente. Alle Eluate wurden auf dieselbe Membran geblottet.

Im PCA zeigten beide eIF-5A Isoformen erwartungsgemäß signifikante Interaktionen mit beiden ribosomalen Proteinen (Abb. 3.43a). Um die Hypusinabhängigkeit einer Interaktion zu untersuchen, wurden die verschiedenen Fluoreszenzniveaus der PCA-Experimente aller eIF-5A Isoformen (Abb. 3.43a) mit dem jeweiligen Protein untereinander verglichen und die statistische Signifikanz jedes Vergleichs ermittelt. Die Signifikanz wurde anhand des p-

Wertes kategorisiert und im Matrixformat dargestellt (Abb. 3.43b). Weiterhin wurden die Zellen vor der durchflusszytometrischen Analyse fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 3.43c). Dabei wurde die für ribosomale Proteine typische Verteilung des Fluoreszenzsignals sichtbar, bei der ein Großteil des Signals in den Nukleoli fokussiert war und nur geringe, diffuse Fluoreszenz von Zytoplasma und dem restlichen Kern ausging.

Da unhyposiniertes eIF-5A in der Proteintranslation bzw. -initiation nicht aktiv ist¹³⁷, war zu erwarten, dass die N-terminale, Hypusin enthaltende Domäne von eIF-5A an der Interaktion mit dem Ribosom beteiligt ist. Tatsächlich haben alle Versuche mit eIF-5A₁₋₈₃ einen positiven Trend für die Interaktion mit beiden ribosomalen Proteinen gezeigt, wobei jedoch nur zwei der vier Kombinationen (eIF-5A₁₋₈₃/RS5 und eIF-5A₂₁₋₈₃/RL10a) statistisch signifikante Resultate ergaben. Die Kombinationen mit eIF-5A₈₄₋₁₅₄ zeigten dagegen keine signifikante Erhöhung des Fluoreszenzniveaus. Die Interaktion von eIF-5A mit den ribosomalen Proteinen konnte durch die hypusindefizienten Punktmutanten K50R und G52A nicht reduziert werden. Dies deutet darauf hin, dass diese Interaktionen selbst nicht hypusinabhängig waren. Western Blots der Eluate reziproker TAP-Experimente mit RS5 und RL10a als *Bait*-Proteinen zeigten nur im Fall von RS5 ein eIF-5A-Signal, im Eluat von RL10a wurde dagegen kein eIF-5A detektiert. Dies deutet daraufhin, dass nur das Protein der kleinen Untereinheit stabil mit eIF-5A interagiert.

Als nächstes wurden die Interaktionen von eIF-5A mit zwei nicht-ribosomalen Proteinen, LDH-A und PAI-RBP1, auf die gleiche Weise untersucht (Abb. 3.44). In PCA-Experimenten konnten zwar Interaktionen von LDH-A sowohl mit der Wildtyp-Form beider eIF-5A Isoformen, als auch mit beiden hypusindefizienten Punktmutanten detektiert werden, die beiden Deletionsmutanten zeigten dagegen keine Interaktion mit LDH-A (Abb. 3.44a). Dies weist darauf hin, dass für die Interaktion mit LDH-A beide Domänen von eIF-5A eine Rolle spielen. Die Hypusinmodifikation selbst scheint auch für diese Interaktion nicht essentiell zu sein. Die statistische Signifikanz der Unterschiede individueller Interaktionen ist in Abbildung 3.44b abgebildet. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen dieser PCA-Experimente wiesen kleine Regionen von hoher Fluoreszenz innerhalb des Zytoplasmas auf (Abb. 3.44c). Im Western Blot konnte die Interaktion von eIF-5A und LDH-A unter Verwendung des Anti-eIF-5A1 Antikörpers und Eluaten reziproker TAP-Experimente ebenfalls bestätigt werden.

Im Fall von PAI-RBP1, einem RNA-bindenden und mRNA-stabilisierenden Protein, zeigten PCA- und reziproke TAP-Experimente vergleichbare Ergebnisse (Abb. 3.44). PAI-RBP1 scheint demnach ebenfalls ein Interaktionspartner von eIF-5A zu sein.

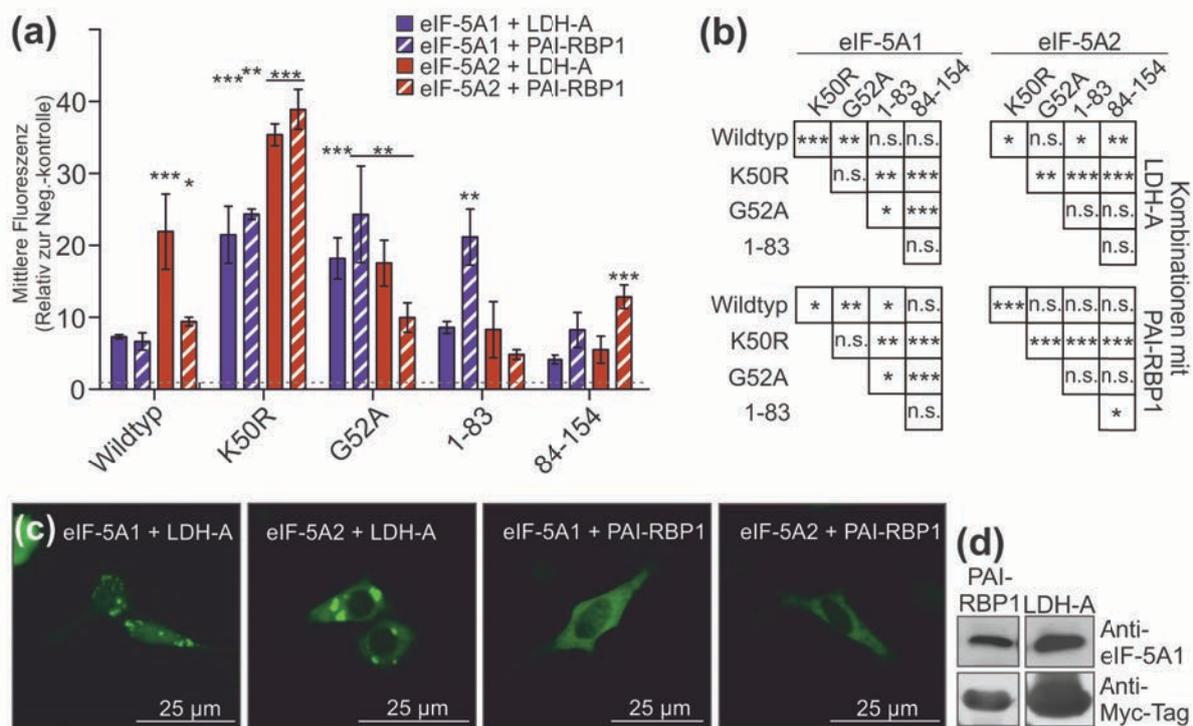


Abbildung 3.44: Weitere Untersuchung der eIF-5A-Interaktion mit PAI-RBP und LDH-A. (a) Durchflusszytometrische Auswertung von PCA-Experimenten. Die verschiedenen Kombinationen sind durch Färbung der Säulen kodiert (siehe Legende). Die Höhen der Säulen repräsentieren die mittlere Fluoreszenz lebender Zellen, normalisiert gegen entsprechende Kontrolleexperimente (MCFD2, grau gestrichelte Linie). Der Test auf statistische Signifikanz bezieht sich auf die Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle (*one-way ANOVA* mit Bonferroni's *Multiple Comparison Test*) (b) Vergleich der Interaktionsstärke der verschiedenen eIF-5A-Mutanten mit PAI-RBP bzw. LDH-A. Jedes Matrixelement repräsentiert die statistische Signifikanz der PCA-Signalvariation zweier eIF-5A-Mutanten in Kombination mit demselben Interaktionspartner. (*one-way ANOVA* mit Bonferroni's *Multiple Comparison Test*) (c) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Zellen aus PCA-Experimenten. Die jeweilige Kombination ist in der Beschriftung angegeben. (d) Anti-eIF-5A (*prey*) und Anti-Myc-Tag (*bait*) Western Blots aus Eluaten reziproker TAP-Experimente. Alle Eluate wurden auf dieselbe Membran geblottet.

NPM und TDP-43 sind zwei weitere Proteine, für die keine direkte, generelle regulatorische Funktion in der Translation beschrieben wurde. Um die Möglichkeit weiterer eIF-5A Funktionen neben seiner Rolle in der Translation weiter zu untersuchen, wurden diese beiden Proteine für weitere Validierungsexperimente ausgewählt (Abb. 3.45). Bei TDP-43 handelt es sich um ein DNA- und RNA-bindendes Protein, das an der Regulation der Transkription und des *Splicings* von mRNA beteiligt ist. Außerdem sind Mutationen des TDP43-Gens mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht worden¹³⁸. Interessanterweise zeigte TDP-43 in Kombination mit beiden eIF-5A Isoformen sowohl im PCA als auch im reziproken TAP die stärksten Interaktionen dieser Versuchsreihe (Abb. 3.45a+d). Da die N-terminale Domäne von eIF-5A, im Gegensatz zu dessen C-Terminus, in Kombination mit TDP-43 statistisch signifikante PCA-Signale hervorruft, kann daraus geschlossen werden,

dass auch hier hauptsächlich der Hypusin enthaltende N-Terminus von eIF-5A für die Interaktion mit TDP-43 verantwortlich ist (Abb. 3.45a).

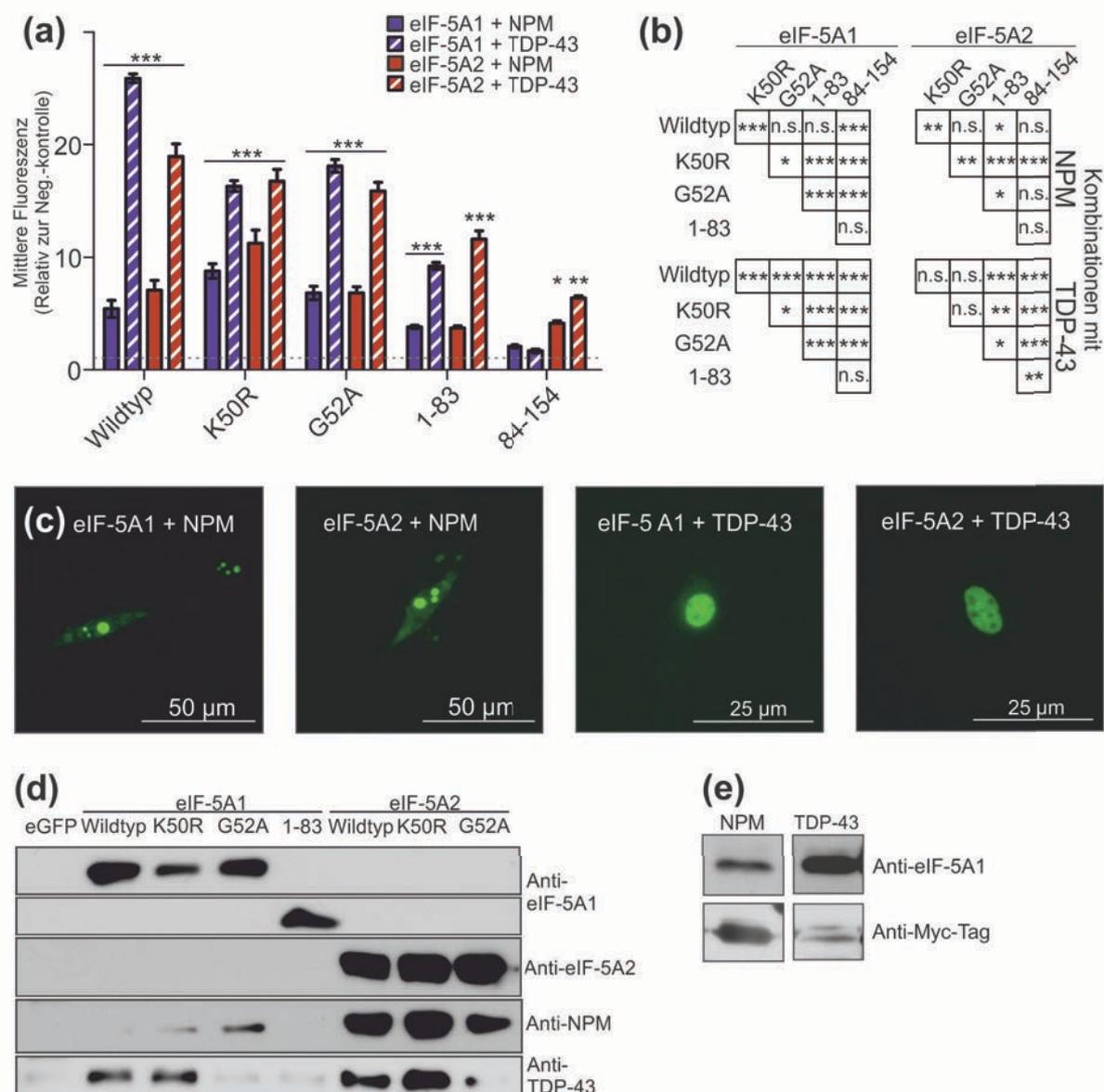


Abbildung 3.45: Weitere Untersuchung der eIF-5A-Interaktion mit TDP-43 und NPM. (a) Durchflusszytometrische Auswertung von PCA-Experimenten. Die verschiedenen Kombinationen sind durch Färbung der Säulen kodiert (siehe Legende). Die Höhen der Säulen repräsentieren die mittlere Fluoreszenz lebender Zellen, normalisiert gegen entsprechende Kontrollexperimente (MCFD2, grau gestrichelte Linie). Der Test auf statistische Signifikanz bezieht sich auf die Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle (*one-way ANOVA* mit Bonferroni's *Multiple Comparison Test*) (b) Vergleich der Interaktionsstärke der verschiedenen eIF-5A-Mutanten mit PAI-RBP bzw. LDH-A. Jedes Matrixelement repräsentiert die statistische Signifikanz der PCA-Signalvariation zweier eIF-5A-Mutanten in Kombination mit demselben Interaktionspartner. (*one-way ANOVA* mit Bonferroni's *Multiple Comparison Test*) (c) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Zellen aus PCA-Experimenten. Die jeweilige Kombination ist in der Beschriftung angegeben. (d) Western Blots aus TAP Eluaten. Die jeweiligen *Bait*-Proteine sind über den Blots angegeben, der verwendete Erstantikörper rechts. (e) Anti-eIF-5A (*prey*) und Anti-Myc-Tag (*bait*) Western Blots aus Eluaten reziproker TAP-Experimente. Alle Eluate wurden auf dieselbe Membran geblotet.

Interessanterweise, und im Gegensatz zu den anderen hier genauer untersuchten Interaktionen, riefen die Kombination von TDP-43 mit den beiden hypusindefizienten Punktmutanten K50R und G52A signifikant schwächere Signale hervor, was für eine Abhängigkeit dieser Interaktion von der Integrität der Hypusinmodifikation spricht. Diese Unterschiede waren für eIF-5A1 ausgeprägter als für eIF-5A2 (Abb. 3.45a+b). Im Gegensatz zu den Beobachtungen aus den PCA-Experimenten zeigten Western Blots aus TAP-Eluaten mit verschiedenen eIF-5A Mutanten sowohl für TDP-43 als auch für NPM stärkere Signale für eIF-5A2, und keine Verringerung des Signals nach Verwendung der K50R- und G52A-Mutanten (Abb. 3.45d). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Interaktion im TAP-Assay nicht von der Hypusinmodifikation abhängt. Zusammengefasst bestätigen diese Beobachtungen sowohl NPM als auch TDP-43 als direkte oder indirekte, hypusinunabhängige Interaktionspartner von eIF-5A.

Insgesamt betrachtet belegen diese Kontrollexperimente die hohe Spezifität der Identifikation von Protein-Interaktionspartnern über die Bioreaktor-TAP-MS/MS Methode.

4. Diskussion

Hypusin ist eine einzigartige posttranslationale Modifikation, die die Vermittlung essentieller zellulärer Funktionen ermöglicht. Hypusin wurde außerdem als potentielle therapeutische Zielstruktur in verschiedenen Krankheiten hoher Prävalenz identifiziert, unter anderem betrifft dies die Pathogenese und den klinischen Verlauf verschiedener Krebsarten, den *Diabetes mellitus* und AIDS (zusammengefasst von Hauber¹³⁹, Maier *et al.*¹²⁷ und Kaiser¹⁴⁰).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines *in vivo* Mausmodells für das Gen *Dohh* und damit für die Inaktivierung des letzten Schritts der Hypusinmodifikation des Proteins eIF-5A. Zu Beginn dieser Arbeit war zwar bekannt, dass eIF-5A und seine Hypusinmodifikation für die eukaryotische Zelle essentiell sind, jedoch gab es über ihre Bedeutung für mehrzellige Organismen *in vivo* noch keine Erkenntnisse. Die Hypothese, dass das Fehlen sowohl von eIF-5A1 als auch – vermittelt durch DHS – der gesamten Hypusinmodifikation gravierende Konsequenzen für den sich entwickelnden Säugerorganismus hat, konnte in der Zwischenzeit bereits bestätigt werden^{27,141}. Dass dies aber auch in gleichem Maße für den DOHH-vermittelten zweiten Schritt der Hypusinierung zutreffen würde, war in Anbetracht des deutlich mildereren Phänotyps in der Hefe *S. cerevisiae*³⁹ zumindest fraglich. Dies machte für die Untersuchung der Auswirkung fehlender DOHH-Aktivität im adulten Tier die Verwendung von konditionalen Linien nötig, die es erlauben, den KO des *Dohh*-Gens nach Bedarf zu induzieren. Mit den vorliegenden Daten ergab sich ein aufschlussreicher Überblick der zu erwartenden Erkenntnisse aus dem *in vivo* KO der DOHH und eine gute Basis für die Orientierung der weiteren Forschung an diesem vielversprechenden Modellorganismus.

Der zweite Teil der Arbeit zielte darauf ab, durch die Aufklärung des Protein-Interaktoms aller an der Hypusinmodifikation beteiligten Proteine neue Hinweise auf die molekularen Grundlagen der essentiellen eIF-5A-Funktionen zu erhalten. Ein solcher Datensatz wurde bis zur Abgabe der Arbeit noch nicht veröffentlicht. Da die Wechselwirkungen verschiedener Proteine untereinander die Mechanismen für die meisten zellulären Vorgänge und deren Regulation darstellen, bildet die Aufklärung solcher Wechselwirkungen einen vielversprechenden Ausgangspunkt für die Suche nach bisher unbekanntem Mechanismen.

4.1. Der *Dohh* Knock-out

4.1.1. Etablierung einer *Dohh* knock-out Mauslinie

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte der Verlust der DOHH-Aktivität herbeigeführt und durch dessen Auswirkungen auf den Modellorganismus Rückschlüsse zur Funktionalität

der DOHH gezogen werden. Da Daten aus einzelligen Organismen bereits vorlagen (vgl. Abschnitt 1.1.1), stand insbesondere die Verwendung eines biologisch komplexeren Modellsystems mit herstellbarem Bezug zum Menschen im Vordergrund. Als Modellsystem wurde daher der konditionale KO in der Maus (*M. musculus*) ausgewählt. Die stets gegebene Gefahr einer embryonalen Letalität ist im Fall der DOHH – entgegen der initialen Erwartungen – eingetreten und hat die vergleichsweise aufwändige und zeitintensive Etablierung einer konditionalen KO-Linie, inklusive der Klonierung eines entsprechenden Vektorkonstruktes, nachträglich gerechtfertigt. Dabei haben die mit 34 bp relativ kurzen loxP Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase in Introns normalerweise keine Auswirkungen auf die Expression des Zielgens¹⁴².

Der konventionelle Ansatz zur Klonierung solcher Konstrukte ist die Nutzung von Restriktionsschnittstellen in der Nähe oder innerhalb des Zielgens. Dieser Ansatz ist allerdings durch die Seltenheit geeigneter Schnittstellen eingeschränkt, so dass viele Zielgene überhaupt nicht oder nur an wenig geeigneten Stellen manipuliert werden können¹⁴³. Die in dieser Arbeit verwendete Red/ET-Technologie zur homologen Rekombination in Bakterien¹⁴⁴ ist von dieser Einschränkung nicht betroffen. Hier wird die Spezifität durch die Auswahl einer beliebigen Sequenz vermittelt, die zu der gewählten Insertionsstelle homolog ist.

Ein häufiges Problem, das bei der Generierung konditionaler KO Mauslinien auftreten kann, ist die schlechte Keimbahntransmission der in die Blastozyste injizierten embryonalen Stammzellen (ESC). ESC der 129-Linie haben im Vergleich zu anderen, zum Beispiel der Linie C57BL/6, eine deutlich verbesserte Keimbahntransmissionsrate^{145,146}. Mittlerweile etablierte Stammzellen von Subtypen der C57BL/6-Linie, die über eine ausreichend gute Keimbahntransmissionsrate verfügen¹⁴⁷, waren zum Zeitpunkt der Durchführung dieses Projekts in der hiesigen Serviceeinheit *Transgene Tiere* leider noch nicht allgemein verfügbar. Zu Beginn der Arbeit an diesem Projekt war die dort regelmäßig eingesetzte Linie für die Gewinnung der ESC daher 129/X1 × 129/S1. Von Vorteil ist dabei, dass die Identifikation hochchimärer Tiere der *Founder*-Generation durch die verschiedenen Fellfarben bei der Verwendung von 129/X1 × 129/S1 ESC und C57BL/6 Blastozysten erleichtert wird.

C57BL/6 stellt die am besten charakterisierte ingezüchtete Mauslinie dar, die meisten *Deleter*- und sonstigen Linien sind auf diesem genetischen Hintergrund gezüchtet worden. Dazu kommt, dass der 129-Hintergrund zu schlechten Zuchtergebnissen und abnormen Phänotypen führt¹⁴⁸. Da der Genotyp des genetischen Hintergrunds also einen enormen Einfluss auf den Phänotyp der Linie hat – und damit potentiell mit dem des KOs wechselwirkt – sollten die Versuche zur Charakterisierung eines KOs vor einem genau spezifizierten und

möglichst robusten Hintergrund durchgeführt werden. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, die etablierte Linie auf den C57BL/6J Hintergrund zurück zu kreuzen.

Die konventionelle Methode des Rückkreuzens basiert darauf, die durch Stammzelltransfer hergestellten Tiere über zehn Generationen in die gewünschte Linie einzukreuzen. Der Verbleib von genetischen Elementen der Ursprungslinie (abgesehen von der durch die Genotypisierung selektierten unmittelbaren Umgebung des Zielgens) gilt als statistisch hinreichend unwahrscheinlich. Für diese Methode mussten jedoch, bei einer durchschnittlichen Generationszeit von elf Wochen, mehr als zwei Jahre veranschlagt werden. Ein Verfahren zur Beschleunigung dieses Prozesses basiert auf der Verwendung eines Satzes gleichmäßig im Genom verteilter genetischer Marker, die sich zwischen den beiden eingesetzten Linien unterscheiden¹⁴⁹. Durch diese Methode, genannt ‚*speed congenics*‘, lässt sich die für die vollständige Rückkreuzung benötigte Zeit bestenfalls halbieren. Diese Methode ließ sich allerdings durch eine hohe Zahl pro Generation benötigter Böcke und einem anfänglichen geringen Zuchterfolg bei der Etablierung der hier beschriebenen *Dohh*-KO Linie nicht anwenden. Eine spätere Anwendung dieses vergleichsweise teuren Verfahrens in der Rückkreuzung ist kaum noch aussichtsreich und damit nicht sinnvoll, da der Anteil an Genvarianten aus der Ursprungslinie im Verlauf der Rückkreuzung logarithmisch sinkt und das größte Potential in den ersten Generationen – mit einem hohem Anteil des ursprünglichen genetischen Hintergrunds – gegeben ist.

Durch Verpaarung der N₁-Tiere mit Flp-Rekombinase exprimierenden Tieren wurde die Selektionskassette entfernt, da sich diese negativ auf die Expression des Zielgens auswirken und außerdem zu unspezifischen Effekten führen kann. Die Kassette wurde zwar schon nach der Selektion der embryonalen Stammzellen durch das Antibiotikum G418 (Geneticin) und den *Southern* Blot nicht mehr benötigt, sie wurde aber dennoch im Genom der Stammzellen belassen, da die zur Entfernung und erneuten Selektion benötigte weitere Kultivierung der Zellen einen negativen Einfluss auf ihre Keimbahntransmissionsrate gehabt hätte^{146,150}. Erst bei Erreichen der N₉-Generation wurden Cre-Rekombinase exprimierende Mäuse eingekreuzt. Mit dem eigentlichen KO durch Einkreuzen der *Cre-Deleter* Linie wurde die Rückkreuzung und damit die Etablierung der Linie C57BL/6.*Dohh*^{tm2Bal} abgeschlossen (N₉ auf N₁₀).

4.1.2. *In vivo*-Charakterisierung des *Dohh knock-out*

Nach der erfolgreichen Etablierung der *Dohh*-KO Mauslinie konnte diese zur Untersuchung des durch den DOHH-Verlust ausgelösten Phänotyps herangezogen werden. Das loxP-markierte Zielgen zeigte weder in heterozygoten noch in homozygoten Tieren beider Geschlechter offensichtliche Veränderungen und ist dem Wildtyp parallel damit funktionell

gleichsetzbar. Die Deletion der Exons 2, 3 und 4 des *Dohh*-Gens mithilfe der Expression bzw. Aktivierung der Cre-Rekombinase resultierte in einem Nullallel, das sich für die Untersuchung des Ausfalls der DOHH-Funktion *in vivo* und *in vitro* eignet (vgl. Abschnitt 3.1.1).

Das völlige Fehlen von *Dohh*^{-/-}-Genotypen in Würfen aus der Verpaarung heterozygoter Tiere weist auf einen letalen Phänotyp während der Embryonalentwicklung hin (vgl. z. B. Kim *et al.*¹⁵¹). Dass nach der Geburt keine tot geborenen Mäuse mit verzögerter Entwicklung gefunden wurden deutet außerdem darauf hin, dass dieser Phänotyp relativ früh, also während der ersten Hälfte der Gestation einsetzt. Diese Schlussfolgerung musste jedoch durch weitere Daten untermauert werden, da tot geborener Nachwuchs zumeist im Anschluss an die Geburt von der Mutter gefressen wird.

Bisher wurde allgemein vermutet, dass der die Geschwindigkeit bestimmende Schritt der Hypusinbiosynthese, und damit die Festlegung der maximal exprimierbaren Menge aktivierten eIF-5As, von dem Expressionsniveau des Enzyms DHS bestimmt wird³². In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass das heterozygote Fehlen eines *Dohh*-Allels bereits ein verzögertes Wachstum auslöst. In einer aktuellen Arbeit, die sich mit einem KO-Modell für das Enzym DHS befasst, wurde dieser Phänotyp dagegen nicht beschrieben¹⁴¹. Hierbei muss angemerkt werden, dass die Messungen in der zitierten Arbeit von Templin *et al.* später als die hier beschriebenen Zeitpunkte mit statistisch signifikanten Unterschieden des Körpergewichts durchgeführt wurden. Es ist also möglich, dass Messungen beider Tiermodelle zu den gleichen Zeitpunkten nicht zu unterschiedlichen Ergebnissen führen würden. In der Kombination legen diese Beobachtungen nahe, dass das Expressionsniveau beider Enzyme für die erforderliche Rate der Hypusinmodifikation von eIF-5A und damit für die Aktivierung seiner biologischen Funktion benötigt wird. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass das Enzym DOHH eine weitere, bisher unbekannte Funktion auf den zellulären Metabolismus ausübt. Gegen diese Möglichkeit spricht allerdings, dass es bisher keinerlei Hinweise auf eine solche hypothetische Funktion der DOHH gibt. Auch in dieser Arbeit konnten im Interaktom dieses Enzyms keine neuen Hinweise auf solche Funktionen gefunden werden (vgl. Abschnitt 3.4.4). Diese Fragestellung ließe sich durch einen direkten Vergleich der beiden Modellsysteme und in Zukunft eventuell durch ein transgenes Modell mit geringerer eIF-5A-Expression adressieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde des Weiteren beobachtet, dass der letale Phänotyp des vollständigen, also homozygoten Verlusts des *Dohh*-Allels in der frühen Embryogenese einsetzt, und zwar zwischen den Tagen 3,5 und 9,5 der Embryonalentwicklung. Dies lässt im Zusam-

menhang mit anderen Daten den Schluss zu, dass der Hydroxylierung von Deoxyhypusin in der zweiten und finalen Stufe der Hypusinbiosynthese am Protein eIF-5A eine essentielle und nichtredundante Funktion in der frühen Embryogenese zukommt. Zum einen sind eIF-5A1 und eIF-5A2, sowie DHS und DOHH, in allen embryonalen Entwicklungsstadien exprimiert^{54,152} (bisher unveröffentlichte eigene Daten). Zum anderen gibt es keine Hinweise, dass das Enzym DOHH, über die Finalisierung der Hypusinbiosynthese hinaus, weitere Funktionen ausübt. Zudem konnten an Tag 9,5 Implantationsstellen gefunden werden, deren Embryonen bereits vollständig resorbiert waren. Dies deutet auf eine bereits länger andauernde Resorption, also das Absterben des Embryos zu einem weitaus früheren Zeitpunkt hin. Schließlich wurde beobachtet, dass die an Tag 3,5 der Embryonalentwicklung präparierten Blastozysten des homozygoten KO-Phänotyps zwar keine starken morphologischen Unterschiede zu den Wildtypen zeigten, jedoch im Laufe der weiteren Kultivierung ein tendenziell langsames Wachstum zeigten. Die letzte Beobachtung lässt zusätzlich darauf schließen, dass durch den *Dohh*-KO Defekte im Zellwachstum ausgelöst werden. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass 72 h alte *nero*-defiziente *Drosophila*-Larven im Vergleich zu Wildtypen ebenfalls ein eingeschränktes Wachstum aufweisen⁵³ (vgl. Abschnitt 1.1.3).

Die histologische Analyse der Milzen heterozygoter KO-Tiere deutet auf eine gestörte Hämatopoese in diesem Organ hin (vgl. Abschnitt 3.2.3). Während die Milz des Menschen postnatal ein rein lymphatisches Organ ist und die Blutbildung vollständig in das Knochenmark verlagert wird, trägt die Milz der Maus auch nach der Geburt noch 2-15% zu ihrer Gesamthämatopoese bei¹⁵³. Die Mikroumgebung der murinen Milzendothelzellen bewirkt dabei eine Bevorzugung der erythroiden Linie¹⁵⁴. Dies erklärt die große Zahl von Erythrozyten im Milzgewebe des Wildtyps. Aufgrund der normalen Histologie des Knochenmarks und des guten allgemeinen Gesundheitszustandes der heterozygoten KO-Tiere scheint die Hämatopoese aber nicht generell gestört zu sein. Die interessanten Fragestellungen, ob die durch den *Dohh*-KO verursachte Störung der Hämatopoese in der Milz auf Veränderungen der hämatopoetischen (Stamm-) Zellen oder ihrer Nische beruht, und welche Mechanismen diesen Veränderungen zugrunde liegen, sollen in Folgeprojekten adressiert werden.

Die Resultate der beschriebenen Experimente mit konditionalem KO der *Dohh* im adulten (bzw. juvenilen) Tier zeigten einen deutlich gravierenderen Phänotyp, der zu den Beobachtungen aus den adulten heterozygoten KO-Tieren passte. Die dort beobachtete langsamere Zunahme an Körpergewicht ließ sich durch den konditionalen KO in Tieren mit heterozygot gefloxtem *Dohh* tendenziell reproduzieren und in homozygoten Tieren deutlich steigern. Der

Endpunkt dieses Phänotyps – die Letalität drei bis vier Wochen nach der Induktion des KO – ist ebenfalls mit der *Drosophila*-Studie⁵³ vergleichbar. Auch in der Taufliede ist das *nero*-Gen für das Überleben des Organismus essentiell. Da dies die erste Beschreibung eines die Hypusinierung beeinträchtigenden KO im adulten Säugetier ist, kann über den Vergleich des *Dohh*-, *Dhps*- und *Eif5a1*-KOs keine Aussage gemacht werden.

4.1.3. Erkenntnisse aus dem *Dohh knock-out in vitro*

Mit der in dieser Arbeit vorgestellten Zelllinie ist ein irreversibel induzierbares *in vitro* Modell des DOHH-KOs etabliert worden, das nicht über die üblichen Wachstumsbeschränkungen von Primärzellen verfügt. Der Vergleich der drei Zelllinien mit den verschiedenen *Dohh*-Genotypen macht allerdings deutlich, dass die Immortalisierung der Zelllinien nach dem 3T3-Protokoll zufällige Veränderungen des Phänotyps begleiten, die den direkten Vergleich der Zelllinien untereinander erschweren. Voraussetzung für die Durchführung von Experimenten ist daher die Verfügbarkeit entsprechender Kontrollen innerhalb der jeweiligen Zelllinie.

Es fällt außerdem auf, dass die Rekombination des geflochtenen *Dohh*-Allels nicht in allen Zellen der hier etablierten Linie stattfindet und die nicht rekombinierten Zellen sehr schnell – nach etwa vier bis fünf Passagen – beginnen, die KO-Zellen zu überwachsen. Über den Grund der Resistenz einer Subpopulation kann hier nur spekuliert werden, da eine genauere Charakterisierung der Zelllinien in dieser Hinsicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden konnte. Es wäre möglich, dass einige Zellen zwar erfolgreich mit dem CreEsr1-Expressionsplasmid transduziert wurden, dieses jedoch so ins Genom integriert wurde, dass die Expression des CreEsr1-Fusionsgens nicht erfolgte. Des Weiteren wäre es möglich, dass einige nicht transduzierte Zellen trotz der Puromycin-Behandlung überleben konnten. In beiden Fällen würde die fehlende Expression des CreEsr1-Fusionsgens dazu führen, dass die Induktion durch 4-OHT wirkungslos bliebe. Eine mögliche Herangehensweise an diese Problemstellung wäre die Herstellung und Untersuchung von Einzelzellklonen. In jedem Fall ist das schnelle Auswachsen der KO-resistenten Zellen ein starkes Indiz für die kritische Bedeutung der DOHH. Aus dem Erreichen der maximalen Wirkung der Behandlung für Zellen aus dieser Linie ergibt sich ein optimaler Zeitpunkt für weitere Experimente am Tag neun nach Beginn der Induktion des KO. Dabei sollte bei der Interpretation der gewonnenen Daten immer beachtet werden, dass die in der Gesamtpopulation vorhandenen, induktionsinsensitiven Zellen je nach durchgeführtem Experiment einen mehr oder weniger starken Einfluss ausüben können. Da sich die auswachsenden Zellen wegen des ausbleibenden KOs vermutlich wie Kontrollzellen verhalten ist aber eher zu erwarten, dass schwach

ausgeprägte Phänotypen vollständig maskiert und die detektierbaren Phänotypen schwächer ausgeprägt sind als es bei einem vollständigen KO der Fall wäre. Dieses Problem ist (insbesondere beim KO proliferations- und überlebenskritischer Gene) systeminhärent und wurde auch für *in vivo* Experimente bereits beschrieben. So konnte zum Beispiel in der Leber von Alb-Cre;*Ctnnb1*^{flox/flox} Mäusen, bei denen in allen Hepatozyten adulter Tiere die β -Catenin-Allele ausgeschaltet werden sollten, die spätere Repopulation der Leber durch Hepatozyten mit intaktem *Ctnnb1*^{flox/flox}-Genotyp beobachtet werden¹⁵⁵.

Die Ergebnisse der *real-time* RT-PCR für die *Eif5a1*-mRNA ergaben mit einer maximal zweifachen Konzentrationsänderung keine sicher interpretierbaren Daten, da diese Veränderung durch verschiedene technische Faktoren dieser Methode innerhalb ihrer Fehlerunsicherheit liegt. Zudem ist eine dementsprechend geringe Zunahme der Expression auch im Western Blot nicht leicht detektierbar, insbesondere im Fall eines ohnehin stark exprimierten Proteins wie eIF-5A1. Sollte sich der ablesbare Trend jedoch bestätigen, dass der *Eif5a1*-mRNA-Spiegel der Zellen nach dem *Dohh*-KO steigt, dieser auf der Proteinebene jedoch nicht erkennbar reguliert wird, ergäben sich verschiedene Interpretationsmöglichkeiten: Es wäre möglich, dass die deoxyhypusinierte Form von eIF-5A1, die nach dem KO nach und nach entsteht, weniger stabil wäre und dies die zusätzliche eIF-5A-Expression ungefähr ausgleicht. Es wäre auch möglich, dass nicht vollständig hypusiniertes eIF-5A1 von der Zelle, z. B. durch Ubiquitinylierung, aktiv abgebaut wird. Dagegen spricht allerdings die Hypothese, dass in verschiedenen Zelltypen, z. B. β -Zellen der Bauchspeicheldrüse, anscheinend ein Vorrat unhyposinierten eIF-5As vorgehalten wird, der im Kern angereichert und bei Bedarf ins Zytoplasma transportiert wird²⁵. Zuletzt besteht die Möglichkeit, dass die Translation der *Eif5a1*-mRNA nach dem *Dohh*-KO weniger effizient abläuft. Dies wäre ein interessanter Regulationsprozess, der auf ein negatives *Feedback* durch unvollständig hypusiniertes eIF-5A1 auf die Translation von *Eif5a1* hindeuten würde. Diese Beobachtung könnte andererseits auch so interpretiert werden, dass eIF-5A1, als Translationsregulator eines spezifischen Sets von mRNAs^{15,23}, auch die Regulation der *Eif5a1*-mRNA hypusinabhängig reguliert. In beiden Fällen wäre dies eine Autoregulation der *Eif5a1*-Expression. Diesen Ergebnissen und Hypothesen steht allerdings die Beobachtung entgegen, dass der Verlust des *nero*-Gens der Taufliege (*D. melanogaster*) *in vivo* zu einer starken Hochregulation des eIF-5A Proteins führte⁵³.

Die Ergebnisse der 2D-Western Blots mit dem Anti-eIF-5A1 Antikörper legen eher eine der ersten beiden Erklärungen nahe. Hier wurde beobachtet, dass das eIF-5A trotz des fast vollständig fehlenden DOHH auch neun Tage nach dem Beginn der Induktion immer noch zu

fast 50% modifiziert war. Eine mögliche Erklärung für das verbliebene hypusinierte eIF-5A wäre eine Erhöhung seiner Halbwertszeit, die durch die fehlende Neusynthese bzw. Anhäufung unhyposinierten eIF-5As induziert werden könnte. Ein weiterer Beitrag ist vermutlich bei den auswachsenden, 4-OHT-resistenten Zellklonen zu suchen.

Ein deutlicher Effekt des *Dohh*-KOs auf die 3T3^{Δ*Dohh*}-Zelllinie ist eine starke Verringerung des Zellwachstums, die zumindest zum Teil auf Seneszenz zurückgeführt werden konnte. Seneszenz wurde durch das Ausbleiben der S- (bzw. dem Verbleiben in der G₁-)Phase trotz exogener Induktion des Zellzyklus durch Wachstumsfaktoren definiert¹⁵⁶. Dabei treten innerhalb der Zellpopulation ausgebreitete, stark vergrößerte Zellen mit erhöhtem Zytoplasmavolumen auf¹⁵⁷. Diese Veränderungen der Größe, einhergehend mit einer positiven Färbung auf SA-β-Gal, gelten als Marker zellulärer Seneszenz¹⁵⁸. Yanishewski *et al.* haben gezeigt, dass seneszente humane Lungenfibroblasten der Linie WI-38 zwar überwiegend einen diploiden Chromosomensatz haben und sich im G₁-Arrest befanden, ein Teil der Zellen aber auch einen erhöhten DNA-Gehalt aufwies, der tetra- und polyploiden Zellen entsprach¹⁵⁹. Weitere Untersuchungen dieser Zellen haben ergeben, dass es sich dabei um G₁-tetraploide und nicht um G₂-diploide Zellen handelte¹⁶⁰. Diese Zelllinie zeigte also nach Erreichen der Seneszenz ein erhöhtes Auftreten an Tetra- und Polyploidie, hervorgerufen durch die Dysregulation von Zellzyklus und DNA-Synthese. Dies kann auch in der PI-basierten Zellzyklusanalyse nachvollzogen werden. Zum Beispiel zeigte eine Arbeit an humanen Hautfibroblasten, dass die Zellen nach einer größeren Anzahl an Passagen in Seneszenz gingen und Apoptose ausgelöst wurde. Gleichzeitig stieg auch der Anteil an tetraploiden Zellen¹⁶¹. In Übereinstimmung mit diesen Studien wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass *Dohh*-KO Fibroblasten ebenfalls in Wachstumsarrest gingen (vgl. Abschnitt 3.3.3) und sich mit dem Seneszenzmarker SA-β-Gal färben ließen (vgl. Abschnitt 3.3.4). Darüber hinaus traten stark vergrößerte Zellen mit vergrößertem Zellkern auf (vgl. Abschnitt 3.3.3). In der Zellzyklusanalyse zeigte sich eine Erhöhung des Anteils tetraploider Zellen (vgl. Abschnitt 3.3.5). Da die behandelten *Dohh*-KO Zellen deutlich langsamer wuchsen als Leervektor- sowie unbehandelte Kontrollzellen, war diese Beobachtung nicht durch das Auftreten eines mit dem häufigeren Durchlauf des Zellzyklus einhergehenden G₂-diploiden Chromosomensatzes zu erklären. Es zudem ist zu erwarten, dass polyploide und stark vergrößerte Zellen in dieser Analyse wie Zellaggregate erscheinen. Daher wurden sie aus der Auswertung vermutlich durch ein entsprechendes *Gate* ausgeschlossen. Das Ausbleiben polyploider Zellen in der PI-Zellzyklusanalyse spricht demnach nicht gegen die hier beschriebene Interpretation der Beobachtungen als zelluläre Seneszenz. In der Kombination

und in Übereinstimmung mit den angeführten Studien sprechen diese Daten für das Auslösen zellulärer Seneszenz durch den Verlust der DOHH-Aktivität. Dieser Zusammenhang sollte in weiteren Untersuchungen bestätigt und weiter charakterisiert werden, zum Beispiel durch Western Blot-Analysen der Aktivierung und Expression zellzyklusregulatorischer Proteine wie p53, p16 oder ARF. Andere Studien zur zellulären Seneszenz nach Inhibition der Hypusinsynthese untermauern diese Interpretation jedoch bereits: Zuerst wurde beobachtet, dass die Aktivität eines Enzyms der Polyaminsynthese, der Ornithin Decarboxylase, in seneszenten Lungenfibroblasten stark verringert ist und dabei unter anderem die Rate der Neubildung des DHS-Substrats Spermidin zurückgeht¹⁶². Später wurde gezeigt, dass Seneszenz ebenfalls mit einem starken Rückgang der Hypusinsyntheserate einhergeht¹⁶³. Aufgrund dessen, und da eIF-5A bekannte Funktionen in Proliferation und Zellzyklusregulation innehat (vgl. Abschnitt 1.1.1), kann spekuliert werden, dass eIF-5A und dessen Hypusinierung (gesteuert über die Polyaminsynthese) ebenfalls im Regulationsmechanismus der Seneszenz involviert ist. Die in dieser Arbeit beschriebenen Daten sprechen ebenfalls dafür. Dass dabei erstmals gezeigt werden konnte, dass schon die Inhibition des DOHH-vermittelten Schritts der Hypusinsynthese für die Induktion von Seneszenz in murinen Fibroblasten ausreicht, spricht zudem für die in dieser Arbeit diskutierte Hypothese, dass der zweite Schritt der Hypusinmodifikation im Verlauf der eukaryotischen Evolution an Bedeutung gewonnen hat. Deutlich wird dies auch durch den Vergleich des zellulären Phänotyps der *Dohh*-KO Zelllinie mit dem vergleichsweise milden Phänotyp des LIA1-Verlusts in *S. cerevisiae*³⁹ (vgl. Abschnitt 1.1.1).

4.2. Das Protein-Protein Interaktionsnetzwerk hypusinrelevanter Proteine

4.2.1. Bioreaktor-TAP-MS/MS: Eine hochempfindliche Methode zur Aufklärung von PPI

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten Interaktionspartner für eIF-5A1 und eIF-5A2 sowie für DHS und DOHH mit dem Ziel identifiziert werden, anhand dieser Daten Erklärungen für die molekularen Mechanismen der eIF-5A-Funktion und -Regulation zu entwickeln. Dafür wurde eine hoch sensitive Methode etabliert: ‚Bioreaktor-TAP-MS/MS‘. Durch die Bereitstellung einer großen Zellzahl als Ausgangsmaterial für die TAP-Aufreinigung und kleinere Änderungen in der Art der Probenaufbereitung ist es gelungen, die Sensitivität der Ursprungsmethode (TAP-MS/MS), gemessen an der Anzahl identifizierter Interaktionspartner, signifikant zu erhöhen. Dies wird deutlich, wenn man die Ergebnisse der vorliegen-

den Arbeit mit denen einer anderen Studie vergleicht, in der ebenfalls ein TAP-MS/MS Protokoll auf das eIF-5A1-Ortholog aus *S. cerevisiae* angewandt wurde¹³. Dort wurden im TAP-Eluat 20 Proteine identifiziert, die potentiell mit eIF-5A1 interagieren. 75% dieser Proteine waren Bestandteile des ribosomalen Komplexes (14 ribosomale Proteine der großen und kleinen Untereinheit sowie der Elongationsfaktor eEF1A). Das relativ gering exprimierte Enzym DOHH wurde in dieser Studie nicht als Interaktionspartner von eIF-5A1 identifiziert. In der vorliegenden Arbeit konnten dagegen insgesamt 261 Proteine in den Proben der vier Zielproteine identifiziert werden, 245 davon als potentielle Interaktionspartner von eIF-5A1. Fast alle später überprüften Interaktionen konnten in PCA-Experimenten reproduziert werden. Der insgesamt hohe Anteil reproduzierter Interaktionen (sieben von neun untersuchten Interaktionen für eIF-5A1, vgl. Abschnitt 3.4.6) spricht für die Zuverlässigkeit des verwandten Systems und der hier beschriebenen Daten. Obwohl eine gewisse Rate falsch-positiver Identifikationen bei der eingesetzten Methode zu erwarten war, wäre es auch möglich, dass die fehlende Reproduzierbarkeit einiger potentieller Interaktionen durch den Wechsel des Zellsystems (von BaF/3 p210 auf NIH3T3 Fibroblasten) für den PCA hervorgerufen wurde. Zum Beispiel könnte eine indirekte Interaktion deshalb in den NIH3T3 ausbleiben, weil ein für das Zustandekommen der Interaktion erforderliches Adaptermolekül in diesen Zellen nicht exprimiert wird.

4.2.2. Das Interaktionsnetzwerk der hypusinrelevanten Proteine bietet Hinweise auf die molekularen Mechanismen der eIF-5A-Funktion

Im eIF-5A Datensatz der vorliegenden Arbeit wurden 245 Proteine identifiziert. Die meisten dieser Proteine wurden durch die GO-Analyse als funktionelle Bestandteile der Proteinsynthese kategorisiert (52,4% für eIF-5A1 bzw. 70,2% für eIF-5A2). Das größte der identifizierten *Cluster* bestand ausschließlich aus Proteinen, die der Ribosomenfunktion zugeordnet werden konnten. Allerdings wurde im Gegensatz zu der oben genannten Studie auch eine große Zahl weiterer Proteine identifiziert, denen völlig andere Funktionen zugeschrieben werden. Die Kenntnis der Beziehung von eIF-5A zu diesen Proteinen könnte dabei helfen, die molekularen Mechanismen zu verstehen, die den verschiedenen Funktionen von eIF-5A zugrunde liegen. Dies ist zunächst die gut belegte Rolle von eIF-5A im spezifischen Transport einiger mRNAs sowie deren Prozessierung und Stabilität^{20,22,24,45,164}. In Übereinstimmung mit diesen Studien konnte in den eIF-5A-Datensätzen dieser Arbeit ein großer Teil der identifizierten Proteine als RNA-bindend klassifiziert werden (69% bzw. 72,7%). Darüber hinaus ergab die *Cluster*-Analyse des vorgestellten Netzwerks, dass zwei von fünf *Clustern* aus RNA-bindenden Proteinen bestehen, deren Funktionen ebenfalls im

Bereich des RNA-Transports sowie deren Prozessierung und Translation liegen. Eine weitere in GO- und *Cluster*-Analyse stark repräsentierte Gruppe besteht aus Proteinen, die regulative Funktionen in der Steuerung des Zellzyklus ausüben. Diese Beobachtung legt eine direkte Funktion von eIF-5A in der Regulation des Zellzyklus nahe. Dies steht im Gegensatz zu der These, dass die beobachtete Wirkung von Inhibitoren der Hypusinsynthese und des Verlusts der eIF-5A-Funktion^{9,26,28–36,165} auf indirekten Auswirkungen über Proteinsynthese und RNA-Transport beruht. Für eine direkte Beteiligung an der Zellzyklusregulation sprechen auch andere aktuelle Studien, in denen die Beteiligung von eIF-5A an der Regulation normaler und maligner Zellproliferation beschrieben wurde^{48,166}.

4.2.3. Evolutionäre Diversifikation als mögliche Grundlage für die Unterschiede zwischen eIF-5A Orthologen ein- und mehrzelliger Eukaryoten

Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede zwischen den verfügbaren Daten aus der Hefe und den hier vorgestellten Daten aus einem Säugersystem sind neue, im Laufe der eukaryotischen Evolution erworbene Proteinfunktionen von eIF-5A, die seine evolutionär hoch konservierte und für eukaryotische Zellen essentielle^{9,26,165} Basisfunktion in der Proteintranslation komplementieren. Diese Entwicklung zu einem größeren Spektrum von Funktionen würde vermutlich auch eine Erweiterung der Gesamtheit der eIF-5A Interaktionspartner mit sich bringen. Diese Hypothese wird durch Beobachtungen gestützt, die in verschiedenen eukaryotischen Systemen gemacht wurden: Während der Verlust des DOHH-Orthologs von *S. cerevisiae* (LIA1) nur eine geringe Verlangsamung der Wachstumsrate bewirkt³⁹, löst dieser in *D. melanogaster* gravierende Effekte auf das Überleben und die Organentwicklung sowie zelluläre Autophagie aus¹⁶⁷. Kürzlich publizierte Arbeiten über *knock-out* Mausmodelle für die Gene *Eif5a1* sowie *Dhps* sowie der im ersten Teil dieser Arbeit beschriebene *Dohh*-KO zeigen des Weiteren, dass sich der Verlust eines der an der Hypusinmodifikation beteiligten Proteine im Säuger schon in einem frühen Stadium der Ontogenese letal auswirkt^{27,141} (vgl. Abschnitt 3.2.2).

Der Vergleich der verfügbaren Daten aus der Hefe mit den hier beschriebenen Datensätzen stützt diese Hypothese. Während alle (direkt oder indirekt) mit eIF-5A interagierenden Orthologe, die in beiden Datensätzen vorkommen, einen direkten Bezug zur Translation haben, wurden in der Hefe keine Proteine mit anderen funktionellen Eigenschaften als eIF-5A-Interaktionspartner identifiziert (vgl. Abschnitt 3.4.5).

4.2.4. Unterschiede in den PPI der Isoformen eIF-5A1 und eIF-5A2

Diese Überlegungen zu den evolutionär sich auseinander entwickelnden Funktionen von eIF-5A lassen sich auch auf die Isoformen von eIF-5A übertragen. Die in der Einleitung beschriebenen Unterschiede der beiden Isoformen bezüglich ihres Expressionsprofils und der Rolle speziell von eIF-5A2 in der Krebsentstehung stehen mit den hier beobachteten Unterschieden in den jeweiligen Datensätzen in Einklang. Eine mögliche Erklärung wäre, dass beide Isoformen sich zwar einen Basissatz gemeinsamer, ursprünglicher sowie später erworbener Funktionen teilen. Dagegen könnte eIF-5A1 aber noch verschiedene, ubiquitär benötigte zelluläre Funktionen ausüben, während eIF-5A2 andere, eher gewebs- und entwicklungspezifische zusätzliche Aufgaben innehat. Es gibt Hinweise auf isoformspezifische Rollen von eIF-5A in der Dedifferenzierung und Mobilisierung von Krebszellen, die diese Hypothese stützen: So wurde die Überexpression von eIF-5A2, jedoch nicht von eIF-5A1, in Zellen des hepatozellulären Karzinoms entdeckt und konnte positiv mit der Metastasierungsrate korreliert⁶⁸ sowie als prognostischer Marker für den klinischen Verlauf bei Lungenkrebspatienten identifiziert werden⁶⁶. In einer weiteren Studie konnte eIF-5A2 mit der Entwicklung des Ovarialkarzinoms in Verbindung gebracht und als Onkogen charakterisiert werden⁶³. Tatsächlich wurde in dieser Arbeit CKAP5, ein im hepatozellulären und Kolonkarzinom stark exprimiertes Protein als spezifischer Interaktionspartner von eIF-5A2 ermittelt (vgl. Abb. 3.32 und Tabelle 3 im Anhang). Auch die Hypothese, dass eIF-5A2 im Hoden und im ZNS eine wichtige Funktion ausübt, wird durch Ergebnisse dieser Arbeit gestützt: Bisher war für eIF-5A2 die selektive Expression im Hoden und ZNS sowie eine Studie bekannt, die eine Anhäufung von Mutationen des EIF5A2-Gens bei infertilen Männern beschrieb¹⁶⁸. In dieser Arbeit konnte darüber hinaus eine selektive Interaktion von eIF-5A2 mit GSK-3 β gezeigt werden. Dieses Protein ist im Hoden stark exprimiert und an der Regulation der Zellmigration beteiligt¹⁶⁹. Außerdem konnte UGT-1, das im Gehirn stark exprimiert wird, ebenfalls als selektiver Interaktionspartner von eIF-5A2 identifiziert werden. Darüber hinaus wurden GCDH und TDP-43 als Interaktionspartner von eIF-5A2 identifiziert. Diese beiden Proteine sind ebenfalls für das Nervengewebe bedeutsam. Mutationen des GCDH-Gens lösen die neurodegenerative Erkrankung Glutarazidurie Typ I aus¹⁷⁰. Mutationen von TDP-43 wurden ebenfalls mit einer neurodegenerativen Erkrankung in Verbindung gebracht, der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) Typ X¹⁷¹, sowie in Einzelfallberichten mit weiteren Erkrankungen, die das ZNS betreffen¹⁷².

Dabei ist zu bemerken, dass Zelllinien im Allgemeinen spezifisch für die Gewebe sind, aus denen sie ursprünglich gewonnen wurden. Die Suche nach Interaktionspartnern ist daher

normalerweise eher für Interaktionen erfolgreich, die in dem jeweiligen Gewebe stattfinden. Aufgrund dessen würde ein vergleichbares *Screening* nach Interaktionspartnern von eIF-5A2 in einem neuronalen oder keimzellspezifischen Kontext wohl eine andere, vermutlich größere Gesamtheit an eIF-5A2-spezifischen Interaktionspartnern ergeben. Es ist jedoch bemerkenswert, dass trotz des verwendeten Pre-B-Zellsystems eine Vielzahl von Proteinen identifiziert werden konnte, die in hämatopoetischen Zellen eher gering exprimiert werden und deren bekannte Funktionen für die Biologie und Pathophysiologie von Gehirn und Hoden beschrieben wurden. Dass trotz der relativ geringen Expression dennoch für die Identifikation ausreichende Mengen dieser Proteine aufgereinigt wurden, kann als weiterer Hinweis auf die hohe Sensitivität des hier verwendeten Bioreaktor-TAP-MS/MS Protokolls interpretiert werden.

4.2.5. Die vorliegenden Daten bieten keine Hinweise auf bisher unbekannte Funktionen der Enzyme DHS und DOHH

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals die gezielte Suche nach bisher unbekanntem Interaktionspartnern von DHS und DOHH. Im Gegensatz zu den komplexen Interaktionen von eIF-5A beschreiben die gezeigten Daten jedoch keine vergleichbaren funktionellen Interaktionsnetze für die beiden Enzyme der Hypusinsynthese. Im Vergleich zu beiden eIF-5A Isoformen wurden für die DHS und DOHH nur wenige Interaktionspartner ermittelt, die darüber hinaus zu einem großen Teil mit den in den Datensätzen von eIF-5A1 und eIF-5A2 enthaltenen Proteinen überlappen. Diese Überlappungen legen nahe, dass zumindest ein Teil dieser Proteine nur mit einem der jeweiligen *Bait*-Proteine interagiert und die Aufreinigung in den anderen Fällen indirekt über die eIF-5A/DHS und eIF-5A/DOHH Interaktion abläuft. Darüber hinaus konnte für keines der in den DHS- und DOHH-Datensätzen enthaltenen Proteine eine signifikante Sequenzhomologie zur eIF-5A-Region gefunden werden, die die Hypusinierungsstelle (Lys₅₀) enthält. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion in diesen Fällen auf einem anderen Mechanismus beruht als dem der beiden Interaktionen mit eIF-5A. Zusammen genommen begründen die vorgestellten Daten nicht die Annahme weiterer Funktionen beider Enzyme. Allerdings lässt die Tatsache, dass beide Datensätze zellzyklusregulatorische Proteine wie CDK17, TRIM33, CEP55, KIF2A und MCM3 enthalten (vgl. Abschnitt 3.4.4), den Schluss zu, dass die Enzymaktivität von DHS und DOHH – und damit eventuell auch die Aktivierung der eIF-5A Funktion – in diesem Kontext reguliert werden könnte.

4.2.6. Der Einfluss der Hypusinmodifikation auf einzelne PPI von eIF-5A

Viele der in dieser Studie als Interaktionspartner von eIF-5A1, eIF-5A2, DHS und DOHH identifizierten Proteine geben, wie bereits erörtert, wichtige Hinweise auf mögliche molekulare Mechanismen bekannter und weiterer, bisher unbekannter Funktionen von eIF-5A und der Hypusinmodifikation. Durch die Verwendung von hypusindefizienten sowie Deletionsmutanten von eIF-5A in PCA- und TAP-Experimenten wurde der Einfluss des Hypusins auf die neu identifizierten Proteininteraktionen untersucht. Die Beobachtungen aus diesen Experimenten deuten darauf hin, dass die Interaktionen von eIF-5A mit den für die Bestätigungsversuche ausgewählten Proteinen zwar spezifisch für eine oder beide Domänen sind, jedoch nicht von der Integrität der Hypusinmodifikation abhängen. Diese Beobachtung ist außerordentlich interessant, da in verschiedenen Studien eine Hypusinabhängigkeit der jeweils untersuchten Funktionen von eIF-5A festgestellt wurde (vgl. Abschnitt 1.1.1). Für die dazu scheinbar paradoxen, hypusinunabhängigen Interaktionen gibt es verschiedene mögliche Erklärungen: Die Interaktionen könnten für die eIF-5A-Funktion keine Rolle spielen, oder aber für die Vermittlung einer bisher unbekannt, hypusinunabhängigen Funktion von eIF-5A benötigt werden. Zudem wäre es denkbar, dass die Interaktionen zwar für hypusinabhängige Funktionen von eIF-5A benötigt werden, jedoch selbst nicht hypusinabhängig und alleine nicht hinreichend für die Ausübung dieser Funktionen sind. Dies bedeutet, dass das Stattfinden einer Interaktion nicht unbedingt auch eine Aussage über dessen Funktionalität zulässt. So wurde in der vorliegenden Arbeit die Beobachtung gemacht, dass beide hypusindefizienten Mutanten, vor allem aber eIF-5A_{K50R}, spezifisch mit DHS interagieren (vgl. Abschnitt 3.4.6). Gleichzeitig wurde jedoch bestätigt, dass diese eIF-5A-Mutanten nicht hypusiniert werden (vgl. Abschnitt 3.4.1). Diese beobachtete Interaktion bleibt also, obwohl stattfindend, ohne Wirkung. Diese Möglichkeiten zu untersuchen erfordert eine Reihe zusätzlicher Experimente, welche die funktionelle Bedeutung der neu entdeckten Interaktionen zum Gegenstand haben.

Für die Interaktion von eIF-5A1 mit dem ribosomalen Komplex wurde in einer Studie an Hefen (*S. cerevisiae*) eine starke Abhängigkeit von der Hypusinmodifikation festgestellt. Dort wurden in TAP-Experimenten mit den Hefe-Orthologen von eIF-5A1 und eIF-5A1_{K51R} in den TAP-Eluaten des Wildtyps einige ribosomale Proteine identifiziert. In den Eluaten der Mutante waren die entsprechenden Banden in der 1D-PAGE dagegen kaum noch zu erkennen¹³. Die hier vorgestellten Ergebnisse stehen zu diesen Beobachtungen im Gegensatz. In den PCA-Experimenten sowohl mit RPL10a, als auch mit RS5, in Kombination mit dem Wildtyp und den Mutanten von eIF-5A wurde kein signifikanter Unterschied der Signal-

intensität gemessen. Dies deutet darauf hin, dass die Wechselwirkungen sowohl von eIF-5A als auch den Mutanten eIF-5A_{K50R} und eIF-5A_{G52A} mit dem Ribosom ein vergleichbares Niveau erreichen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Assoziation von eIF-5A mit dem Ribosom hypusinunabhängig abläuft, die entstandene Bindung aber durch die Hypusinmodifikation entscheidend stabilisiert wird und unmodifiziertes eIF-5A zügig wieder vom Ribosom dissoziiert. Im TAP-Assay würde die Interaktion dann im Laufe der zeitaufwendigen Aufreinigung verloren gehen. Da der PCA aber an lebenden Zellen durchgeführt wird, besitzt er gerade im Hinblick auf kinetische Prozesse eine höhere Sensitivität und ist daher eher in der Lage, schwache und transiente Interaktionen zu detektieren. Dazu kommt, dass das einmal komplementierte YFP_{1/2}-Protein stabil bleibt und so die räumliche Nähe der Fusionsproteine aufrechterhält. Eine andere Erklärung für die Maskierung des Hypusineeffekts auf die Interaktion mit dem Ribosom wäre, dass im PCA eine indirekte Bindung beobachtet wurde, die durch hypusinunabhängig an translatierte mRNAs gebundenes eIF-5A zustande kam. Diese Bindung würde während der Durchführung des TAP-Assay ebenfalls verloren gehen, da keine Translationsinhibitoren wie Cycloheximid verwendet wurden und Ribosomen daher im Anschluss an die Zellyse schnell von gerade translatierten mRNAs dissoziieren.

Trotzdem lässt sich anhand der Ergebnisse der PCA-Experimente vermuten, dass die Bindestelle von eIF-5A zum Ribosom in der von der Hypusinmodifikation betroffenen, N-terminalen Domäne des Proteins liegt. Dies wird durch die Beobachtung untermauert, dass nur der N-terminale Teil des Proteins (eIF-5A₁₋₈₃) zu einem PCA-Signal führt, während der C-terminale Teil keinen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle erkennen lässt. Einen weiteren Hinweis auf ein Detail der Interaktion zwischen eIF-5A und Ribosom geben die reziproken TAP-Experimente, in denen RS5 und RL10a als *Bait*-Proteine verwendet wurden. Hier konnte nur RS5, also das Protein der kleinen Untereinheit, eine detektierbare Menge eIF-5A1 aufreinigen. Dies lässt vermuten, dass die den eIF-5A/Ribosom-Komplex stabilisierenden Komponenten wie zum Beispiel Wasserstoffbrücken eher mit Bereichen der kleinen Untereinheit ausgebildet werden.

Zwei weitere Proteine, die in dieser Arbeit als potentielle Interaktionspartner von eIF-5A identifiziert wurden, sind PAI-RBP1 und TDP-43. Beide Proteine gehören zu der Gruppe RNA-bindender Proteine. Für PAI-RBP1 wurde gezeigt, dass es die Stabilität bestimmter mRNAs beeinflussen kann¹⁷³. Diese Eigenschaft bildet eine funktionelle Übereinstimmung mit eIF-5A. Es ist also möglich, dass die beobachtete Interaktion auf spezifischen mRNAs basiert und auf diese eine stabilisierende oder destabilisierende Wirkung hat. TDP-43 hat dagegen eine Funktion im *Splicing* von pre-mRNAs¹⁷⁴. Das Protein ist überwiegend nukleär

lokalisiert und wies die stärkste der beobachteten Interaktionen mit eIF-5A auf. In beiden Fällen wäre es möglich, dass eIF-5A nicht direkt mit den Proteinen interagiert, sondern indirekt über die Bindung an RNAs (oder andere Interaktionspartner). Zumindest für TDP-43 ist die Möglichkeit einer direkten Interaktion aber wahrscheinlich: Dieses Protein zeigte sowohl in den normalen und reziproken TAP-, als auch in den PCA-Experimenten die stärksten Signale aller in dieser Arbeit näher untersuchten Kandidaten. Darüber hinaus existiert eine mögliche, funktionell interessante Verbindung zwischen eIF-5A und TDP-43 in der Biologie des HI-Virus: Für eIF-5A1 wurde eine Funktion als Regulator der HIV-1 Replikation beobachtet¹²⁶, TDP-43 ist ein negativer Regulator der HIV-1 Transkription¹⁷⁵. Verschiedene Mutationen lösen zudem die sogenannte „TDP-43 Proteinopathie“ aus, bei der das mutierte und dadurch schwer lösliche TDP-43 in Nervenzellen zu schweren Schädigungen und damit zur Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen führt¹⁷⁶. Es gibt bisher keine veröffentlichten Studien, die eIF-5A in Verbindung mit der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen bringen. Die starke Interaktion von TDP-43 mit eIF-5A, dessen Funktion in der TDP-43 Proteinopathie, und die fast exklusive Expression von eIF-5A2 im Nervengewebe lassen eine funktionale Interaktion jedoch möglich erscheinen und könnten die Überprüfung dieser Hypothese begründen.

Unter den in dieser Arbeit identifizierten Interaktionspartnern befinden sich auch Proteine, deren Identifikation als potentielle Interaktionspartner sich nicht ohne weiteres durch die bisher bekannten eIF-5A Funktionen erklären lassen. Ein Protein dieser Gruppe ist die Laktatdehydrogenase A (LDH-A). LDH-A ist als Bestandteil des Enzymsystems der Glykolyse am Laktatmetabolismus beteiligt. Mutationen des LDHA-Gens verursachen die Glykogenspeicherkrankheit Typ XI¹⁷⁷. Es wurde kürzlich gezeigt, dass LDH-A außerdem ein positiver Regulator des Zellzyklus ist und das Wachstum von Krebszellen beeinflusst¹⁷⁸. Dies könnte eine Verbindung zur eIF-5A Funktion herstellen und darauf hindeuten, dass eIF-5A tatsächlich nicht nur indirekt über die Proteinsynthese, sondern auch direkt regulativ in den Zellzyklus eingreift (vgl. Abschnitt 1.1.1). Interessanterweise wurden in den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten Unterschiede im Bindungsverhalten der beiden eIF-5A Isoformen zu LDH-A entdeckt: Die Deletionsmutante eIF-5A1₁₋₈₃ zeigte in Kombination mit LDH-A signifikante Signalunterschiede zur Negativkontrolle, während eIF-5A1₈₄₋₁₅₄ keine Interaktion mit LDH-A zeigte. Im Fall der beiden entsprechenden Mutanten der Isoform eIF-5A2 wurde das genaue Gegenteil beobachtet: Hier scheint eIF-5A2₈₄₋₁₅₄ mit LDH-A zu interagieren, während mit eIF-5A2₁₋₈₃ im PCA kein erhöhtes Signal detektierbar war. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten überdies geringe Unterschiede in der subzellulären Loka-

lisation der eIF-5A/LDH-A Komplexe (vgl. Abb. 3.44). Diese für den eIF-5A1 N-Terminus spezifische – und damit potentiell hypusinabhängige – Interaktion könnte einen Hinweis auf die hier vorgeschlagene funktionelle Diversifikation der beiden Isoformen im Verlauf der Evolution mehrzelliger Eukaryoten darstellen. Dazu passt, dass LDH-A in Säugetieren ubiquitär exprimiert wird und eine entscheidende Rolle im zellulären Metabolismus ausfüllt, sowie eine potentielle Funktion in der Zellzyklusregulation ausübt.

4.3. Ausblick

Die in dieser Arbeit beschriebenen Erkenntnisse und vor allem die darin etablierten Modelle für die Hypusinmodifikation sind mit der Zielsetzung angefertigt worden, das grundlegende Verständnis der Hypusinmodifikation zu erweitern, aber vor allem die Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte in der Humanmedizin zu ermöglichen. Sie sollen außerdem der Planung weiterer Projekte als Grundlage dienen.

Der hier verwendete konditionale *Dohh*-KO erlaubte es trotz des hier beschriebenen embryonal-letalen Phänotyps, Untersuchungen des Verlusts der DOHH am adulten Tier durchzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit war dies zwar nur in geringem Umfang möglich, die genaue Charakterisierung des *Dohh*-KO Phänotyps soll aber in Folgeprojekten fortgesetzt werden. Weitere Studien, die unter Verwendung der hier etablierten Mauslinie durchgeführt werden, sind bereits in Planung. So wäre es möglich, das konditionale *Dohh*-Allel in Verbindung mit der nur sehr kurz vorgestellten *Deleter*-Linie zum KO in hämatopoetischen Stammzellen (HSC-Scr-CreEsr1, vgl. Abschnitt 2.1.8) als Basis für die Entwicklung eines Modells für den Einfluss der Hypusinmodifikation in Leukämien zu verwenden. Sicherlich wird dieses Mausmodell für die DOHH-Funktion auch in anderen Forschungseinrichtungen Verwendung finden. Beispielsweise werden aktive Forschungsprojekte zur therapeutischen Adressierung der Hypusinmodifikation derzeit unter anderem für das HI-Virus, den Malaria-Erreger und den *Diabetes mellitus* Typ II sowie verschiedene Krebsarten verfolgt.

Weiterhin bietet das beschriebene Netzwerk ebenfalls Hinweise auf funktionelle Interaktionen von eIF-5A, die allerdings in weiteren Studien überprüft und im Detail beschrieben werden müssen. Zum Beispiel sind die unterschiedlichen Spezifitäten der beiden eIF-5A Isoformen und die Hypothese ihrer Ausprägung im Laufe der evolutionären Entstehung komplexer Eukaryoten aussichtsreiche Ansatzpunkte für zukünftige Projekte. Wie in allen *Screening*-Ansätzen bieten auch die in dieser Arbeit erhobenen Daten der Suche nach molekularen Mechanismen der eIF-5A-Funktion eine Fülle an Hypothesen, von denen die Erforschung

dieses essentiellen Proteins und seiner einzigartigen posttranslationalen Modifikation zukünftig profitieren kann.

5. Anhang

5.1. Referenzen

1. Gallego, M. & Virshup, D.M. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 139-48 (2007).
2. Witze, E.S., Old, W.M., Resing, K.A. & Ahn, N.G. Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nature methods* **4**, 798-806 (2007).
3. Cohen, P. The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. *Nature* **296**, 613-20 (1982).
4. Kornitzer, D. & Ciechanover, A. Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *Journal of cellular physiology* **182**, 1-11 (2000).
5. Park, M.H., Cooper, H.L. & Folk, J.E. Identification of hypusine, an unusual amino acid, in a protein from human lymphocytes and of spermidine as its biosynthetic precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 2869-73 (1981).
6. Wolff, E.C., Park, M.H. & Folk, J.E. Cleavage of spermidine as the first step in deoxyhypusine synthesis. The role of NAD. *The Journal of biological chemistry* **265**, 4793-9 (1990).
7. Abbruzzese, A., Park, M.H. & Folk, J.E. Deoxyhypusine hydroxylase from rat testis. Partial purification and characterization. *The Journal of biological chemistry* **261**, 3085-9 (1986).
8. Park, M.H., Wolff, E.C. & Folk, J.E. Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. *BioFactors* **4**, 95-104 (1993).
9. Schnier, J., Schwelberger, H.G., Smit-McBride, Z., Kang, H. a & Hershey, J.W. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **11**, 3105-14 (1991).
10. Saini, P., Eyler, D.E., Green, R. & Dever, T.E. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature* **459**, 118-21 (2009).
11. Lee, S.B. *et al.* The effect of hypusine modification on the intracellular localization of eIF5A. *Biochemical and biophysical research communications* **383**, 497-502 (2009).
12. Xu, A. & Chen, K.Y. Hypusine is required for a sequence-specific interaction of eukaryotic initiation factor 5A with postsystematic evolution of ligands by exponential enrichment RNA. *The Journal of biological chemistry* **276**, 2555-61 (2001).

13. Jao, D.L.-E. & Chen, K.Y. Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *Journal of cellular biochemistry* **97**, 583-98 (2006).
14. Benne, R. & Hershey, J.W. The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *The Journal of biological chemistry* **253**, 3078-87 (1978).
15. Kang, H.A. & Hershey, J.W. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **269**, 3934-40 (1994).
16. Zanelli, C.F. & Valentini, S.R. Is there a role for eIF5A in translation? *Amino acids* **33**, 351-8 (2007).
17. Gregio, A.P.B., Cano, V.P.S., Avaca, J.S., Valentini, S.R. & Zanelli, C.F. eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. *Biochemical and biophysical research communications* **380**, 785-90 (2009).
18. Zanelli, C.F. *et al.* eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochemical and biophysical research communications* **348**, 1358-66 (2006).
19. Dias, C. a O. *et al.* eIF5A interacts functionally with eEF2. *Amino acids* 0-5 (2011).doi:10.1007/s00726-011-0985-0
20. Rosorius, O. *et al.* Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *Journal of Cell Science* **112**, 2369-2380 (1999).
21. Lipowsky, G. *et al.* Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *The EMBO journal* **19**, 4362-71 (2000).
22. Hofmann, W. *et al.* Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *The Journal of cell biology* **152**, 895-910 (2001).
23. Xu, A., Jao, D.L.-E. & Chen, K.Y. Identification of mRNA that binds to eukaryotic initiation factor 5A by affinity co-purification and differential display. *Biochemical Journal* **384**, 585-590 (2004).
24. Zuk, D. & Jacobson, A. A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. *The EMBO journal* **17**, 2914-25 (1998).
25. Robbins, R.D. *et al.* Inhibition of deoxyhypusine synthase enhances islet {beta} cell function and survival in the setting of endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *The Journal of biological chemistry* (2010).doi:10.1074/jbc.M110.170142
26. Abbruzzese, A. Developmental pattern for deoxyhypusine hydroxylase in rat brain. *Journal of neurochemistry* **50**, 695-9 (1988).

27. Park, M.H., Nishimura, K., Zanelli, C.F. & Valentini, S.R. Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino acids* **38**, 491-500 (2010).
28. Wöhl, T., Klier, H., Ammer, H., Lottspeich, F. & Magdolen, V. The HYP2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for aerobic growth: characterization of different isoforms of the hypusine-containing protein Hyp2p and analysis of gene disruption mutants. *Molecular & general genetics* **241**, 305-11 (1993).
29. Sasaki, K., Abid, M.R. & Miyazaki, M. Deoxyhypusine synthase gene is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* **384**, 151-4 (1996).
30. Park, M.H., Joe, Y. a & Kang, K.R. Deoxyhypusine synthase activity is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **273**, 1677-83 (1998).
31. Chatterjee, I., Gross, S.R., Kinzy, T.G. & Chen, K.Y. Rapid depletion of mutant eukaryotic initiation factor 5A at restrictive temperature reveals connections to actin cytoskeleton and cell cycle progression. *Molecular genetics and genomics* **275**, 264-76 (2006).
32. Park, M.H., Cooper, H.L. & Folk, J.E. The biosynthesis of protein-bound hypusine (N epsilon -(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine). Lysine as the amino acid precursor and the intermediate role of deoxyhypusine (N epsilon -(4-aminobutyl)lysine). *The Journal of biological chemistry* **257**, 7217-22 (1982).
33. Park, M.H., Liberato, D.J., Yergey, A.L. & Folk, J.E. The biosynthesis of hypusine (N epsilon -(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine). Alignment of the butylamine segment and source of the secondary amino nitrogen. *The Journal of biological chemistry* **259**, 12123-7 (1984).
34. Jakus, J., Wolff, E.C., Park, M.H. & Folk, J.E. Features of the spermidine-binding site of deoxyhypusine synthase as derived from inhibition studies. Effective inhibition by bis- and mono-guanylated diamines and polyamines. *The Journal of biological chemistry* **268**, 13151-9 (1993).
35. Hanauske-Abel, H.M. *et al.* Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1221**, 115-124 (1994).
36. Nishimura, K. *et al.* Independent roles of eIF5A and polyamines in cell proliferation. *The Biochemical journal* **385**, 779-85 (2005).
37. Byers, T.L., Ganem, B. & Pegg, A.E. Cytostasis induced in L1210 murine leukaemia cells by the S-adenosyl-L-methionine decarboxylase inhibitor 5'-[(Z)-4-amino-2-butenyl]methylamino)-5'-deoxyadenosine may be due to hypusine depletion. *The Biochemical journal* **287** (Pt 3, 717-24 (1992).
38. Chattopadhyay, M.K., Tabor, C.W. & Tabor, H. Spermidine but not spermine is essential for hypusine biosynthesis and growth in *Saccharomyces cerevisiae*: spermine is converted to spermidine in vivo by the FMS1-amine oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 13869-74 (2003).

39. Park, J.-H. *et al.* Molecular cloning, expression, and structural prediction of deoxyhypusine hydroxylase: a HEAT-repeat-containing metalloenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 51-6 (2006).
40. Tome, M.E., Fiser, S.M., Payne, C.M. & Gerner, E.W. Excess putrescine accumulation inhibits the formation of modified eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) and induces apoptosis. *The Biochemical journal* **328** (Pt 3, 847-54 (1997).
41. Beninati, S., Nicolini, L., Jakus, J., Passeggio, A. & Abbruzzese, A. Identification of a substrate site for transglutaminases on the human protein synthesis initiation factor 5A. *The Biochemical journal* **305** (Pt 3, 725-8 (1995).
42. Beninati, S. *et al.* Tissue transglutaminase expression affects hypusine metabolism in BALB/c 3T3 cells. *FEBS letters* **437**, 34-8 (1998).
43. Caraglia, M. The Eukaryotic Initiation Factor 5A Is Involved in the Regulation of Proliferation and Apoptosis Induced by Interferon- and EGF in Human Cancer Cells. *Journal of Biochemistry* **133**, 757-765 (2003).
44. Taylor, C. a *et al.* Role of eIF5A in TNF-alpha-mediated apoptosis of lamina cribrosa cells. *Investigative ophthalmology & visual science* **45**, 3568-76 (2004).
45. Maier, B. *et al.* The unique hypusine modification of eIF5A promotes islet beta cell inflammation and dysfunction in mice. *The Journal of clinical investigation* **120**, 2156-70 (2010).
46. Jenkins, Z. a, Hååg, P.G. & Johansson, H.E. Human eIF5A2 on chromosome 3q25-q27 is a phylogenetically conserved vertebrate variant of eukaryotic translation initiation factor 5A with tissue-specific expression. *Genomics* **71**, 101-9 (2001).
47. Clement, P.M.J. *et al.* Identification and characterization of eukaryotic initiation factor 5A-2. *European Journal of Biochemistry* **270**, 4254-4263 (2003).
48. Cracchiolo, B.M. *et al.* Eukaryotic initiation factor 5A-1 (eIF5A-1) as a diagnostic marker for aberrant proliferation in intraepithelial neoplasia of the vulva. *Gynecologic oncology* **94**, 217-22 (2004).
49. Clement, P.M.J., Johansson, H.E., Wolff, E.C. & Park, M.H. Differential expression of eIF5A-1 and eIF5A-2 in human cancer cells. *FEBS Journal* **273**, 1102-1114 (2006).
50. Wolff, E.C., Kang, K.R., Kim, Y.S. & Park, M.H. Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification. *Amino acids* **33**, 341-50 (2007).
51. Tong, Y. *et al.* Crystal structure of human eIF5A1: insight into functional similarity of human eIF5A1 and eIF5A2. *Proteins* **75**, 1040-5 (2009).
52. Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M. & Sugimoto, A. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Current biology* **11**, 171-6 (2001).

53. Patel, P.H., Costa-Mattioli, M., Schulze, K.L. & Bellen, H.J. The *Drosophila* deoxyhypusine hydroxylase homologue nero and its target eIF5A are required for cell growth and the regulation of autophagy. *The Journal of cell biology* **185**, 1181-94 (2009).
54. Nishimura, K., Lee, S.B., Park, J.H. & Park, M.H. Essential role of eIF5A-1 and deoxyhypusine synthase in mouse embryonic development. *Amino acids* 1-8 (2011).doi:10.1007/s00726-011-0986-z
55. Hauber, I. *et al.* Identification of cellular deoxyhypusine synthase as a novel target for antiretroviral therapy. *The Journal of Clinical Investigation* **115**, 76-85 (2005).
56. Liu, J., Henao-Mejia, J., Liu, H., Zhao, Y. & He, J.J. Translational Regulation of HIV-1 Replication by HIV-1 Rev Cellular Cofactors Sam68, eIF5A, hRIP, and DDX3. *Journal of neuroimmune pharmacology* **6**, 308-21 (2011).
57. Moore, C.C. *et al.* Eukaryotic translation initiation factor 5A small interference RNA-liposome complexes reduce inflammation and increase survival in murine models of severe sepsis and acute lung injury. *The Journal of infectious diseases* **198**, 1407-14 (2008).
58. Chen, G. *et al.* Proteomic analysis of eIF-5A in lung adenocarcinomas. *Proteomics* **3**, 496-504 (2003).
59. Lam, F.F. *et al.* Identification of distinctive protein expression patterns in colorectal adenoma. *Proteomics. Clinical applications* **4**, 60-70 (2010).
60. Chen, Z.P. *et al.* Effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase on the differentiation of mouse neuroblastoma and erythroleukemia cells. *Cancer letters* **105**, 233-9 (1996).
61. Balabanov, S. *et al.* Hypusination of eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A): a novel therapeutic target in BCR-ABL-positive leukemias identified by a proteomics approach. *Blood* **109**, 1701-11 (2007).
62. Clement, P.M.J., Hanauske-Abel, H.M., Wolff, E.C., Kleinman, H.K. & Park, M.H. The antifungal drug ciclopirox inhibits deoxyhypusine and proline hydroxylation, endothelial cell growth and angiogenesis in vitro. *International journal of cancer* **100**, 491-8 (2002).
63. Guan, X.-y *et al.* Isolation of a novel candidate oncogene within a frequently amplified region at 3q26 in ovarian cancer. *Cancer Research* **61**, 3806-9 (2001).
64. Xie, D. *et al.* Overexpression of EIF-5A2 is associated with metastasis of human colorectal carcinoma. *Human pathology* **39**, 80-6 (2008).
65. Chen, W. *et al.* Overexpression of EIF-5A2 is an independent predictor of outcome in patients of urothelial carcinoma of the bladder treated with radical cystectomy. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* **18**, 400-8 (2009).

66. He, L.-R. *et al.* Overexpression of eIF5A-2 is an adverse prognostic marker of survival in stage I non-small cell lung cancer patients. *International journal of cancer* **129**, 143-50 (2011).
67. Guan, X.-Y. *et al.* Oncogenic role of eIF-5A2 in the development of ovarian cancer. *Cancer research* **64**, 4197-200 (2004).
68. Tang, D.-J. *et al.* Overexpression of eukaryotic initiation factor 5A2 enhances cell motility and promotes tumor metastasis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **51**, 1255-63 (2010).
69. Zender, L. *et al.* An oncogenomics-based in vivo RNAi screen identifies tumor suppressors in liver cancer. *Cell* **135**, 852-64 (2008).
70. Caraglia, M. *et al.* The role of eukaryotic initiation factor 5A in the control of cell proliferation and apoptosis. *Amino acids* **20**, 91-104 (2001).
71. Boon, K. *et al.* N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *The EMBO journal* **20**, 1383-93 (2001).
72. Coller, H. a *et al.* Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 3260-5 (2000).
73. Rahman-Roblick, R. *et al.* p53 targets identified by protein expression profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 5401-6 (2007).
74. Kim, Y.S. *et al.* Deoxyhypusine hydroxylase is a Fe(II)-dependent, HEAT-repeat enzyme. Identification of amino acid residues critical for Fe(II) binding and catalysis [corrected]. *The Journal of biological chemistry* **281**, 13217-25 (2006).
75. Kang, K.R., Kim, Y.S., Wolff, E.C. & Park, M.H. Specificity of the Deoxyhypusine Hydroxylase-Eukaryotic Translation Initiation Factor (eIF5A) Interaction. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 8300 -8308 (2007).
76. Hoque, M. *et al.* Inhibition of HIV-1 gene expression by Cyclopirox and Deferiprone, drugs that prevent hypusination of eukaryotic initiation factor 5A. *Retrovirology* **6**, 90 (2009).
77. Dihazi, H. *et al.* Multipotent adult germline stem cells and embryonic stem cells functional proteomics revealed an important role of eukaryotic initiation factor 5A (Eif5a) in stem cell differentiation. *Journal of proteome research* **10**, 1962-73 (2011).
78. Shoemaker, B. a & Panchenko, A.R. Deciphering protein-protein interactions. Part I. Experimental techniques and databases. *PLoS computational biology* **3**, e42 (2007).
79. Giot, L. *et al.* A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* **302**, 1727-36 (2003).

80. Tarassov, K. *et al.* An in vivo map of the yeast protein interactome. *Science* **320**, 1465-70 (2008).
81. Gong, Y. *et al.* An atlas of chaperone-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*: implications to protein folding pathways in the cell. *Molecular systems biology* **5**, 275 (2009).
82. Ho, Y. *et al.* Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**, 180-3 (2002).
83. Aebersold, R. & Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198-207 (2003).
84. Amatruda, J.F., Shepard, J.L., Stern, H.M. & Zon, L.I. Zebrafish as a cancer model system. *Cancer cell* **1**, 229-31 (2002).
85. Brown, S.D.M., Hardisty-Hughes, R.E. & Mburu, P. Quiet as a mouse: dissecting the molecular and genetic basis of hearing. *Nature reviews. Genetics* **9**, 277-90 (2008).
86. Abate-Shen, C. & Shen, M.M. Mouse models of prostate carcinogenesis. *Trends in genetics* **18**, S1-5 (2002).
87. Jacob, H.J., Lazar, J., Dwinell, M.R., Moreno, C. & Geurts, A.M. Gene targeting in the rat: advances and opportunities. *Trends in genetics* **26**, 510-8 (2010).
88. Walrath, J.C., Hawes, J.J., Van Dyke, T. & Reilly, K.M. *Genetically engineered mouse models in cancer research. Advances in cancer research* **106**, 113-64 (Elsevier INC: 2010).
89. Martin, B., Ji, S., Maudsley, S. & Mattson, M.P. "Control" laboratory rodents are metabolically morbid: why it matters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 6127-33 (2010).
90. Thomas, K.R. & Capecchi, M.R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**, 503-12 (1987).
91. Capecchi, M.R. Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**, 1288-92 (1989).
92. Capecchi, M.R. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nature reviews. Genetics* **6**, 507-12 (2005).
93. Cox, M.M. The FLP protein of the yeast 2-microns plasmid: expression of a eukaryotic genetic recombination system in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 4223-7 (1983).
94. Sternberg, N. & Hamilton, D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *Journal of molecular biology* **150**, 467-86 (1981).
95. Branda, C.S. & Dymecki, S.M. Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Developmental cell* **6**, 7-28 (2004).

96. Gossen, M. & Bujard, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 5547-51 (1992).
97. Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M. & Rajewsky, K. Inducible gene targeting in mice. *Science* **269**, 1427-9 (1995).
98. Metzger, D. & Chambon, P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* **24**, 71-80 (2001).
99. Marumoto, T. *et al.* Development of a novel mouse glioma model using lentiviral vectors. *Nature medicine* **15**, 110-6 (2009).
100. Markham, K., Bai, Y. & Schmitt-Ulms, G. Co-immunoprecipitations revisited: an update on experimental concepts and their implementation for sensitive interactome investigations of endogenous proteins. *Analytical and bioanalytical chemistry* **389**, 461-73 (2007).
101. Brymora, A., Cousin, M. a, Roufogalis, B.D. & Robinson, P.J. Enhanced protein recovery and reproducibility from pull-down assays and immunoprecipitations using spin columns. *Analytical biochemistry* **295**, 119-22 (2001).
102. Li, Y. The tandem affinity purification technology: an overview. *Biotechnology letters* **33**, 1487-99 (2011).
103. Kühner, S. *et al.* Proteome organization in a genome-reduced bacterium. *Science* **326**, 1235-40 (2009).
104. Jäger, S. *et al.* Global landscape of HIV-human protein complexes. *Nature* 1-6 (2011).doi:10.1038/nature10719
105. Wodak, S.J., Pu, S., Vlasblom, J. & Séraphin, B. Challenges and rewards of interaction proteomics. *Molecular & cellular proteomics* **8**, 3-18 (2009).
106. James, P., Halladay, J. & Craig, E. a Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-36 (1996).
107. Pelletier, J.N., Campbell-Valois, F.X. & Michnick, S.W. Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 12141-6 (1998).
108. Nyfeler, B., Michnick, S.W. & Hauri, H.-P. Capturing protein interactions in the secretory pathway of living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 6350-5 (2005).
109. Banning, C. *et al.* A flow cytometry-based FRET assay to identify and analyse protein-protein interactions in living cells. *PloS one* **5**, e9344 (2010).

110. Schwenk, F., Baron, U. & Rajewsky, K. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic acids research* **23**, 5080-1 (1995).
111. Rodríguez, C.I. *et al.* High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nature genetics* **25**, 139-40 (2000).
112. Göthert, J.R. *et al.* In vivo fate-tracing studies using the Scl stem cell enhancer: embryonic hematopoietic stem cells significantly contribute to adult hematopoiesis. *Blood* **105**, 2724-32 (2005).
113. Hayashi, S. & McMahon, A.P. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Developmental biology* **244**, 305-18 (2002).
114. Todaro, G.J. & Green, H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of cell biology* **17**, 299-313 (1963).
115. Voigt, A. Erzeugung und Charakterisierung von Mausmodellen zur Aufklärung der peripheren und zentralen gustatorischen Kommunikationsbahnen. (2011).at <http://opus.kobv.de/tuberlin/volltexte/2011/3200/pdf/voigt_anja.pdf>
116. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-8 (2001).
117. Riccardi, C. & Nicoletti, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols* **1**, 1458-61 (2006).
118. Szklarczyk, D. *et al.* The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic acids research* **39**, D561-8 (2011).
119. Kerrien, S. *et al.* The IntAct molecular interaction database in 2012. *Nucleic acids research* (2011).doi:10.1093/nar/gkr1088
120. Warde-Farley, D. *et al.* The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic acids research* **38**, W214-20 (2010).
121. Jain, E. *et al.* Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. *BMC bioinformatics* **10**, 136 (2009).
122. Mi, H. *et al.* PANTHER version 7: improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium. *Nucleic acids research* **38**, D204-10 (2010).
123. Thomas, P.D. *et al.* PANTHER: a browsable database of gene products organized by biological function, using curated protein family and subfamily classification. *Nucleic acids research* **31**, 334-41 (2003).

124. Schneider, A., Dessimoz, C. & Gonnet, G.H. OMA Browser--exploring orthologous relations across 352 complete genomes. *Bioinformatics* **23**, 2180-2 (2007).
125. Smoot, M.E., Ono, K., Ruscheinski, J., Wang, P.-L. & Ideker, T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics* **27**, 431-2 (2011).
126. Bevec, D. *et al.* Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. *Science* **271**, 1858-60 (1996).
127. Maier, B., Tersey, S.A. & Mirmira, R.G. Hypusine: a new target for therapeutic intervention in diabetic inflammation. *Discovery medicine* **10**, 18-23 (2010).
128. Kallikourdis, M., Andersen, K.G., Welch, K.A. & Betz, A.G. Alloantigen-enhanced accumulation of CCR5+ "effector" regulatory T cells in the gravid uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 594-9 (2007).
129. Klier, H. *et al.* Isolation and structural characterization of different isoforms of the hypusine-containing protein eIF-5A from HeLa cells. *Biochemistry* **34**, 14693-702 (1995).
130. Fox, M.H. A model for the computer analysis of synchronous DNA distributions obtained by flow cytometry. *Cytometry* **1**, 71-7 (1980).
131. Bürckstümmer, T. *et al.* An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nature Methods* **3**, 1013-19 (2006).
132. Cano, V.S.P. *et al.* Mutational analyses of human eIF5A-1--identification of amino acid residues critical for eIF5A activity and hypusine modification. *The FEBS journal* **275**, 44-58 (2008).
133. Costa-Neto, C.M. *et al.* Molecular modeling of the human eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) based on spectroscopic and computational analyses. *Biochemical and biophysical research communications* **347**, 634-40 (2006).
134. Glatter, T., Wepf, A., Aebersold, R. & Gstaiger, M. An integrated workflow for charting the human interaction proteome: insights into the PP2A system. *Molecular systems biology* **5**, 237 (2009).
135. Kerppola, T.K. Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 449-56 (2006).
136. Blaha, G., Stanley, R.E. & Steitz, T. a Formation of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70S ribosome. *Science* **325**, 966-70 (2009).
137. Henderson, A. & Hershey, J.W. Eukaryotic translation initiation factor (eIF) 5A stimulates protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1-5** (2011).doi:10.1073/pnas.1008150108

138. Geser, F., Martinez-Lage, M., Kwong, L.K., Lee, V.M.-Y. & Trojanowski, J.Q. Amyotrophic lateral sclerosis, frontotemporal dementia and beyond: the TDP-43 diseases. *Journal of neurology* **256**, 1205-14 (2009).
139. Hauber, J. Revisiting an old acquaintance: role for eIF5A in diabetes. *The Journal of clinical investigation* **120**, 1806-8 (2010).
140. Kaiser, A. Translational control of eIF5A in various diseases. *Amino acids* (2011).doi:10.1007/s00726-011-1042-8
141. Templin, A.T., Maier, B., Nishiki, Y., Tersey, S.A. & Mirmira, R.G. Deoxyhypusine synthase haploinsufficiency attenuates acute cytokine signaling. *Cell cycle* **10**, 1-7 (2011).
142. Kwan, K.-ming Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis* **32**, 49-62 (2002).
143. Copeland, N.G., Jenkins, N. a & Court, D.L. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nature reviews. Genetics* **2**, 769-79 (2001).
144. Zhang, Y., Muyrers, J.P., Testa, G. & Stewart, a F. DNA cloning by homologous recombination in Escherichia coli. *Nature biotechnology* **18**, 1314-7 (2000).
145. Seong, E., Saunders, T.L., Stewart, C.L. & Burmeister, M. To knockout in 129 or in C57BL/6: that is the question. *Trends in genetics* **20**, 59-62 (2004).
146. Fedorov, L.M., Haegel-Kronenberger, H. & Hirchenhain, J. A comparison of the germline potential of differently aged ES cell lines and their transfected descendants. *Transgenic research* **6**, 223-31 (1997).
147. Pettitt, S.J. *et al.* Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nature methods* **6**, 493-5 (2009).
148. McVicar, D.W. *et al.* Aberrant DAP12 signaling in the 129 strain of mice: implications for the analysis of gene-targeted mice. *Journal of immunology* **169**, 1721-8 (2002).
149. Wong, G.T. Speed congenics: applications for transgenic and knock-out mouse strains. *Neuropeptides* **36**, 230-6 (2002).
150. Longo, L., Bygrave, A., Grosveld, F.G. & Pandolfi, P.P. The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism. *Transgenic research* **6**, 321-8 (1997).
151. Kim, Y. *et al.* Targeted inactivation of p12, CDK2 associating protein 1, leads to early embryonic lethality. *PloS one* **4**, e4518 (2009).
152. Luchessi, A.D. *et al.* Insights on eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in the brain and aging. *Brain research* **1228**, 6-13 (2008).
153. Gebauer, C.M. Ein mathematisches Kompartimentmodell der murinen Erythro- und Granulopoese unter simultaner Gabe von Erythropoietin und G-CSF. (2011).at

<http://www.qucosa.de/fileadmin/data/qucosa/documents/6671/Diss-Gebauer_2011-02-23_PDF-14.pdf>

154. Yanai, N., Satoh, T. & Obinata, M. Endothelial cells create a hematopoietic inductive microenvironment preferential to erythropoiesis in the mouse spleen. *Cell structure and function* **16**, 87-93 (1991).
155. Sekine, S., Ogawa, R. & Kanai, Y. Hepatomas with activating Ctnnb1 mutations in “Ctnnb1-deficient” livers: a tricky aspect of a conditional knockout mouse model. *Carcinogenesis* **32**, 622-8 (2011).
156. Cristofalo, V.J. & Sharf, B.B. Cellular senescence and DNA synthesis. Thymidine incorporation as a measure of population age in human diploid cells. *Experimental cell research* **76**, 419-27 (1973).
157. Nishio, K., Inoue, A., Qiao, S., Kondo, H. & Mimura, A. Senescence and cytoskeleton: overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts. *Histochemistry and cell biology* **116**, 321-7 (2001).
158. Dimri, G.P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 9363-7 (1995).
159. Yanishevsky, R., Mendelsohn, M.L., Mayall, B.H. & Cristofalo, V.J. Proliferative capacity and DNA content of aging human diploid cells in culture: a cytophotometric and autoradiographic analysis. *Journal of cellular physiology* **84**, 165-70 (1974).
160. Yanishevsky, R. & Carrano, A.V. Prematurely condensed chromosomes of dividing and non-dividing cells in aging human cell cultures. *Experimental cell research* **90**, 169-74 (1975).
161. Mammone, T., Gan, D. & Foyouzi-Youssefi, R. Apoptotic cell death increases with senescence in normal human dermal fibroblast cultures. *Cell biology international* **30**, 903-9 (2006).
162. Chen, K.Y., Chang, Z.F. & Liu, A.Y. Changes of serum-induced ornithine decarboxylase activity and putrescine content during aging of IMR-90 human diploid fibroblasts. *Journal of cellular physiology* **129**, 142-6 (1986).
163. Chen, K.Y. & Liu, A.Y. Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. *Biological signals* **6**, 105-9 (1997).
164. Bevec, D. *et al.* Molecular characterization of a cDNA encoding functional human deoxyhypusine synthase and chromosomal mapping of the corresponding gene locus. *FEBS letters* **378**, 195-8 (1996).
165. Park, J.H. *et al.* Production of active recombinant eIF5A: reconstitution in E.coli of eukaryotic hypusine modification of eIF5A by its coexpression with modifying enzymes. *Protein engineering, design & selection* **1- 9** (2010).doi:10.1093/protein/gzq110

166. Ding, L. *et al.* The role of eIF5A in epidermal growth factor-induced proliferation of corneal epithelial cell association with PI3-k/Akt activation. *Molecular vision* **17**, 16-22 (2011).
167. Patel, P.H., Costa-Mattioli, M., Schulze, K.L. & Bellen, H.J. The *Drosophila* deoxyhypusine hydroxylase homologue nero and its target eIF5A are required for cell growth and the regulation of autophagy. (Supplemental material). *Journal of Cell Biology* **185**, (2009).
168. Christensen, G.L. *et al.* Screening the SPO11 and EIF5A2 genes in a population of infertile men. *Fertility and Sterility* **84**, 758-760 (2005).
169. Kobayashi, T. *et al.* Glycogen synthase kinase 3 and h-prune regulate cell migration by modulating focal adhesions. *Molecular and cellular biology* **26**, 898-911 (2006).
170. Keyser, B. *et al.* Disease-causing missense mutations affect enzymatic activity, stability and oligomerization of glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH). *Human molecular genetics* **17**, 3854-63 (2008).
171. Sreedharan, J. *et al.* TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)* **319**, 1668-72 (2008).
172. Benajiba, L. *et al.* TARDBP mutations in motoneuron disease with frontotemporal lobar degeneration. *Annals of neurology* **65**, 470-3 (2009).
173. Heaton, J.H., Dlakic, W.M., Dlakic, M. & Gelehrter, T.D. Identification and cDNA cloning of a novel RNA-binding protein that interacts with the cyclic nucleotide-responsive sequence in the Type-1 plasminogen activator inhibitor mRNA. *The Journal of biological chemistry* **276**, 3341-7 (2001).
174. Strong, M.J. *et al.* TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein. *Molecular and cellular neurosciences* **35**, 320-7 (2007).
175. Ou, S.H., Wu, F., Harrich, D., García-Martínez, L.F. & Gaynor, R.B. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *Journal of virology* **69**, 3584-96 (1995).
176. Cook, C., Zhang, Y.-jie, Xu, Y.-fei, Dickson, D.W. & Petrucelli, L. TDP-43 in neurodegenerative disorders. *Expert opinion on biological therapy* **8**, 969-78 (2008).
177. Maekawa, M., Sudo, K., Kanno, T. & Li, S.S. Molecular characterization of genetic mutation in human lactate dehydrogenase-A (M) deficiency. *Biochemical and biophysical research communications* **168**, 677-82 (1990).
178. Langhammer, S., Najjar, M., Hess-Stumpp, H. & Thierauch, K.-H. LDH-A influences hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α) and is critical for growth of HT29 colon carcinoma cells in vivo. *Targeted oncology* **6**, 155-62 (2011).

5.2. Liste der per Bioreaktor-TAP-MS/MS identifizierten Proteine

Alle unter Abschnitt 5.2 dargestellten Tabellen beziehen sich auf den Status nach Anwendung beider Filter (vgl. Abschnitt 3.4.1). In der vierten Spalte der Tabellen 4 bis 8 ist die Anzahl der in beiden Replikaten insgesamt identifizierten Peptide angegeben. Tabelle 8 enthält alle Proteine des ‚Matrix-Proteom‘-Filters, die durch die Verwendung von eGFP-SG im ‚Bioreaktor-TAP-MS/MS‘ identifiziert wurden.

Tabelle 3: Nichtredundante Liste aller identifizierten Interaktionspartner von eIF-5A1, eIF-5A2, DHS und DOHH

| Identifizierte Proteine (261) | ID | Gen-bezeichnung | Größe (kDa) |
|--|--------|-----------------|-------------|
| Deoxyhypusine synthase (DHS) (EC 2.5.1.46) | Q3TXU5 | Dhps | 41 |
| Deoxyhypusine hydroxylase (DOHH) (EC 1.14.99.29) (Deoxyhypusine dioxygenase) (Deoxyhypusine monooxygenase) | Q99LN9 | Dohh | 33 |
| Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 (eIF-5A-1) (eIF-5A1) (Eukaryotic initiation factor 5A isoform 1) (eIF-5A) (eIF-4D) | P63242 | Eif5a | 17 |
| Nucleolin (Protein C23) | P09405 | Ncl | 77 |
| Eukaryotic translation initiation factor 5A-2 (eIF-5A-2) (eIF-5A2) (Eukaryotic initiation factor 5A isoform 2) | Q8BGY2 | Eif5a2 | 17 |
| Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein (Beige-like protein) | Q9ESE1 | Lrba | 317 |
| 60S ribosomal protein L4 | Q9D8E6 | Rpl4 | 47 |
| Glutaryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (GCD) (EC 1.3.99.7) | Q60759 | Gcdh | 49 |
| Myb-binding protein 1A (Myb-binding protein of 160 kDa) | Q7TPV4 | Mybbp1a | 152 |
| 60S ribosomal protein L3 (J1 protein) | P27659 | Rpl3 | 46 |
| Nucleolar RNA helicase 2 (EC 3.6.4.13) (DEAD box protein 21) (Gu-alpha) (Nucleolar RNA helicase Gu) (Nucleolar RNA helicase II) (RH II/Gu) | Q9JIK5 | Ddx21 | 94 |
| DNA replication licensing factor MCM3 (EC 3.6.4.12) (DNA polymerase alpha holoenzyme-associated protein P1) (P1-MCM3) | P25206 | Mcm3 | 92 |
| DNA replication licensing factor MCM5 (EC 3.6.4.12) (CDC46 homolog) (P1-CDC46) | P49718 | Mcm5 | 82 |
| 40S ribosomal protein S7 | P62082 | Rps7 | 22 |
| T-complex protein 1 subunit theta (TCP-1-theta) (CCT-theta) | P42932 | Cct8 | 60 |
| 40S ribosomal protein S14 | P62264 | Rps14 | 16 |
| 60S ribosomal protein L6 (TAX-responsive enhancer element-binding protein 107) (TAXREB107) | P47911 | Rpl6 | 34 |
| Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein (PAI1 RNA-binding protein 1) (PAI-RBP1) (SERPINE1 mRNA-binding protein 1) | Q9CY58 | Serbp1 | 45 |
| RNA-binding protein 14 (RNA-binding motif protein 14) | Q8C2Q3 | Rbm14 | 69 |
| 40S ribosomal protein S4, X isoform | P62702 | Rps4x | 30 |
| 60S ribosomal protein L7 | P14148 | Rpl7 | 31 |
| 60S ribosomal protein L5 | P47962 | Rpl5 | 34 |
| RNA-binding protein EWS | Q61545 | Ewsr1 | 68 |
| Heat shock protein HSP 90-alpha (Heat shock 86 kDa) (HSP 86) (HSP86) (Tumor-specific transplantation 86 kDa antigen) (TSTA) | P07901 | Hsp90aa1 | 85 |
| T-complex protein 1 subunit gamma (TCP-1-gamma) (CCT-gamma) (Matricin) (mTRiC-P5) | P80318 | Cct3 | 61 |
| 60S ribosomal protein L7a (Surfeit locus protein 3) | P12970 | Rpl7a | 30 |
| Lipoyltransferase 1, mitochondrial (EC 2.3.1.-) (Lipoate biosynthesis protein) (Lipoate-protein ligase) (Lipoyl ligase) | Q8VCM4 | Lipt1 | 42 |
| 60S ribosomal protein L13 (A52) | P47963 | Rpl13 | 24 |
| 60S ribosomal protein L11 | Q9CXW4 | Rpl11 | 20 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) (HDP-1) (Helix-destabilizing protein) (Single-strand-binding protein) (Topoisomerase-inhibitor suppressed) (hnRNP core protein A1) | P49312 | Hnrnpa1 | 34 |

| | | | |
|--|--------|----------|-----|
| 60S acidic ribosomal protein P0 (60S ribosomal protein L10E) | P14869 | Rplp0 | 34 |
| Putative methyltransferase NSUN5 (EC 2.1.1.-) (NOL1/NOP2/Sun domain family member 5) (Williams-Beuren syndrome chromosomal region 20A protein homolog) | Q8K4F6 | Nsun5 | 51 |
| Rho guanine nucleotide exchange factor 2 (Guanine nucleotide exchange factor H1) (GEF-H1) (LBC'S first cousin) (Lymphoid blast crisis-like 1) (Oncogene LFC) (Rhubin) | Q60875 | Arhgef2 | 112 |
| DNA topoisomerase 2-alpha (EC 5.99.1.3) (DNA topoisomerase II, alpha isozyme) | Q01320 | Top2a | 173 |
| RNA-binding protein FUS (Protein pigpen) | P56959 | Fus | 53 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U) (Scaffold attachment factor A) (SAF-A) | Q8VEK3 | Hnrnpu | 88 |
| Histone H1.2 (H1 VAR.1) (H1c) | P15864 | Hist1h1c | 21 |
| Cyclin-dependent kinase 17 (EC 2.7.11.22) (Cell division protein kinase 17) (PCTAIRE-motif protein kinase 2) (Serine/threonine-protein kinase PCTAIRE-2) | Q8K0D0 | Cdk17 | 60 |
| T-complex protein 1 subunit zeta (TCP-1-zeta) (CCT-zeta-1) | P80317 | Cct6a | 58 |
| T-complex protein 1 subunit epsilon (TCP-1-epsilon) (CCT-epsilon) | P80316 | Cct5 | 60 |
| Putative RNA-binding protein Luc7-like 2 (CGI-74 homolog) | Q7TNC4 | Luc7l2 | 47 |
| 40S ribosomal protein S3a (Protein TU-11) | P97351 | Rps3a | 30 |
| UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1 (UGT1) (EC 2.4.1.-) (UDP--Glc:glycoprotein glucosyltransferase) (UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1) | Q6P5E4 | Uggt1 | 176 |
| DNA topoisomerase 1 (EC 5.99.1.2) (DNA topoisomerase I) | Q04750 | Top1 | 91 |
| Protein LYRIC (3D3/LYRIC) (Lysine-rich CEACAM1 co-isolated protein) (Metadherin) (Metastasis adhesion protein) | Q80WJ7 | Mtdh | 64 |
| 60S ribosomal protein L8 | P62918 | Rpl8 | 28 |
| Kinesin-like protein KIF2A (Kinesin-2) | P28740 | Kif2a | 80 |
| Myosin-9 (Cellular myosin heavy chain, type A) (Myosin heavy chain 9) (Myosin heavy chain, non-muscle IIa) (Non-muscle myosin heavy chain A) (NMMHC-A) (Non-muscle myosin heavy chain IIa) (NMMHC II-a) (NMMHC-IIA) | Q8VDD5 | Myh9 | 226 |
| Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1 | Q3UPF5 | Zc3hav1 | 107 |
| T-complex protein 1 subunit delta (TCP-1-delta) (A45) (CCT-delta) | P80315 | Cct4 | 58 |
| Serine/threonine-protein kinase MARK2 (EC 2.7.11.1) (ELKL motif kinase 1) (EMK-1) (MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2) | Q05512 | Mark2 | 86 |
| 40S ribosomal protein S19 | Q9CZX8 | Rps19 | 16 |
| 40S ribosomal protein S10 | P63325 | Rps10 | 19 |
| Heat shock protein 105 kDa (42 degrees C-HSP) (Heat shock 110 kDa protein) (Heat shock-related 100 kDa protein E71) (HSP-E71) | Q61699 | Hsph1 | 96 |
| Proliferation-associated protein 2G4 (IRES-specific cellular trans-acting factor 45 kDa) (ITAF45) (Mpp1) (Proliferation-associated protein 1) (Protein p38-2G4) | P50580 | Pa2g4 | 44 |
| RNA-binding protein 39 (Coactivator of activating protein 1 and estrogen receptors) (Coactivator of AP-1 and ERs) (RNA-binding motif protein 39) (RNA-binding region-containing protein 2) (Transcription coactivator CAPER) | Q8VH51 | Rbm39 | 59 |
| Nucleophosmin (NPM) (Nucleolar phosphoprotein B23) (Nucleolar protein NO38) (Numatrin) | Q61937 | Npm1 | 33 |
| Protein RCC2 | Q8BK67 | Rcc2 | 56 |
| T-complex protein 1 subunit eta (TCP-1-eta) (CCT-eta) | P80313 | Cct7 | 60 |
| 40S ribosomal protein S6 (Phosphoprotein NP33) | P62754 | Rps6 | 29 |
| 40S ribosomal protein S2 (40S ribosomal protein S4) (Protein LLRep3) | P25444 | Rps2 | 31 |
| Dedicator of cytokinesis protein 8 | Q8C147 | Dock8 | 239 |
| ATPase family AAA domain-containing protein 3 (AAA-ATPase TOB3) | Q92511 | Atad3 | 67 |
| YTH domain family protein 3 | Q8BYK6 | Ythdf3 | 64 |
| Nucleolar GTP-binding protein 1 (Chronic renal failure gene protein) (GTP-binding protein NGB) | Q99ME9 | Gtbp4 | 74 |
| Guanine nucleotide-binding protein-like 3 (Nucleolar GTP-binding protein 3) (Nucleostemin) | Q8CI11 | Gnl3 | 61 |
| L-lactate dehydrogenase A chain (LDH-A) (EC 1.1.1.27) (LDH muscle subunit) (LDH-M) | P06151 | Ldha | 36 |
| Poly(rC)-binding protein 1 (Alpha-CP1) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1) (hnRNP E1) | P60335 | Pcbp1 | 37 |

| | | | |
|---|--------|-----------|-----|
| 60S ribosomal protein L9 | P51410 | Rpl9 | 22 |
| 60S ribosomal protein L18 | P35980 | Rpl18 | 22 |
| ATP-dependent RNA helicase DDX1 (EC 3.6.4.13) (DEAD box protein 1) | Q91VR5 | Ddx1 | 83 |
| RNA-binding protein 28 (RNA-binding motif protein 28) | Q8CGC6 | Rbm28 | 84 |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX27 (EC 3.6.4.13) (DEAD box protein 27) | Q921N6 | Ddx27 | 86 |
| Serine/threonine-protein kinase RIO2 (EC 2.7.11.1) (RIO kinase 2) | Q9CQS5 | Riok2 | 62 |
| Cell growth-regulating nucleolar protein (Protein expressed in male leptotene and zygotene spermatocytes 264) (MLZ-264) | Q08288 | Lyar | 44 |
| ATP-binding cassette sub-family F member 1 | Q6P542 | Abcf1 | 95 |
| 40S ribosomal protein S9 | Q6ZWN5 | Rps9 | 23 |
| Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 (EC 3.6.4.13) (DEAH box protein 15) | O35286 | Dhx15 | 91 |
| Lupus La protein homolog (La autoantigen homolog) (La ribonucleoprotein) | P32067 | Ssb | 48 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q (hnRNP Q) (Glycine- and tyrosine-rich RNA-binding protein) (GRY-RBP) (NS1-associated protein 1) (Synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein) (pp68) | Q7TMK9 | Syncrip | 70 |
| E3 ubiquitin-protein ligase TRIM33 (EC 6.3.2.-) (Ectodermin homolog) (Transcription intermediary factor 1-gamma) (TIF1-gamma) (Tripartite motif-containing protein 33) | Q99PP7 | Trim33 | 124 |
| E3 ubiquitin-protein ligase RLIM (EC 6.3.2.-) (LIM domain-interacting RING finger protein) (RING finger LIM domain-binding protein) (R-LIM) (RING finger protein 12) | Q9WTV7 | Rlim | 66 |
| Pre-rRNA-processing protein TSR1 homolog | Q5SWD9 | Tsr1 | 92 |
| Protein regulator of cytokinesis 1 | Q99K43 | Prc1 | 70 |
| Moesin (Membrane-organizing extension spike protein) | P26041 | Msn | 68 |
| 60S ribosomal protein L23a | P62751 | Rpl23a | 18 |
| Polyadenylate-binding protein 1 (PABP-1) (Poly(A)-binding protein 1) | P29341 | Pabpc1 | 71 |
| 5'-3' exoribonuclease 2 (EC 3.1.13.-) (Protein Dhm1) | Q9DBR1 | Xrn2 | 109 |
| Pescadillo homolog | Q9EQ61 | Pes1 | 68 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) | P61979 | Hnrnpk | 51 |
| Replication factor C subunit 1 (A1-P145) (Activator 1 140 kDa subunit) (A1 140 kDa subunit) (Activator 1 large subunit) (Activator 1 subunit 1) (Differentiation-specific element-binding protein) (ISRE-binding protein) (Replication factor C 140 kDa subunit) (RF-C 140 kDa subunit) (RFC140) (Replication factor C large subunit) | P35601 | Rfc1 | 126 |
| 40S ribosomal protein S18 (Ke-3) (Ke3) | P62270 | Rps18 | 18 |
| Vigilin (High density lipoprotein-binding protein) (HDL-binding protein) | Q8VDJ3 | Hdlbp | 142 |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX47 (EC 3.6.4.13) (DEAD box protein 47) | Q9CWX9 | Ddx47 | 51 |
| DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 (Dnmt1) (Met-1) (EC 2.1.1.37) (DNA methyltransferase Mmul) (DNA MTase Mmul) (M.Mmul) (MCMT) | P13864 | Dnmt1 | 183 |
| Nuclease-sensitive element-binding protein 1 (CCAAT-binding transcription factor I subunit A) (CBF-A) (DNA-binding protein B) (DBPB) (Enhancer factor I subunit A) (EFI-A) (Y-box transcription factor) (Y-box-binding protein 1) (YB-1) | P62960 | Ybx1 | 36 |
| Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 (G3BP-1) (EC 3.6.4.12) (EC 3.6.4.13) (ATP-dependent DNA helicase VIII) (GAP SH3 domain-binding protein 1) (HDH-VIII) | P97855 | G3bp1 | 52 |
| Cytoskeleton-associated protein 5 | A2AGT5 | Ckap5 | 226 |
| Kinesin-like protein KIFC1 | Q9QWT9 | Kifc1 | 74 |
| Mannosyl-oligosaccharide glucosidase (EC 3.2.1.106) (Glucosidase 1) (Glycoprotein-processing glucosidase I) | Q80UM7 | Mogs | 92 |
| 40S ribosomal protein S17 | P63276 | Rps17 | 16 |
| Regulator of nonsense transcripts 1 (EC 3.6.4.-) (ATP-dependent helicase RENT1) (Nonsense mRNA reducing factor 1) (NORF1) (Up-frameshift suppressor 1 homolog) (mUpf1) | Q9EPU0 | Upf1 | 124 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2/B1) | O88569 | Hnrnpa2b1 | 37 |
| Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 (100 kDa coactivator) (p100 co-activator) | Q78PY7 | Snd1 | 102 |
| Plastin-2 (65 kDa macrophage protein) (L-plastin) (Lymphocyte cytosolic protein 1) (LCP-1) (pp65) | Q61233 | Lcp1 | 70 |
| 40S ribosomal protein S8 | P62242 | Rps8 | 24 |

| | | | |
|--|--------|---------------|-----|
| Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP-1) (EC 2.4.2.30) (NAD(+) ADP-ribosyltransferase 1) (ADPRT 1) (Poly[ADP-ribose] synthase 1) (msPARP) | P11103 | Parp1 | 113 |
| Lymphocyte-specific helicase (EC 3.6.4.-) (Proliferation-associated SNF2-like protein) | Q60848 | Hells | 95 |
| 60S ribosomal protein L15 | Q9CZM2 | Rpl15 | 24 |
| Caprin-1 (Cytoplasmic activation- and proliferation-associated protein 1) (GPI-anchored membrane protein 1) (GPI-anchored protein p137) (GPI-p137) (p137GPI) (Membrane component chromosome 11 surface marker 1) (RNA granule protein 105) | Q60865 | Caprin1 | 78 |
| Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 (mFxr1p) | Q61584 | Fxr1 | 76 |
| 60S ribosomal protein L19 | P84099 | Rpl19 | 23 |
| DnaJ homolog subfamily C member 2 (Mouse Id associate 1) (MIDA1) (Zuotin-related factor 1) | P54103 | Dnajc2 | 72 |
| 40S ribosomal protein S15a | P62245 | Rps15a | 15 |
| Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2 (Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit beta) (eIF-2-beta) | Q99L45 | Eif2s2 | 38 |
| Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 (Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha) (eIF-2-alpha) (eIF-2A) (eIF-2alpha) | Q6ZWX6 | Eif2s1 | 36 |
| ATP-dependent RNA helicase DDX18 (EC 3.6.4.13) (DEAD box protein 18) | Q8K363 | Ddx18 | 74 |
| Homeobox protein Rhox5 (Homeobox protein Pem) (Placenta and embryonic expression protein) (Reproductive homeobox on chromosome X 5) | P52651 | Rhox5 | 23 |
| N-acylneuraminate cytidyltransferase (EC 2.7.7.43) (CMP-N-acetylneuraminic acid synthase) (CMP-NeuNAc synthase) | Q99KK2 | Cmas | 48 |
| Alpha-mannosidase 2C1 (EC 3.2.1.24) (Alpha-D-mannoside mannohydrolase) (Mannosidase alpha class 2C member 1) | Q91W89 | Man2c1 | 116 |
| 60S ribosomal protein L26 (Silica-induced gene 20 protein) (SIG-20) | P61255 | Rpl26 | 17 |
| Protein diaphanous homolog 3 (Diaphanous-related formin-3) (DRF3) (p134mDIA2) (mDIA2) | Q9Z207 | Diaph3 | 134 |
| tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase (EC 2.1.1.203) (Myc-induced SUN domain-containing protein) (NOL1/NOP2/Sun domain family member 2) | Q1HFZ0 | Nsun2 | 85 |
| Serine/threonine-protein kinase SRPK1 (EC 2.7.11.1) (SFRS protein kinase 1) (Serine/arginine-rich protein-specific kinase 1) (SR-protein-specific kinase 1) | O70551 | Srpk1 | 73 |
| TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) | Q921F2 | Tardbp | 45 |
| PC4 and SFRS1-interacting protein (Lens epithelium-derived growth factor) (mLEDGF) | Q99JF8 | Psip1 | 60 |
| Cell division cycle 5-related protein (Cdc5-like protein) | Q6A068 | Cdc5l | 92 |
| Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A (eIF3a) (Centrosomin) (Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 10) (eIF-3-theta) (eIF3 p167) (eIF3 p180) (eIF3 p185) (p162) | P23116 | Eif3a | 162 |
| Splicing factor 3B subunit 3 (Pre-mRNA-splicing factor SF3b 130 kDa subunit) (SF3b130) (Spliceosome-associated protein 130) (SAP 130) | Q921M3 | Sf3b3 | 136 |
| Polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTB) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I) (hnRNP I) | P17225 | Ptbp1 | 56 |
| 40S ribosomal protein S20 | P60867 | Rps20 | 13 |
| 40S ribosomal protein S13 | P62301 | Rps13 | 17 |
| Endoplasmic reticulum glucose-regulated protein (GRP-94) (Endoplasmic reticulum resident protein 99) (ERp99) (Heat shock protein 90 kDa beta member 1) (Polymorphic tumor rejection antigen 1) (Tumor rejection antigen gp96) | P08113 | Hsp90b1 | 92 |
| Pumilio homolog 1 | Q80U78 | Pum1 | 127 |
| Nuclear RNA export factor 1 (Tip-associated protein) (Tip-associating protein) (mRNA export factor TAP) | Q99JX7 | Nxf1 | 70 |
| Dedicator of cytokinesis protein 10 (Zizimin-3) | Q8BZN6 | Dock10 | 246 |
| 60S ribosomal protein L13a (Transplantation antigen P198) (Tum-P198 antigen) | P19253 | Rpl13a | 23 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 (hnRNP A3) | Q8BG05 | Hnrnpa3 | 40 |
| 40S ribosomal protein S16 | P14131 | Rps16 | 16 |
| MORC family CW-type zinc finger protein 2A (Zinc finger CW-type coiled-coil domain protein 1) | Q69ZX6 | Morc2a | 117 |
| tRNA-splicing ligase RtcB homolog (EC 6.5.1.3) (Focal adhesion-associated protein) (FAAP) | Q99LF4 | D10Wsu5 2e | 55 |
| 60S ribosomal protein L35 | Q6ZVV7 | Rpl35 | 15 |
| 40S ribosomal protein S25 | P62852 | Rps25 | 14 |
| Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase [Includes: Glutamyl-tRNA synthetase | Q8CGC7 | Eprs | 170 |

| | | | |
|--|--------|----------|-----|
| (EC 6.1.1.17) (Glutamate--tRNA ligase) (GluRS); Prolyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.15) (Proline--tRNA ligase) (ProRS)] | | | |
| Nucleolar GTP-binding protein 2 | Q99LH1 | Gnl2 | 83 |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46 (EC 3.6.4.13) (DEAD box protein 46) | Q569Z5 | Ddx46 | 117 |
| 60S ribosomal protein L12 | P35979 | Rpl12 | 18 |
| Granzyme B(G,H) (EC 3.4.21.79) (CTLA-1) (Cytotoxic cell protease 1) (CCP1) (Fragmentin-2) | P04187 | Gzmb | 27 |
| Pumilio domain-containing protein KIAA0020 | Q8BKS9 | Kiaa0020 | 73 |
| 40S ribosomal protein S5 [Cleaved into: 40S ribosomal protein S5, N-terminally processed] | P97461 | Rps5 | 23 |
| Heterochromatin protein 1-binding protein 3 | Q3TEA8 | Hp1bp3 | 61 |
| Protein PRRC2A (HLA-B-associated transcript 2) (Proline-rich and coiled-coil-containing protein 2A) | Q7TSC1 | Prcc2a | 229 |
| E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25 (EC 6.3.2.19) (EC 6.3.2.n3) (Estrogen-responsive finger protein) (Tripartite motif-containing protein 25) (Ubiquitin/ISG15-conjugating enzyme TRIM25) (Zinc finger protein 147) | Q61510 | Trim25 | 72 |
| Nucleolar transcription factor 1 (Upstream-binding factor 1) (UBF-1) | P25976 | Ubf | 90 |
| Kinesin-like protein KIF2C (Mitotic centromere-associated kinesin) (MCAK) | Q922S8 | Kif2c | 81 |
| 60S ribosomal protein L10 (Protein QM homolog) | Q6ZWW3 | Rpl10 | 25 |
| p21-activated protein kinase-interacting protein 1 (PAK1-interacting protein 1) (Putative PAK inhibitor Skb15) | Q9DCE5 | Pak1ip1 | 42 |
| Exosome component 10 (EC 3.1.13.-) (Autoantigen PM/Scl 2 homolog) (Polymyositis/scleroderma autoantigen 2 homolog) | P56960 | Exosc10 | 101 |
| 60S ribosomal protein L14 | Q9CR57 | Rpl14 | 24 |
| Eukaryotic translation initiation factor 4B (eIF-4B) | Q8BGD9 | Eif4b | 69 |
| 60S ribosomal protein L17 | Q9CPR4 | Rpl17 | 21 |
| Cold shock domain-containing protein E1 | Q91W50 | Csde1 | 89 |
| RNA-binding protein 27 (Peri-implantation stem cell protein 1) (RNA-binding motif protein 27) | Q5SFM8 | Rbm27 | 119 |
| U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1 (Hypoxia-associated factor) (Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 1) (SART-1) (mSART-1) | Q9Z315 | Sart1 | 91 |
| 60S ribosomal protein L28 | P41105 | Rpl28 | 16 |
| Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/delta/epsilon/gamma (Thymopoietin isoforms beta/delta/epsilon/gamma) (TP beta/delta/epsilon/gamma) | Q61029 | Tmpo | 50 |
| Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3, X-linked (Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit gamma, X-linked) (eIF-2-gamma X) | Q9Z0N1 | Eif2s3x | 51 |
| PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2 (GRB10-interacting GYF protein 2) (Trinucleotide repeat-containing gene 15 protein) | Q6Y7W8 | Gigyf2 | 149 |
| Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2 (eIF-4-gamma 2) (eIF-4G 2) (eIF4G 2) (Novel APOBEC-1 target 1) (Translation repressor NAT1) (p97) | Q62448 | Eif4g2 | 102 |
| Myelin expression factor 2 (MEF-2) (MyEF-2) | Q8C854 | Myef2 | 63 |
| Suppressor of SWI4 1 homolog (Ssf-1) (Peter Pan homolog) | Q91YU8 | Ppan | 53 |
| Coronin-1A (Coronin-like protein A) (Clipin-A) (Coronin-like protein p57) (Tryptophan aspartate-containing coat protein) (TACO) | O89053 | Coro1a | 51 |
| 60S ribosomal protein L21 | O09167 | Rpl21 | 19 |
| Guanine nucleotide-binding protein-like 3-like protein | Q6PGG6 | Gnl3l | 65 |
| N-acetyltransferase 10 (EC 2.3.1.-) | Q8K224 | Nat10 | 115 |
| Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial (TP-alpha) [Includes: Long-chain enoyl-CoA hydratase (EC 4.2.1.17); Long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (EC 1.1.1.211)] | Q8BMS1 | Hadha | 83 |
| Pre-mRNA-processing factor 19 (Nuclear matrix protein 200) (PRP19/PSO4 homolog) (Senescence evasion factor) | Q99KP6 | Prpf19 | 55 |
| Casein kinase I isoform alpha (CKI-alpha) (EC 2.7.11.1) (CK1) | Q8BK63 | Csnk1a1 | 39 |
| Developmentally-regulated GTP-binding protein 1 (DRG-1) (Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 3) (NEDD-3) | P32233 | Drg1 | 41 |
| Protein PRRC2C (BAT2 domain-containing protein 1) (HLA-B-associated transcript 2-like 2) (Proline-rich and coiled-coil-containing protein 2C) | Q3TLH4 | Prcc2c | 309 |
| Protein argonaute-2 (Argonaute2) (mAgo2) (EC 3.1.26.n2) (Eukaryotic translation initiation factor 2C 2) (eIF-2C 2) (eIF2C 2) (Piwi/argonaute family protein melf2C2) (Protein slicer) | Q8CJG0 | Eif2c2 | 97 |
| Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain (EC 6.1.1.20) (Phenylalanine--tRNA | Q9WUA2 | Farsb | 66 |

| | | | |
|--|--------|----------|-----|
| ligase beta chain) (PheRS) | | | |
| CDKN2A-interacting protein (Collaborator of ARF) | Q8BI72 | Cdkn2aip | 60 |
| Serine/arginine-rich splicing factor 1 (ASF/SF2) (Splicing factor, arginine/serine-rich 1) | Q6PDM2 | Srsf1 | 28 |
| 40S ribosomal protein S23 | P62267 | Rps23 | 16 |
| Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B (RRP1-like protein B) | Q91YK2 | Rrp1b | 81 |
| Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1 (EC 2.7.11.1) (Hematopoietic progenitor kinase) (HPK) (MAPK/ERK kinase kinase kinase 1) (MEK kinase kinase 1) (MEKKK 1) | P70218 | Map4k1 | 92 |
| 40S ribosomal protein S26 | P62855 | Rps26 | 13 |
| Poly(rC)-binding protein 2 (Alpha-CP2) (CTBP) (CBP) (Putative heterogeneous nuclear ribonucleoprotein X) (hnRNP X) | Q61990 | Pcbp2 | 38 |
| Splicing factor U2AF 65 kDa subunit (U2 auxiliary factor 65 kDa subunit) (U2 snRNP auxiliary factor large subunit) | P26369 | U2af2 | 54 |
| S1 RNA-binding domain-containing protein 1 | Q497V5 | Srbd1 | 114 |
| tRNA (uracil-5-)-methyltransferase homolog A (Hpal1 tiny fragments locus 9c protein) | Q8BNV1 | Trmt2a | 63 |
| La-related protein 1 (La ribonucleoprotein domain family member 1) | Q6ZQ58 | Larp1 | 121 |
| 40S ribosomal protein S24 | P62849 | Rps24 | 15 |
| Eukaryotic translation initiation factor 5B (eIF-5B) (Translation initiation factor IF-2) | Q05D44 | Eif5b | 138 |
| Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2 (82 kDa FMRP-interacting protein) (82-FIP) (FMRP-interacting protein 2) | Q5F2E7 | Nufip2 | 76 |
| rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin (EC 2.1.1.-) (Nucleolar protein 1) | P35550 | Fbl | 34 |
| Treacle protein (Treacher Collins syndrome protein homolog) | O08784 | Tcof1 | 135 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (hnRNP D0) (AU-rich element RNA-binding protein 1) | Q60668 | Hnrnpd | 38 |
| FACT complex subunit SSRP1 (Facilitates chromatin transcription complex subunit SSRP1) (Recombination signal sequence recognition protein 1) (Structure-specific recognition protein 1) (T160) | Q08943 | Ssrp1 | 81 |
| Putative rRNA methyltransferase 3 (EC 2.1.1.-) (Protein ftsJ homolog 3) (rRNA (uridine-2'-O-)-methyltransferase 3) | Q9DBE9 | Ftsj3 | 96 |
| 60S ribosomal protein L29 | P47915 | Rpl29 | 18 |
| E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4 (EC 6.3.2.-) (Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4) (NEDD-4) | P46935 | Nedd4 | 103 |
| Nucleolar and spindle-associated protein 1 (NuSAP) | Q9ERH4 | Nusap1 | 49 |
| 60S ribosomal protein L31 | P62900 | Rpl31 | 14 |
| Ras GTPase-activating protein-binding protein 2 (G3BP-2) (GAP SH3 domain-binding protein 2) | P97379 | G3bp2 | 54 |
| Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma (CaM kinase II subunit gamma) (CaMK-II subunit gamma) (EC 2.7.11.17) | Q923T9 | Camk2g | 60 |
| 60S ribosomal protein L23 | P62830 | Rpl23 | 15 |
| 60S ribosomal protein L34 | Q9D1R9 | Rpl34 | 13 |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX56 (EC 3.6.4.13) (ATP-dependent 61 kDa nucleolar RNA helicase) (DEAD box protein 56) | Q9D0R4 | Ddx56 | 61 |
| 60S ribosomal protein L24 | Q8BP67 | Rpl24 | 18 |
| Centrosomal protein of 55 kDa (Cep55) | Q8BT07 | Cep55 | 54 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B (hnRNP A/B) (CARG-binding factor-A) (CBF-A) | Q99020 | Hnrnpab | 31 |
| ATP-binding cassette sub-family F member 2 | Q99LE6 | Abcf2 | 72 |
| 3'-5' exoribonuclease 1 (EC 3.1.-.-) (3'-5' exonuclease ERI1) (Eri-1 homolog) (Histone mRNA 3'-exonuclease 1) | Q7TMF2 | Eri1 | 39 |
| Nucleolar protein 56 (Nucleolar protein 5A) | Q9D6Z1 | Nop56 | 64 |
| Endoplasmic reticulum resident protein 29 (ERp29) | P57759 | Erp29 | 29 |
| Protein SET (Phosphatase 2A inhibitor I2PP2A) (I-2PP2A) (Template-activating factor I) (TAF-I) | Q9EQU5 | Set | 33 |
| Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic (EC 6.1.1.1) (Tyrosyl-tRNA ligase) (TyrRS) | Q91WQ3 | Yars | 59 |
| Kelch-like ECH-associated protein 1 (Cytosolic inhibitor of Nrf2) (INrf2) | Q9Z2X8 | Keap1 | 70 |
| 60S ribosomal protein L27 | P61358 | Rpl27 | 16 |
| Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B (eIF3b) (Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 9) (eIF-3-eta) (eIF3 p116) | Q8JZQ9 | Eif3b | 91 |
| Ras GTPase-activating protein 2 (GAP1m) | P58069 | Rasa2 | 96 |

| | | | |
|--|--------|----------|-----|
| Spermatogenesis-associated serine-rich protein 2 (Serine-rich spermatocytes and round spermatid 59 kDa protein) (p59scr) | Q8K1N4 | Spats2 | 59 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like | Q921F4 | Hnrpll | 64 |
| Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L (eIF3l) (66 kDa tyrosine-rich heat shock protein) (67 kDa polymerase-associated factor) (Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6-interacting protein) (Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E-interacting protein) (HSP-66Y) (PAF67) | Q8QZY1 | Eif3l | 67 |
| Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 beta) (EC 2.7.11.26) | Q9WV60 | Gsk3b | 47 |
| Box C/D snoRNA protein 1 (Zinc finger HIT domain-containing protein 6) | Q3UFB2 | Znhit6 | 52 |
| Serine/arginine-rich splicing factor 7 (Splicing factor, arginine/serine-rich 7) | Q8BL97 | Srsf7 | 31 |
| Nuclear export mediator factor Nemf (Serologically defined colon cancer antigen 1 homolog) | Q8CCP0 | Nemf | 121 |
| Echinoderm microtubule-associated protein-like 3 (EMAP-3) | Q8VC03 | Eml3 | 96 |
| Nucleolar MIF4G domain-containing protein 1 (SGD1 homolog) | Q3UFM5 | Nom1 | 96 |
| Ribosome biogenesis protein BOP1 (Block of proliferation 1 protein) | P97452 | Bop1 | 83 |
| Hemogen (Hemopoietic gene protein) (Negative differentiation regulator protein) (mNDR) | Q9ERZ0 | Hemgn | 55 |
| Serine/arginine-rich splicing factor 2 (Protein PR264) (Putative myelin regulatory factor 1) (MRF-1) (Splicing component, 35 kDa) (Splicing factor SC35) (SC-35) (Splicing factor, arginine/serine-rich 2) | Q62093 | Srsf2 | 25 |
| 60S ribosomal protein L37a | P61514 | Rpl37a | 10 |
| G2 and S phase-expressed protein 1 (GTSE-1) (Protein B99) | Q8R080 | Gtse1 | 79 |
| RNA-binding protein 10 (RNA-binding motif protein 10) | Q99KG3 | Rbm10 | 103 |
| Uncharacterized protein C9orf114 homolog | Q3UHX9 | e | 43 |
| Engulfment and cell motility protein 1 (Protein ced-12 homolog) | Q8BPU7 | Elmo1 | 84 |
| WD repeat-containing protein 74 | Q8VCG3 | Wdr74 | 43 |
| Histone H1.5 (H1 VAR.5) (H1b) | P43276 | Hist1h1b | 23 |
| SUN domain-containing protein 2 (Protein unc-84 homolog B) (Sad1/unc-84 protein-like 2) | Q8BJS4 | Sun2 | 78 |
| Regulator of chromosome condensation (Chromosome condensation protein 1) | Q8VE37 | Rcc1 | 45 |
| THAP domain-containing protein 11 (Ronin) | Q9JJD0 | Thap11 | 33 |
| E3 ubiquitin-protein ligase TRIM56 (EC 6.3.2.-) (Tripartite motif-containing protein 56) | Q80V11 | Trim56 | 80 |
| Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10 (EC 3.4.19.12) (Deubiquitinating enzyme 10) (Ubiquitin thiolesterase 10) (Ubiquitin-specific-processing protease 10) | P52479 | Usp10 | 87 |
| Rac GTPase-activating protein 1 (Male germ cell RacGap) (MgcRacGAP) | Q9WVM1 | Racgap1 | 70 |
| Protein DEK | Q7TNV0 | Dek | 43 |
| Nucleosome assembly protein 1-like 1 (Brain protein DN38) (NAP-1-related protein) | P28656 | Nap111 | 45 |
| Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic (EC 6.1.1.19) (Arginine--tRNA ligase) (ArgRS) | Q9D0I9 | Rars | 76 |
| Eukaryotic translation initiation factor 2D (eIF2D) (Ligatin) | Q61211 | Eif2d | 63 |
| Protein SPT2 homolog (SPT2 domain-containing protein 1) | Q68FG3 | Spty2d1 | 75 |
| Selenocysteine-specific elongation factor (Elongation factor sec) (Eukaryotic elongation factor, selenocysteine-tRNA-specific) (mSelB) | Q9JHW4 | Eefsec | 63 |
| GTP-binding protein 1 (G-protein 1) (GP-1) (GP1) | O08582 | Gtpbp1 | 72 |
| Protein CBFA2T3 (Eight twenty one protein 2) (MTG8-related protein 2) (Protein ETO-2) | O54972 | Cbfa2t3 | 68 |
| Replication factor C subunit 2 (Activator 1 40 kDa subunit) (A1 40 kDa subunit) (Activator 1 subunit 2) (Replication factor C 40 kDa subunit) (RF-C 40 kDa subunit) (RFC40) | Q9WUK4 | Rfc2 | 39 |
| Transcriptional activator protein Pur-alpha (Purine-rich single-stranded DNA-binding protein alpha) | P42669 | Pura | 35 |
| 60S ribosomal protein L22 (Heparin-binding protein HBp15) | P67984 | Rpl22 | 15 |
| Exosome complex component RRP45 (Autoantigen PM/Scl 1) (Exosome component 9) (P75 polymyositis-scleroderma overlap syndrome-associated autoantigen) (Polymyositis/scleroderma autoantigen 1) (Polymyositis/scleroderma autoantigen 75 kDa) (PM/Scl-75) | Q9JHI7 | Exosc9 | 49 |
| RNA-binding protein 5 (Putative tumor suppressor LUCA15) (RNA-binding motif protein 5) | Q91YE7 | Rbm5 | 92 |

Tabelle 4: Liste der für eIF-5A1 identifizierten Interaktionspartner

| Identifizierte Proteine (228) | ID | Gen-bezeichnung | # Peptide |
|--|--------|-----------------|-----------|
| Deoxyhypusine synthase (DHS) (EC 2.5.1.46) | Q3TXU5 | Dhps | 13 |
| Deoxyhypusine hydroxylase (DOHH) (EC 1.14.99.29) (Deoxyhypusine dioxygenase) (Deoxyhypusine monooxygenase) | Q99LN9 | Dohh | 4 |
| Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 (eIF-5A-1) (eIF-5A1) (Eukaryotic initiation factor 5A isoform 1) (eIF-5A) (eIF-4D) | P63242 | Eif5a | 14 |
| Nucleolin (Protein C23) | P09405 | Ncl | 23 |
| 60S ribosomal protein L4 | Q9D8E6 | Rpl4 | 11 |
| Myb-binding protein 1A (Myb-binding protein of 160 kDa) | Q7TPV4 | Mybbp1a | 27 |
| 60S ribosomal protein L3 (J1 protein) | P27659 | Rpl3 | 11 |
| Nucleolar RNA helicase 2 (EC 3.6.4.13) (DEAD box protein 21) (Gu-alpha) (Nucleolar RNA helicase Gu) (Nucleolar RNA helicase II) (RH II/Gu) | Q9JIK5 | Ddx21 | 28 |
| DNA replication licensing factor MCM3 (EC 3.6.4.12) (DNA polymerase alpha holoenzyme-associated protein P1) (P1-MCM3) | P25206 | Mcm3 | 12 |
| DNA replication licensing factor MCM5 (EC 3.6.4.12) (CDC46 homolog) (P1-CDC46) | P49718 | Mcm5 | 9 |
| 40S ribosomal protein S7 | P62082 | Rps7 | 9 |
| 40S ribosomal protein S14 | P62264 | Rps14 | 5 |
| 60S ribosomal protein L6 (TAX-responsive enhancer element-binding protein 107) (TAXREB107) | P47911 | Rpl6 | 10 |
| Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein (PAI1 RNA-binding protein 1) (PAI-RBP1) (SERPINE1 mRNA-binding protein 1) | Q9CY58 | Serbp1 | 11 |
| RNA-binding protein 14 (RNA-binding motif protein 14) | Q8C2Q3 | Rbm14 | 18 |
| 40S ribosomal protein S4, X isoform | P62702 | Rps4x | 10 |
| 60S ribosomal protein L7 | P14148 | Rpl7 | 13 |
| 60S ribosomal protein L5 | P47962 | Rpl5 | 8 |
| RNA-binding protein EWS | Q61545 | Ewsr1 | 4 |
| Heat shock protein HSP 90-alpha (Heat shock 86 kDa) (HSP 86) (HSP86) (Tumor-specific transplantation 86 kDa antigen) (TSTA) | P07901 | Hsp90aa1 | 6 |
| 60S ribosomal protein L7a (Surfeit locus protein 3) | P12970 | Rpl7a | 7 |
| Lipoyltransferase 1, mitochondrial (EC 2.3.1.-) (Lipoate biosynthesis protein) (Lipoate-protein ligase) (Lipoyl ligase) | Q8VCM4 | Lipt1 | 6 |
| 60S ribosomal protein L13 (A52) | P47963 | Rpl13 | 6 |
| 60S ribosomal protein L11 | Q9CXW4 | Rpl11 | 5 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) (HDP-1) (Helix-destabilizing protein) (Single-strand-binding protein) (Topoisomerase-inhibitor suppressed) (hnRNP core protein A1) | P49312 | Hnrnpa1 | 9 |
| 60S acidic ribosomal protein P0 (60S ribosomal protein L10E) | P14869 | Rplp0 | 10 |
| Putative methyltransferase NSUN5 (EC 2.1.1.-) (NOL1/NOP2/Sun domain family member 5) (Williams-Beuren syndrome chromosomal region 20A protein homolog) | Q8K4F6 | Nsun5 | 10 |
| Rho guanine nucleotide exchange factor 2 (Guanine nucleotide exchange factor H1) (GEF-H1) (LBC'S first cousin) (Lymphoid blast crisis-like 1) (Oncogene LFC) (Rhobin) | Q60875 | Arhgef2 | 15 |
| DNA topoisomerase 2-alpha (EC 5.99.1.3) (DNA topoisomerase II, alpha isozyme) | Q01320 | Top2a | 25 |
| RNA-binding protein FUS (Protein pigpen) | P56959 | Fus | 5 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U) (Scaffold attachment factor A) (SAF-A) | Q8VEK3 | Hnrnpu | 13 |
| Histone H1.2 (H1 VAR.1) (H1c) | P15864 | Hist1h1c | 5 |
| Cyclin-dependent kinase 17 (EC 2.7.11.22) (Cell division protein kinase 17) (PCTAIRE-motif protein kinase 2) (Serine/threonine-protein kinase PCTAIRE-2) | Q8K0D0 | Cdk17 | 6 |

| | | | |
|--|--------|---------|----|
| Putative RNA-binding protein Luc7-like 2 (CGI-74 homolog) | Q7TNC4 | Luc7l2 | 7 |
| 40S ribosomal protein S3a (Protein TU-11) | P97351 | Rps3a | 7 |
| DNA topoisomerase 1 (EC 5.99.1.2) (DNA topoisomerase I) | Q04750 | Top1 | 12 |
| Protein LYRIC (3D3/LYRIC) (Lysine-rich CEACAM1 co-isolated protein) (Metadherin) (Metastasis adhesion protein) | Q80WJ7 | Mtdh | 10 |
| 60S ribosomal protein L8 | P62918 | Rpl8 | 4 |
| Kinesin-like protein KIF2A (Kinesin-2) | P28740 | Kif2a | 9 |
| Myosin-9 (Cellular myosin heavy chain, type A) (Myosin heavy chain 9) (Myosin heavy chain, non-muscle IIa) (Non-muscle myosin heavy chain A) (NMMHC-A) (Non-muscle myosin heavy chain IIa) (NMMHC II-a) (NMMHC-IIA) | Q8VDD5 | Myh9 | 16 |
| Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1 | Q3UPF5 | Zc3hav1 | 7 |
| Serine/threonine-protein kinase MARK2 (EC 2.7.11.1) (ELKL motif kinase 1) (EMK-1) (MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2) | Q05512 | Mark2 | 10 |
| 40S ribosomal protein S19 | Q9CZX8 | Rps19 | 7 |
| 40S ribosomal protein S10 | P63325 | Rps10 | 4 |
| Heat shock protein 105 kDa (42 degrees C-HSP) (Heat shock 110 kDa protein) (Heat shock-related 100 kDa protein E71) (HSP-E71) | Q61699 | Hsph1 | 3 |
| Proliferation-associated protein 2G4 (IRES-specific cellular trans-acting factor 45 kDa) (ITAF45) (Mpp1) (Proliferation-associated protein 1) (Protein p38-2G4) | P50580 | Pa2g4 | 10 |
| RNA-binding protein 39 (Coactivator of activating protein 1 and estrogen receptors) (Coactivator of AP-1 and ERs) (RNA-binding motif protein 39) (RNA-binding region-containing protein 2) (Transcription coactivator CAPER) | Q8VH51 | Rbm39 | 6 |
| Nucleophosmin (NPM) (Nucleolar phosphoprotein B23) (Nucleolar protein NO38) (Numatrin) | Q61937 | Npm1 | 5 |
| Protein RCC2 | Q8BK67 | Rcc2 | 6 |
| 40S ribosomal protein S6 (Phosphoprotein NP33) | P62754 | Rps6 | 5 |
| 40S ribosomal protein S2 (40S ribosomal protein S4) (Protein LLRep3) | P25444 | Rps2 | 5 |
| ATPase family AAA domain-containing protein 3 (AAA-ATPase TOB3) | Q92511 | Atad3 | 4 |
| YTH domain family protein 3 | Q8BYK6 | Ythdf3 | 6 |
| Nucleolar GTP-binding protein 1 (Chronic renal failure gene protein) (GTP-binding protein NGB) | Q99ME9 | Gtpbp4 | 6 |
| Guanine nucleotide-binding protein-like 3 (Nucleolar GTP-binding protein 3) (Nucleostemin) | Q8CI11 | Gnl3 | 15 |
| L-lactate dehydrogenase A chain (LDH-A) (EC 1.1.1.27) (LDH muscle subunit) (LDH-M) | P06151 | Ldha | 3 |
| Poly(rC)-binding protein 1 (Alpha-CP1) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1) (hnRNP E1) | P60335 | Pcbp1 | 2 |
| 60S ribosomal protein L9 | P51410 | Rpl9 | 6 |
| 60S ribosomal protein L18 | P35980 | Rpl18 | 5 |
| ATP-dependent RNA helicase DDX1 (EC 3.6.4.13) (DEAD box protein 1) | Q91VR5 | Ddx1 | 6 |
| RNA-binding protein 28 (RNA-binding motif protein 28) | Q8CGC6 | Rbm28 | 11 |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX27 (EC 3.6.4.13) (DEAD box protein 27) | Q921N6 | Ddx27 | 13 |
| Serine/threonine-protein kinase RIO2 (EC 2.7.11.1) (RIO kinase 2) | Q9CQS5 | Rio2 | 3 |
| Cell growth-regulating nucleolar protein (Protein expressed in male leptotene and zygotene spermatocytes 264) (MLZ-264) | Q08288 | Lyar | 5 |
| ATP-binding cassette sub-family F member 1 | Q6P542 | Abcf1 | 11 |
| 40S ribosomal protein S9 | Q6ZWN5 | Rps9 | 8 |
| Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 (EC 3.6.4.13) (DEAH box protein 15) | O35286 | Dhx15 | 10 |
| Lupus La protein homolog (La autoantigen homolog) (La ribonucleoprotein) | P32067 | Ssb | 6 |
| Pre-rRNA-processing protein TSR1 homolog | Q5SWD9 | Tsr1 | 8 |
| Protein regulator of cytokinesis 1 | Q99K43 | Prc1 | 4 |

| | | | |
|---|--------|---------------|----|
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q (hnRNP Q) (Glycine- and tyrosine-rich RNA-binding protein) (GRY-RBP) (NS1-associated protein 1) (Synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein) (pp68) | Q7TMK9 | Syncrip | 6 |
| E3 ubiquitin-protein ligase RLIM (EC 6.3.2.-) (LIM domain-interacting RING finger protein) (RING finger LIM domain-binding protein) (R-LIM) (RING finger protein 12) | Q9WTV7 | Rlim | 6 |
| Moesin (Membrane-organizing extension spike protein) | P26041 | Msn | 7 |
| Polyadenylate-binding protein 1 (PABP-1) (Poly(A)-binding protein 1) | P29341 | Pabpc1 | 9 |
| 5'-3' exoribonuclease 2 (EC 3.1.13.-) (Protein Dhm1) | Q9DBR1 | Xrn2 | 9 |
| Pescadillo homolog | Q9EQ61 | Pes1 | 7 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) | P61979 | Hnrnpk | 7 |
| Replication factor C subunit 1 (A1-P145) (Activator 1 140 kDa subunit) (A1 140 kDa subunit) (Activator 1 large subunit) (Activator 1 subunit 1) (Differentiation-specific element-binding protein) (ISRE-binding protein) (Replication factor C 140 kDa subunit) (RF-C 140 kDa subunit) (RFC140) (Replication factor C large subunit) | P35601 | Rfc1 | 9 |
| 40S ribosomal protein S18 (Ke-3) (Ke3) | P62270 | Rps18 | 6 |
| Vigilin (High density lipoprotein-binding protein) (HDL-binding protein) | Q8VDJ3 | Hdlbp | 10 |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX47 (EC 3.6.4.13) (DEAD box protein 47) | Q9CWX9 | Ddx47 | 6 |
| DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 (Dnmt1) (Met-1) (EC 2.1.1.37) (DNA methyltransferase Mmul) (DNA MTase Mmul) (M.Mmul) (MCMT) | P13864 | Dnmt1 | 9 |
| Nuclease-sensitive element-binding protein 1 (CCAAT-binding transcription factor I subunit A) (CBF-A) (DNA-binding protein B) (DBPB) (Enhancer factor I subunit A) (EFI-A) (Y-box transcription factor) (Y-box-binding protein 1) (YB-1) | P62960 | Ybx1 | 6 |
| Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 (G3BP-1) (EC 3.6.4.12) (EC 3.6.4.13) (ATP-dependent DNA helicase VIII) (GAP SH3 domain-binding protein 1) (HDH-VIII) | P97855 | G3bp1 | 5 |
| Kinesin-like protein KIFC1 | Q9QWT9 | Kifc1 | 6 |
| Mannosyl-oligosaccharide glucosidase (EC 3.2.1.106) (Glucosidase 1) (Glycoprotein-processing glucosidase I) | Q80UM7 | Mogs | 3 |
| 40S ribosomal protein S17 | P63276 | Rps17 | 5 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2/B1) | O88569 | Hnrnpa2 b1 | 9 |
| Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 (100 kDa coactivator) (p100 co-activator) | Q78PY7 | Snd1 | 10 |
| Plastin-2 (65 kDa macrophage protein) (L-plastin) (Lymphocyte cytosolic protein 1) (LCP-1) (pp65) | Q61233 | Lcp1 | 10 |
| 40S ribosomal protein S8 | P62242 | Rps8 | 6 |
| Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP-1) (EC 2.4.2.30) (NAD(+) ADP-ribosyltransferase 1) (ADPRT 1) (Poly[ADP-ribose] synthase 1) (msPARP) | P11103 | Parp1 | 6 |
| Lymphocyte-specific helicase (EC 3.6.4.-) (Proliferation-associated SNF2-like protein) | Q60848 | Hells | 7 |
| 60S ribosomal protein L15 | Q9CZM2 | Rpl15 | 3 |
| Caprin-1 (Cytoplasmic activation- and proliferation-associated protein 1) (GPI-anchored membrane protein 1) (GPI-anchored protein p137) (GPI-p137) (p137GPI) (Membrane component chromosome 11 surface marker 1) (RNA granule protein 105) | Q60865 | Caprin1 | 8 |
| Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 (mFxr1p) | Q61584 | Fxr1 | 9 |
| 60S ribosomal protein L19 | P84099 | Rpl19 | 3 |
| 40S ribosomal protein S15a | P62245 | Rps15a | 2 |
| Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2 (Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit beta) (eIF-2-beta) | Q99L45 | Eif2s2 | 5 |
| Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 (Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha) (eIF-2-alpha) (eIF-2A) (eIF-2alpha) | Q6ZWX6 | Eif2s1 | 9 |

| | | | |
|---|--------|---------------|----|
| 60S ribosomal protein L26 (Silica-induced gene 20 protein) (SIG-20) | P61255 | Rpl26 | 4 |
| ATP-dependent RNA helicase DDX18 (EC 3.6.4.13) (DEAD box protein 18) | Q8K363 | Ddx18 | 6 |
| Homeobox protein Rhox5 (Homeobox protein Pem) (Placenta and embryonic expression protein) (Reproductive homeobox on chromosome X 5) | P52651 | Rhox5 | 4 |
| N-acetylneuraminyl transferase (EC 2.7.7.43) (CMP-N-acetylneuraminic acid synthase) (CMP-NeuNAc synthase) | Q99KK2 | Cmas | 4 |
| Alpha-mannosidase 2C1 (EC 3.2.1.24) (Alpha-D-mannoside mannohydrolase) (Mannosidase alpha class 2C member 1) | Q91W89 | Man2c1 | 8 |
| Protein diaphanous homolog 3 (Diaphanous-related formin-3) (DRF3) (p134mDIA2) (mDIA2) | Q9Z207 | Diaph3 | 7 |
| tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase (EC 2.1.1.203) (Myc-induced SUN domain-containing protein) (NOL1/NOP2/Sun domain family member 2) | Q1HFZ0 | Nsun2 | 7 |
| Serine/threonine-protein kinase SRPK1 (EC 2.7.11.1) (SFRS protein kinase 1) (Serine/arginine-rich protein-specific kinase 1) (SR-protein-specific kinase 1) | O70551 | Srpk1 | 7 |
| TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) | Q921F2 | Tardbp | 2 |
| PC4 and SFRS1-interacting protein (Lens epithelium-derived growth factor) (mLEDGF) | Q99JF8 | Psip1 | 4 |
| Cell division cycle 5-related protein (Cdc5-like protein) | Q6A068 | Cdc5l | 9 |
| Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A (eIF3a) (Centrosomin) (Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 10) (eIF-3-theta) (eIF3 p167) (eIF3 p180) (eIF3 p185) (p162) | P23116 | Eif3a | 9 |
| Splicing factor 3B subunit 3 (Pre-mRNA-splicing factor SF3b 130 kDa subunit) (SF3b130) (Spliceosome-associated protein 130) (SAP 130) | Q921M3 | Sf3b3 | 8 |
| Polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTB) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I) (hnRNP I) | P17225 | Ptbp1 | 2 |
| 40S ribosomal protein S20 | P60867 | Rps20 | 3 |
| 40S ribosomal protein S13 | P62301 | Rps13 | 4 |
| Endoplasmic reticulum glucose-regulated protein (GRP-94) (Endoplasmic reticulum resident protein 99) (ERp99) (Heat shock protein 90 kDa beta member 1) (Polymorphic tumor rejection antigen 1) (Tumor rejection antigen gp96) | P08113 | Hsp90b1 | 11 |
| Pumilio homolog 1 | Q80U78 | Pum1 | 4 |
| Nuclear RNA export factor 1 (Tip-associated protein) (Tip-associating protein) (mRNA export factor TAP) | Q99JX7 | Nxf1 | 7 |
| 60S ribosomal protein L13a (Transplantation antigen P198) (Tum-P198 antigen) | P19253 | Rpl13a | 2 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 (hnRNP A3) | Q8BG05 | Hnrnpa3 | 8 |
| 40S ribosomal protein S16 | P14131 | Rps16 | 4 |
| MORC family CW-type zinc finger protein 2A (Zinc finger CW-type coiled-coil domain protein 1) | Q69ZX6 | Morc2a | 4 |
| tRNA-splicing ligase RtcB homolog (EC 6.5.1.3) (Focal adhesion-associated protein) (FAAP) | Q99LF4 | D10Wsu 52e | 6 |
| Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase [Includes: Glutamyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.17) (Glutamate--tRNA ligase) (GluRS); Prolyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.15) (Proline--tRNA ligase) (ProRS)] | Q8CGC7 | Eprs | 8 |
| Nucleolar GTP-binding protein 2 | Q99LH1 | Gnl2 | 7 |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46 (EC 3.6.4.13) (DEAD box protein 46) | Q569Z5 | Ddx46 | 8 |
| 60S ribosomal protein L12 | P35979 | Rpl12 | 3 |
| Pumilio domain-containing protein KIAA0020 | Q8BKS9 | Kiaa0020 | 6 |
| Heterochromatin protein 1-binding protein 3 | Q3TEA8 | Hp1bp3 | 8 |
| Protein PRRC2A (HLA-B-associated transcript 2) (Proline-rich and coiled-coil-containing protein 2A) | Q7TSC1 | Prrc2a | 6 |
| Nucleolar transcription factor 1 (Upstream-binding factor 1) (UBF-1) | P25976 | Ubtf | 6 |
| 60S ribosomal protein L10 (Protein QM homolog) | Q6ZVV3 | Rpl10 | 3 |

| | | | |
|--|--------|--------------|---|
| E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25 (EC 6.3.2.19) (EC 6.3.2.n3) (Estrogen-responsive finger protein) (Tripartite motif-containing protein 25) (Ubiquitin/ISG15-conjugating enzyme TRIM25) (Zinc finger protein 147) | Q61510 | Trim25 | 6 |
| Kinesin-like protein KIF2C (Mitotic centromere-associated kinesin) (MCAK) | Q922S8 | Kif2c | 4 |
| p21-activated protein kinase-interacting protein 1 (PAK1-interacting protein 1) (Putative PAK inhibitor Skb15) | Q9DCE5 | Pak1ip1 | 3 |
| Exosome component 10 (EC 3.1.13.-) (Autoantigen PM/Scl 2 homolog) (Polymyositis/scleroderma autoantigen 2 homolog) | P56960 | Exosc10 | 7 |
| 60S ribosomal protein L14 | Q9CR57 | Rpl14 | 3 |
| Eukaryotic translation initiation factor 4B (eIF-4B) | Q8BGD9 | Eif4b | 3 |
| 60S ribosomal protein L17 | Q9CPR4 | Rpl17 | 4 |
| Cold shock domain-containing protein E1 | Q91W50 | Csde1 | 4 |
| RNA-binding protein 27 (Peri-implantation stem cell protein 1) (RNA-binding motif protein 27) | Q5SFM8 | Rbm27 | 7 |
| U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1 (Hypoxia-associated factor) (Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 1) (SART-1) (mSART-1) | Q9Z315 | Sart1 | 8 |
| 60S ribosomal protein L28 | P41105 | Rpl28 | 3 |
| Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/delta/epsilon/gamma (Thymopoietin isoforms beta/delta/epsilon/gamma) (TP beta/delta/epsilon/gamma) | Q61029 | Tmpo | 6 |
| Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3, X-linked (Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit gamma, X-linked) (eIF-2-gamma X) | Q9Z0N1 | Eif2s3x | 3 |
| PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2 (GRB10-interacting GYF protein 2) (Trinucleotide repeat-containing gene 15 protein) | Q6Y7W8 | Gigyf2 | 9 |
| Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2 (eIF-4-gamma 2) (eIF-4G 2) (eIF4G 2) (Novel APOBEC-1 target 1) (Translation repressor NAT1) (p97) | Q62448 | Eif4g2 | 6 |
| Myelin expression factor 2 (MEF-2) (MyEF-2) | Q8C854 | Myef2 | 2 |
| Suppressor of SWI4 1 homolog (Ssf-1) (Peter Pan homolog) | Q91YU8 | Ppan | 6 |
| Coronin-1A (Coronin-like protein A) (Clipin-A) (Coronin-like protein p57) (Tryptophan aspartate-containing coat protein) (TACO) | O89053 | Coro1a | 3 |
| 60S ribosomal protein L21 | O09167 | Rpl21 | 3 |
| Guanine nucleotide-binding protein-like 3-like protein | Q6PGG6 | Gnl3l | 7 |
| N-acetyltransferase 10 (EC 2.3.1.-) | Q8K224 | Nat10 | 8 |
| Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial (TP-alpha) [Includes: Long-chain enoyl-CoA hydratase (EC 4.2.1.17); Long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (EC 1.1.1.211)] | Q8BMS1 | Hadha | 8 |
| Pre-mRNA-processing factor 19 (Nuclear matrix protein 200) (PRP19/PSO4 homolog) (Senescence evasion factor) | Q99KP6 | Prpf19 | 2 |
| Casein kinase I isoform alpha (CKI-alpha) (EC 2.7.11.1) (CK1) | Q8BK63 | Csnk1a1 | 5 |
| Developmentally-regulated GTP-binding protein 1 (DRG-1) (Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 3) (NEDD-3) | P32233 | Drg1 | 6 |
| Protein PRRC2C (BAT2 domain-containing protein 1) (HLA-B-associated transcript 2-like 2) (Proline-rich and coiled-coil-containing protein 2C) | Q3TLH4 | Prrc2c | 5 |
| Protein argonaute-2 (Argonaute2) (mAgo2) (EC 3.1.26.n2) (Eukaryotic translation initiation factor 2C 2) (eIF-2C 2) (eIF2C 2) (Piwi/argonaute family protein meIF2C2) (Protein slicer) | Q8CJG0 | Eif2c2 | 6 |
| Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain (EC 6.1.1.20) (Phenylalanine--tRNA ligase beta chain) (PheRS) | Q9WUA2 | Farsb | 5 |
| CDKN2A-interacting protein (Collaborator of ARF) | Q8BI72 | Cdkn2ai p | 6 |
| Serine/arginine-rich splicing factor 1 (ASF/SF2) (Splicing factor, arginine/serine-rich 1) | Q6PDM2 | Srsf1 | 7 |

| | | | |
|--|--------|---------|---|
| Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B (RRP1-like protein B) | Q91YK2 | Rrp1b | 7 |
| Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (EC 2.7.11.1) (Hematopoietic progenitor kinase) (HPK) (MAPK/ERK kinase kinase kinase 1) (MEK kinase kinase 1) (MEKKK 1) | P70218 | Map4k1 | 4 |
| 40S ribosomal protein S26 | P62855 | Rps26 | 2 |
| Splicing factor U2AF 65 kDa subunit (U2 auxiliary factor 65 kDa subunit) (U2 snRNP auxiliary factor large subunit) | P26369 | U2af2 | 3 |
| S1 RNA-binding domain-containing protein 1 | Q497V5 | Srbd1 | 4 |
| tRNA (uracil-5-)-methyltransferase homolog A (HpalI tiny fragments locus 9c protein) | Q8BNV1 | Trmt2a | 4 |
| La-related protein 1 (La ribonucleoprotein domain family member 1) | Q6ZQ58 | Larp1 | 6 |
| 40S ribosomal protein S24 | P62849 | Rps24 | 3 |
| Eukaryotic translation initiation factor 5B (eIF-5B) (Translation initiation factor IF-2) | Q05D44 | Eif5b | 8 |
| Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2 (82 kDa FMRP-interacting protein) (82-FIP) (FMRP-interacting protein 2) | Q5F2E7 | Nufip2 | 3 |
| rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin (EC 2.1.1.-) (Nucleolar protein 1) | P35550 | Fbl | 4 |
| Treacle protein (Treacher Collins syndrome protein homolog) | O08784 | Tcof1 | 4 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (hnRNP D0) (AU-rich element RNA-binding protein 1) | Q60668 | Hnrnpd | 3 |
| FACT complex subunit SSRP1 (Facilitates chromatin transcription complex subunit SSRP1) (Recombination signal sequence recognition protein 1) (Structure-specific recognition protein 1) (T160) | Q08943 | Ssrp1 | 4 |
| Putative rRNA methyltransferase 3 (EC 2.1.1.-) (Protein ftsJ homolog 3) (rRNA (uridine-2'-O-)-methyltransferase 3) | Q9DBE9 | Ftsj3 | 7 |
| 60S ribosomal protein L29 | P47915 | Rpl29 | 2 |
| E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4 (EC 6.3.2.-) (Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4) (NEDD-4) | P46935 | Nedd4 | 4 |
| Nucleolar and spindle-associated protein 1 (NuSAP) | Q9ERH4 | Nusap1 | 3 |
| 60S ribosomal protein L31 | P62900 | Rpl31 | 2 |
| Ras GTPase-activating protein-binding protein 2 (G3BP-2) (GAP SH3 domain-binding protein 2) | P97379 | G3bp2 | 3 |
| 60S ribosomal protein L23 | P62830 | Rpl23 | 2 |
| 60S ribosomal protein L34 | Q9D1R9 | Rpl34 | 3 |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX56 (EC 3.6.4.13) (ATP-dependent 61 kDa nucleolar RNA helicase) (DEAD box protein 56) | Q9D0R4 | Ddx56 | 4 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B (hnRNP A/B) (CARG-binding factor-A) (CBF-A) | Q99020 | Hnrnpab | 5 |
| ATP-binding cassette sub-family F member 2 | Q99LE6 | Abcf2 | 4 |
| 3'-5' exoribonuclease 1 (EC 3.1.-.-) (3'-5' exonuclease ER11) (Eri-1 homolog) (Histone mRNA 3'-exonuclease 1) | Q7TMF2 | Eri1 | 3 |
| Nucleolar protein 56 (Nucleolar protein 5A) | Q9D6Z1 | Nop56 | 3 |
| Protein SET (Phosphatase 2A inhibitor I2PP2A) (I-2PP2A) (Template-activating factor I) (TAF-I) | Q9EQU5 | Set | 4 |
| Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic (EC 6.1.1.1) (Tyrosyl-tRNA ligase) (TyrRS) | Q91WQ3 | Yars | 5 |
| Kelch-like ECH-associated protein 1 (Cytosolic inhibitor of Nrf2) (INrf2) | Q9Z2X8 | Keap1 | 3 |
| 60S ribosomal protein L27 | P61358 | Rpl27 | 2 |
| Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B (eIF3b) (Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 9) (eIF-3-eta) (eIF3 p116) | Q8JZQ9 | Eif3b | 3 |
| Ras GTPase-activating protein 2 (GAP1m) | P58069 | Rasa2 | 2 |
| Spermatogenesis-associated serine-rich protein 2 (Serine-rich spermatocytes and round spermatid 59 kDa protein) (p59scr) | Q8K1N4 | Spats2 | 4 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like | Q921F4 | Hnrpll | 3 |
| Box C/D snoRNA protein 1 (Zinc finger HIT domain-containing protein 6) | Q3UFB2 | Znhit6 | 2 |
| Serine/arginine-rich splicing factor 7 (Splicing factor, arginine/serine-rich 7) | Q8BL97 | Srsf7 | 2 |

| | | | |
|--|--------|--------------|---|
| Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L (eIF3L) (66 kDa tyrosine-rich heat shock protein) (67 kDa polymerase-associated factor) (Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6-interacting protein) (Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E-interacting protein) (HSP-66Y) (PAF67) | Q8QZY1 | Eif3l | 4 |
| Nuclear export mediator factor Nemf (Serologically defined colon cancer antigen 1 homolog) | Q8CCP0 | Nemf | 5 |
| Echinoderm microtubule-associated protein-like 3 (EMAP-3) | Q8VC03 | Eml3 | 4 |
| Nucleolar MIF4G domain-containing protein 1 (SGD1 homolog) | Q3UFM5 | Nom1 | 3 |
| Ribosome biogenesis protein BOP1 (Block of proliferation 1 protein) | P97452 | Bop1 | 4 |
| Serine/arginine-rich splicing factor 2 (Protein PR264) (Putative myelin regulatory factor 1) (MRF-1) (Splicing component, 35 kDa) (Splicing factor SC35) (SC-35) (Splicing factor, arginine/serine-rich 2) | Q62093 | Srsf2 | 2 |
| RNA-binding protein 10 (RNA-binding motif protein 10) | Q99KG3 | Rbm10 | 3 |
| Uncharacterized protein C9orf114 homolog | Q3UHX9 | D2Wsu8 1e | 3 |
| Engulfment and cell motility protein 1 (Protein ced-12 homolog) | Q8BPU7 | Elmo1 | 3 |
| WD repeat-containing protein 74 | Q8VCG3 | Wdr74 | 4 |
| Histone H1.5 (H1 VAR.5) (H1b) | P43276 | Hist1h1b | 2 |
| SUN domain-containing protein 2 (Protein unc-84 homolog B) (Sad1/unc-84 protein-like 2) | Q8BJS4 | Sun2 | 3 |
| Regulator of chromosome condensation (Chromosome condensation protein 1) | Q8VE37 | Rcc1 | 3 |
| THAP domain-containing protein 11 (Ronin) | Q9JJD0 | Thap11 | 2 |
| E3 ubiquitin-protein ligase TRIM56 (EC 6.3.2.-) (Tripartite motif-containing protein 56) | Q80VI1 | Trim56 | 3 |
| Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10 (EC 3.4.19.12) (Deubiquitinating enzyme 10) (Ubiquitin thiolesterase 10) (Ubiquitin-specific-processing protease 10) | P52479 | Usp10 | 3 |
| Rac GTPase-activating protein 1 (Male germ cell RacGap) (MgcRacGAP) | Q9WVM1 | Racgap1 | 3 |
| Protein DEK | Q7TNV0 | Dek | 3 |
| Nucleosome assembly protein 1-like 1 (Brain protein DN38) (NAP-1-related protein) | P28656 | Nap1l1 | 2 |
| Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic (EC 6.1.1.19) (Arginine--tRNA ligase) (ArgRS) | Q9D0I9 | Rars | 4 |
| Protein SPT2 homolog (SPT2 domain-containing protein 1) | Q68FG3 | Spty2d1 | 3 |
| Selenocysteine-specific elongation factor (Elongation factor sec) (Eukaryotic elongation factor, selenocysteine-tRNA-specific) (mSelB) | Q9JHW4 | Eefsec | 5 |
| GTP-binding protein 1 (G-protein 1) (GP-1) (GP1) | O08582 | Gtpbp1 | 3 |
| Replication factor C subunit 2 (Activator 1 40 kDa subunit) (A1 40 kDa subunit) (Activator 1 subunit 2) (Replication factor C 40 kDa subunit) (RF-C 40 kDa subunit) (RFC40) | Q9WUK4 | Rfc2 | 3 |
| Transcriptional activator protein Pur-alpha (Purine-rich single-stranded DNA-binding protein alpha) | P42669 | Pura | 3 |
| 60S ribosomal protein L22 (Heparin-binding protein HBp15) | P67984 | Rpl22 | 2 |
| Exosome complex component RRP45 (Autoantigen PM/Scl 1) (Exosome component 9) (P75 polymyositis-scleroderma overlap syndrome-associated autoantigen) (Polymyositis/scleroderma autoantigen 1) (Polymyositis/scleroderma autoantigen 75 kDa) (PM/Scl-75) | Q9JHI7 | Exosc9 | 3 |
| RNA-binding protein 5 (Putative tumor suppressor LUCA15) (RNA-binding motif protein 5) | Q91YE7 | Rbm5 | 2 |

Tabelle 5: Liste der für eIF-5A2 identifizierten Interaktionspartner

| Identifizierte Proteine (91) | ID | Gen-bezeichnung | # Peptide |
|--|--------|-----------------|-----------|
| Deoxyhypusine synthase (DHS) (EC 2.5.1.46) | Q3TXU5 | Dhps | 12 |
| Deoxyhypusine hydroxylase (DOHH) (EC 1.14.99.29) (Deoxyhypusine dioxygenase) (Deoxyhypusine monooxygenase) | Q99LN9 | Dohh | 3 |
| Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 (eIF-5A-1) (eIF-5A1) (Eukaryotic initiation factor 5A isoform 1) (eIF-5A) (eIF-4D) | P63242 | Eif5a | 8 |
| Nucleolin (Protein C23) | P09405 | Ncl | 16 |
| Eukaryotic translation initiation factor 5A-2 (eIF-5A-2) (eIF-5A2) (Eukaryotic initiation factor 5A isoform 2) | Q8BGY2 | Eif5a2 | 4 |
| 60S ribosomal protein L4 | Q9D8E6 | Rpl4 | 12 |
| Glutaryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (GCD) (EC 1.3.99.7) | Q60759 | Gcdh | 12 |
| Myb-binding protein 1A (Myb-binding protein of 160 kDa) | Q7TPV4 | Mybbp1a | 19 |
| 60S ribosomal protein L3 (J1 protein) | P27659 | Rpl3 | 11 |
| Nucleolar RNA helicase 2 (EC 3.6.4.13) (DEAD box protein 21) (Gu-alpha) (Nucleolar RNA helicase Gu) (Nucleolar RNA helicase II) (RH II/Gu) | Q9JIK5 | Ddx21 | 9 |
| DNA replication licensing factor MCM3 (EC 3.6.4.12) (DNA polymerase alpha holoenzyme-associated protein P1) (P1-MCM3) | P25206 | Mcm3 | 13 |
| DNA replication licensing factor MCM5 (EC 3.6.4.12) (CDC46 homolog) (P1-CDC46) | P49718 | Mcm5 | 13 |
| 40S ribosomal protein S7 | P62082 | Rps7 | 7 |
| 40S ribosomal protein S14 | P62264 | Rps14 | 3 |
| 60S ribosomal protein L6 (TAX-responsive enhancer element-binding protein 107) (TAXREB107) | P47911 | Rpl6 | 7 |
| Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein (PAI1 RNA-binding protein 1) (PAI-RBP1) (SERPINE1 mRNA-binding protein 1) | Q9CY58 | Serbp1 | 11 |
| RNA-binding protein 14 (RNA-binding motif protein 14) | Q8C2Q3 | Rbm14 | 10 |
| 40S ribosomal protein S4, X isoform | P62702 | Rps4x | 10 |
| 60S ribosomal protein L7 | P14148 | Rpl7 | 6 |
| RNA-binding protein EWS | Q61545 | Ewsr1 | 3 |
| 60S ribosomal protein L7a (Surfeit locus protein 3) | P12970 | Rpl7a | 4 |
| Lipoyltransferase 1, mitochondrial (EC 2.3.1.-) (Lipoate biosynthesis protein) (Lipoate-protein ligase) (Lipoyl ligase) | Q8VCM4 | Lipt1 | 4 |
| 60S ribosomal protein L13 (A52) | P47963 | Rpl13 | 3 |
| 60S ribosomal protein L11 | Q9CXW4 | Rpl11 | 6 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) (HDP-1) (Helix-destabilizing protein) (Single-strand-binding protein) (Topoisomerase-inhibitor suppressed) (hnRNP core protein A1) | P49312 | Hnrnpa1 | 2 |
| 60S acidic ribosomal protein P0 (60S ribosomal protein L10E) | P14869 | Rplp0 | 6 |
| Putative methyltransferase NSUN5 (EC 2.1.1.-) (NOL1/NOP2/Sun domain family member 5) (Williams-Beuren syndrome chromosomal region 20A protein homolog) | Q8K4F6 | Nsun5 | 14 |
| Rho guanine nucleotide exchange factor 2 (Guanine nucleotide exchange factor H1) (GEF-H1) (LBC'S first cousin) (Lymphoid blast crisis-like 1) (Oncogene LFC) (Rhobin) | Q60875 | Arhgef2 | 9 |
| RNA-binding protein FUS (Protein pigpen) | P56959 | Fus | 3 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U) (Scaffold attachment factor A) (SAF-A) | Q8VEK3 | Hnrnpu | 6 |
| Histone H1.2 (H1 VAR.1) (H1c) | P15864 | Hist1h1c | 5 |
| UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1 (UGT1) (EC 2.4.1.-) (UDP--Glc:glycoprotein glucosyltransferase) (UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1) | Q6P5E4 | Uggt1 | 14 |
| 60S ribosomal protein L8 | P62918 | Rpl8 | 3 |
| Kinesin-like protein KIF2A (Kinesin-2) | P28740 | Kif2a | 8 |
| Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1 | Q3UPF5 | Zc3hav1 | 3 |

| | | | |
|--|---------|---------|---|
| Serine/threonine-protein kinase MARK2 (EC 2.7.11.1) (ELKL motif kinase 1) (EMK-1) (MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2) | Q05512 | Mark2 | 7 |
| 40S ribosomal protein S19 | Q9CZX8 | Rps19 | 7 |
| 40S ribosomal protein S10 | P63325 | Rps10 | 3 |
| Proliferation-associated protein 2G4 (IRES-specific cellular trans-acting factor 45 kDa) (ITAF45) (Mpp1) (Proliferation-associated protein 1) (Protein p38-2G4) | P50580 | Pa2g4 | 7 |
| RNA-binding protein 39 (Coactivator of activating protein 1 and estrogen receptors) (Coactivator of AP-1 and ERs) (RNA-binding motif protein 39) (RNA-binding region-containing protein 2) (Transcription coactivator CAPER) | Q8VH51 | Rbm39 | 4 |
| 40S ribosomal protein S6 (Phosphoprotein NP33) | P62754 | Rps6 | 3 |
| 40S ribosomal protein S2 (40S ribosomal protein S4) (Protein LLRep3) | P25444 | Rps2 | 3 |
| 60S ribosomal protein L9 | P51410 | Rpl9 | 2 |
| ATP-dependent RNA helicase DDX1 (EC 3.6.4.13) (DEAD box protein 1) | Q91VR5 | Ddx1 | 5 |
| Cell growth-regulating nucleolar protein (Protein expressed in male leptotene and zygotene spermatocytes 264) (MLZ-264) | Q08288 | Lyar | 4 |
| 40S ribosomal protein S9 | Q6ZWN5 | Rps9 | 9 |
| Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 (EC 3.6.4.13) (DEAH box protein 15) | O35286 | Dhx15 | 2 |
| Lupus La protein homolog (La autoantigen homolog) (La ribonucleoprotein) | P32067 | Ssb | 6 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q (hnRNP Q) (Glycine- and tyrosine-rich RNA-binding protein) (GRY-RBP) (NS1-associated protein 1) (Synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein) (pp68) | Q7TMK9 | Syncrip | 4 |
| Protein regulator of cytokinesis 1 | Q99K43 | Prc1 | 6 |
| Moesin (Membrane-organizing extension spike protein) | P26041 | Msn | 5 |
| 60S ribosomal protein L23a | P62751 | Rpl23a | 6 |
| 5'-3' exoribonuclease 2 (EC 3.1.13.-) (Protein Dhm1) | Q9DBR1 | Xrn2 | 3 |
| Pescadillo homolog | Q9EQ61 | Pes1 | 4 |
| 40S ribosomal protein S18 (Ke-3) (Ke3) | P62270 | Rps18 | 5 |
| Nuclease-sensitive element-binding protein 1 (CCAAT-binding transcription factor I subunit A) (CBF-A) (DNA-binding protein B) (DBPB) (Enhancer factor I subunit A) (EFI-A) (Y-box transcription factor) (Y-box-binding protein 1) (YB-1) | P62960 | Ybx1 | 6 |
| Cytoskeleton-associated protein 5 | A2AGT5 | Ckap5 | 8 |
| Kinesin-like protein KIFC1 | Q9QWT9 | Kifc1 | 7 |
| 40S ribosomal protein S17 | P63276 | Rps17 | 3 |
| Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP-1) (EC 2.4.2.30) (NAD(+) ADP-ribosyltransferase 1) (ADPRT 1) (Poly[ADP-ribose] synthase 1) (msPARP) | P11103 | Parp1 | 3 |
| DnaJ homolog subfamily C member 2 (Mouse Id associate 1) (MIDA1) (Zuotin-related factor 1) | P54103 | Dnajc2 | 4 |
| 40S ribosomal protein S15a | P62245 | Rps15a | 3 |
| 60S ribosomal protein L26 (Silica-induced gene 20 protein) (SIG-20) | P61255 | Rpl26 | 4 |
| Serine/threonine-protein kinase SRPK1 (EC 2.7.11.1) (SFRS protein kinase 1) (Serine/arginine-rich protein-specific kinase 1) (SR-protein-specific kinase 1) | O70551 | Srpk1 | 2 |
| 40S ribosomal protein S20 | P60867 | Rps20 | 3 |
| 40S ribosomal protein S13 | P62301 | Rps13 | 6 |
| 60S ribosomal protein L13a (Transplantation antigen P198) (Tum-P198 antigen) | P19253 | Rpl13a | 2 |
| 40S ribosomal protein S16 | P14131 | Rps16 | 4 |
| 60S ribosomal protein L35 | Q6Z WV7 | Rpl35 | 2 |
| 40S ribosomal protein S25 | P62852 | Rps25 | 2 |
| 60S ribosomal protein L12 | P35979 | Rpl12 | 2 |

| | | | |
|---|--------|--------|---|
| Granzyme B(G,H) (EC 3.4.21.79) (CTLA-1) (Cytotoxic cell protease 1) (CCP1) (Fragmentin-2) | P04187 | Gzmb | 5 |
| 40S ribosomal protein S5 [Cleaved into: 40S ribosomal protein S5, N-terminally processed] | P97461 | Rps5 | 2 |
| 60S ribosomal protein L14 | Q9CR57 | Rpl14 | 4 |
| 60S ribosomal protein L17 | Q9CPR4 | Rpl17 | 4 |
| 60S ribosomal protein L28 | P41105 | Rpl28 | 2 |
| Suppressor of SWI4 1 homolog (Ssf-1) (Peter Pan homolog) | Q91YU8 | Ppan | 3 |
| 60S ribosomal protein L21 | O09167 | Rpl21 | 2 |
| Protein argonaute-2 (Argonaute2) (mAgo2) (EC 3.1.26.n2) (Eukaryotic translation initiation factor 2C 2) (eIF-2C 2) (eIF2C 2) (Piwi/argonaute family protein meIF2C2) (Protein slicer) | Q8CJG0 | Eif2c2 | 2 |
| 40S ribosomal protein S23 | P62267 | Rps23 | 3 |
| 40S ribosomal protein S26 | P62855 | Rps26 | 2 |
| S1 RNA-binding domain-containing protein 1 | Q497V5 | Srbd1 | 2 |
| 60S ribosomal protein L31 | P62900 | Rpl31 | 3 |
| 60S ribosomal protein L23 | P62830 | Rpl23 | 2 |
| 60S ribosomal protein L34 | Q9D1R9 | Rpl34 | 3 |
| 60S ribosomal protein L24 | Q8BP67 | Rpl24 | 3 |
| Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 beta) (EC 2.7.11.26) | Q9WV60 | Gsk3b | 4 |
| Hemogen (Hemopoietic gene protein) (Negative differentiation regulator protein) (mNDR) | Q9ERZ0 | Hemgn | 3 |
| 60S ribosomal protein L37a | P61514 | Rpl37a | 2 |
| G2 and S phase-expressed protein 1 (GTSE-1) (Protein B99) | Q8R080 | Gtse1 | 2 |
| Eukaryotic translation initiation factor 2D (eIF2D) (Ligatin) | Q61211 | Eif2d | 2 |

Tabelle 6: Liste der für DHS identifizierten Interaktionspartner

| Identifizierte Proteine (17) | ID | Genbezeichnung | # Peptide |
|--|--------|----------------|-----------|
| Deoxyhypusine synthase (DHS) (EC 2.5.1.46) | Q3TXU5 | Dhps | 29 |
| Deoxyhypusine hydroxylase (DOHH) (EC 1.14.99.29) (Deoxyhypusine dioxygenase) (Deoxyhypusine monooxygenase) | Q99LN9 | Dohh | 8 |
| <i>Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 (eIF-5A-1) (eIF-5A1) (Eukaryotic initiation factor 5A isoform 1) (eIF-5A) (eIF-4D)</i> | P63242 | Eif5a | 12 |
| DNA replication licensing factor MCM3 (EC 3.6.4.12) (DNA polymerase alpha holoenzyme-associated protein P1) (P1-MCM3) | P25206 | Mcm3 | 21 |
| DNA replication licensing factor MCM5 (EC 3.6.4.12) (CDC46 homolog) (P1-CDC46) | P49718 | Mcm5 | 15 |
| T-complex protein 1 subunit theta (TCP-1-theta) (CCT-theta) | P42932 | Cct8 | 20 |
| Heat shock protein HSP 90-alpha (Heat shock 86 kDa) (HSP 86) (HSP86) (Tumor-specific transplantation 86 kDa antigen) (TSTA) | P07901 | Hsp90aa1 | 10 |
| T-complex protein 1 subunit gamma (TCP-1-gamma) (CCT-gamma) (Matricin) (mTRiC-P5) | P80318 | Cct3 | 17 |
| Cyclin-dependent kinase 17 (EC 2.7.11.22) (Cell division protein kinase 17) (PCTAIRE-motif protein kinase 2) (Serine/threonine-protein kinase PCTAIRE-2) | Q8K0D0 | Cdk17 | 8 |
| T-complex protein 1 subunit zeta (TCP-1-zeta) (CCT-zeta-1) | P80317 | Cct6a | 11 |
| T-complex protein 1 subunit epsilon (TCP-1-epsilon) (CCT-epsilon) | P80316 | Cct5 | 8 |
| T-complex protein 1 subunit delta (TCP-1-delta) (A45) (CCT-delta) | P80315 | Cct4 | 13 |
| Heat shock protein 105 kDa (42 degrees C-HSP) (Heat shock 110 kDa protein) (Heat shock-related 100 kDa protein E7I) (HSP-E7I) | Q61699 | Hsph1 | 8 |
| T-complex protein 1 subunit eta (TCP-1-eta) (CCT-eta) | P80313 | Cct7 | 10 |
| E3 ubiquitin-protein ligase TRIM33 (EC 6.3.2.-) (Ectodermin homolog) (Transcription intermediary factor 1-gamma) (TIF1-gamma) (Tripartite motif-containing protein 33) | Q99PP7 | Trim33 | 13 |
| 5'-3' exoribonuclease 2 (EC 3.1.13.-) (Protein Dhm1) | Q9DBR1 | Xrn2 | 3 |
| Regulator of nonsense transcripts 1 (EC 3.6.4.-) (ATP-dependent helicase RENT1) (Nonsense mRNA reducing factor 1) (NORF1) (Up-frameshift suppressor 1 homolog) (mUpf1) | Q9EPU0 | Upf1 | 3 |

Tabelle 7: Liste der für DOHH identifizierten Interaktionspartner

| Identifizierte Proteine (20) | ID | Gen-bezeichnung | # Peptide |
|--|--------|-----------------|-----------|
| <i>Deoxyhypusine synthase (DHS) (EC 2.5.1.46)</i> | Q3TXU5 | Dhps | 13 |
| Deoxyhypusine hydroxylase (DOHH) (EC 1.14.99.29) (Deoxyhypusine dioxygenase) (Deoxyhypusine monooxygenase) | Q99LN9 | Dohh | 19 |
| <i>Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 (eIF-5A-1) (eIF-5A1) (Eukaryotic initiation factor 5A isoform 1) (eIF-5A) (eIF-4D)</i> | P63242 | Eif5a | 8 |
| Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein (Beige-like protein) | Q9ESE1 | Lrba | 36 |
| DNA replication licensing factor MCM5 (EC 3.6.4.12) (CDC46 homolog) (P1-CDC46) | P49718 | Mcm5 | 4 |
| T-complex protein 1 subunit theta (TCP-1-theta) (CCT-theta) | P42932 | Cct8 | 7 |
| Heat shock protein HSP 90-alpha (Heat shock 86 kDa) (HSP 86) (HSP86) (Tumor-specific transplantation 86 kDa antigen) (TSTA) | P07901 | Hsp90aa1 | 4 |
| Kinesin-like protein KIF2A (Kinesin-2) | P28740 | Kif2a | 5 |
| Heat shock protein 105 kDa (42 degrees C-HSP) (Heat shock 110 kDa protein) (Heat shock-related 100 kDa protein E71) (HSP-E71) | Q61699 | Hsph1 | 8 |
| Dedicator of cytokinesis protein 8 | Q8C147 | Dock8 | 8 |
| YTH domain family protein 3 | Q8BYK6 | Ythdf3 | 4 |
| L-lactate dehydrogenase A chain (LDH-A) (EC 1.1.1.27) (LDH muscle subunit) (LDH-M) | P06151 | Ldha | 6 |
| Dedicator of cytokinesis protein 10 (Zizimin-3) | Q8BZN6 | Dock10 | 7 |
| Kinesin-like protein KIF2C (Mitotic centromere-associated kinesin) (MCAK) | Q922S8 | Kif2c | 4 |
| Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial (TP-alpha) [Includes: Long-chain enoyl-CoA hydratase (EC 4.2.1.17); Long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (EC 1.1.1.211)] | Q8BMS1 | Hadha | 3 |
| Poly(rC)-binding protein 2 (Alpha-CP2) (CTBP) (CBP) (Putative heterogeneous nuclear ribonucleoprotein X) (hnRNP X) | Q61990 | Pcbp2 | 3 |
| Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma (CaM kinase II subunit gamma) (CaMK-II subunit gamma) (EC 2.7.11.17) | Q923T9 | Camk2g | 6 |
| Centrosomal protein of 55 kDa (Cep55) | Q8BT07 | Cep55 | 4 |
| Endoplasmic reticulum resident protein 29 (ERp29) | P57759 | Erp29 | 4 |
| Protein CBFA2T3 (Eighty two one protein 2) (MTG8-related protein 2) (Protein ETO-2) | O54972 | Cbfa2t3 | 3 |

Tabelle 8: Liste der als ‚Matrix-Proteom‘ (eGFP-SG) identifizierten Interaktionspartner

| Identifizierte Proteine (69) | ID | Gen-bezeichnung | # Peptide |
|---|--------|-----------------|-----------|
| Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 (eIF-5A-1) (eIF-5A1) (Eukaryotic initiation factor 5A isoform 1) (eIF-5A) (eIF-4D) | P63242 | Eif5a | 3 |
| Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8) | P63017 | Hspa8 | 32 |
| Stress-70 protein, mitochondrial (75 kDa glucose-regulated protein) (GRP-75) (Heat shock 70 kDa protein 9) (Mortalin) (Peptide-binding protein 74) (PBP74) (p66 MOT) | P38647 | Hspa9 | 25 |
| 78 kDa glucose-regulated protein (GRP-78) (Heat shock 70 kDa protein 5) (Immunoglobulin heavy chain-binding protein) (BiP) | P20029 | Hspa5 | 11 |
| Acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1) (EC 6.4.1.2) (ACC-alpha) (Acetyl-CoA carboxylase 265) [Includes: Biotin carboxylase (EC 6.3.4.14)] | Q5SWU9 | Acaca | 31 |
| Splicing factor, proline- and glutamine-rich (DNA-binding p52/p100 complex, 100 kDa subunit) (Polypyrimidine tract-binding protein-associated-splicing factor) (PSF) (PTB-associated-splicing factor) | Q8VIJ6 | Sfpq | 7 |
| Tubulin alpha-1B chain (Alpha-tubulin 2) (Alpha-tubulin isotype M-alpha-2) (Tubulin alpha-2 chain) | P05213 | Tuba1b | 12 |
| Tubulin beta-5 chain | P99024 | Tubb5 | 15 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M (hnRNP M) | Q9D0E1 | Hnrnmp | 2 |
| | P62991 | Ambiguos | 3 |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 (EC 3.6.4.13) (DEAD box RNA helicase DEAD1) (mDEAD1) (DEAD box protein 5) (RNA helicase p68) | Q61656 | Ddx5 | 4 |
| 40S ribosomal protein S3 | P62908 | Rps3 | 6 |
| ATP-dependent RNA helicase DDX3X (EC 3.6.4.13) (D1Pas1-related sequence 2) (DEAD box RNA helicase DEAD3) (mDEAD3) (DEAD box protein 3, X-chromosomal) (Embryonic RNA helicase) | Q62167 | Ddx3x | 6 |
| Heat shock protein HSP 90-beta (Heat shock 84 kDa) (HSP 84) (HSP84) (Tumor-specific transplantation 84 kDa antigen) (TSTA) | P11499 | Hsp90ab1 | 4 |
| Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 | Q9JKF1 | Iqgap1 | 23 |
| Non-POU domain-containing octamer-binding protein (NonO protein) | Q99K48 | Nono | 2 |
| Transferrin receptor protein 1 (TR) (TfR) (TfR1) (Tfrr) (CD antigen CD71) | Q62351 | Tfrc | 12 |
| Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1) (Elongation factor Tu) (EF-Tu) (Eukaryotic elongation factor 1 A-1) (eEF1A-1) | P10126 | Eef1a1 | 5 |
| Serum albumin | P07724 | Alb | 2 |
| Actin, alpha skeletal muscle (Alpha-actin-1) | P68134 | Acta1 | 5 |
| Junction plakoglobin (Desmoplakin III) (Desmoplakin-3) | Q02257 | Jup | 7 |
| Ig heavy chain V region MOPC 47A | P01786 | N/A | 2 |
| 6-phosphofruktokinase type C (EC 2.7.1.11) (Phosphofructo-1-kinase isozyme C) (PFK-C) (Phosphofruktokinase 1) (Phosphohexokinase) | Q9WUA3 | Pfcp | 7 |
| Ubiquitin-associated protein 2-like | Q80X50 | Ubap2l | 4 |
| ADP/ATP translocase 2 (ADP,ATP carrier protein 2) (Adenine nucleotide translocator 2) (ANT 2) (Solute carrier family 25 member 5) | P51881 | Slc25a5 | 2 |
| Elongation factor 2 (EF-2) | P58252 | Eef2 | 3 |
| YTH domain family protein 1 (Dermatomyositis associated with cancer putative autoantigen 1 homolog) (DACA-1 homolog) | P59326 | Ythdf1 | 2 |
| Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial (PCCase subunit alpha) (EC 6.4.1.3) (Propanoyl-CoA:carbon dioxide ligase subunit alpha) | Q91ZA3 | Pcca | 8 |
| Heat shock 70 kDa protein 4 (Heat shock 70-related protein APG-2) | Q61316 | Hspa4 | 2 |
| Hyaluronan mediated motility receptor (Intracellular hyaluronic acid-binding protein) (Receptor for hyaluronan-mediated motility) (CD antigen CD168) | Q00547 | Hmmr | 6 |
| Tubulin beta-2C chain | P68372 | Tubb2c | 3 |

| | | | |
|--|--------|----------|---|
| Recombining binding protein suppressor of hairless (J kappa-recombination signal-binding protein) (RBP-J kappa) | P31266 | Rbpj | 2 |
| Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1 (Mitochondrial aspartate glutamate carrier 1) (Solute carrier family 25 member 12) | Q8BH59 | Slc25a12 | 5 |
| Ras GTPase-activating protein 3 (GAP1(IP4BP)) (GapIII) (Ins P4-binding protein) | Q60790 | Rasa3 | 4 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (hnRNP F) [Cleaved into: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, N-terminally processed] | Q9Z2X1 | Hnrnpf | 3 |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 (EC 3.6.4.13) (ATP-dependent RNA helicase p54) (DEAD box protein 6) (Oncogene RCK homolog) | P54823 | Ddx6 | 3 |
| T-complex protein 1 subunit alpha (TCP-1-alpha) (CCT-alpha) (Tailless complex polypeptide 1A) (TCP-1-A) (Tailless complex polypeptide 1B) (TCP-1-B) | P11983 | Tcp1 | 2 |
| Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin) [Cleaved into: Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed] | P60710 | Actb | 4 |
| Serine/threonine-protein kinase PLK1 (EC 2.7.11.21) (Polo-like kinase 1) (PLK-1) (Serine/threonine-protein kinase 13) (STPK13) | Q07832 | Plk1 | 2 |
| Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 (EC 3.6.4.13) (DEAD box protein 17) | Q501J6 | Ddx17 | 4 |
| Ribonucleoprotein PTB-binding 1 (Protein raver-1) | Q9CW46 | Raver1 | 2 |
| Nuclear pore complex protein Nup214 (214 kDa nucleoporin) (Nucleoporin Nup214) | Q80U93 | Nup214 | 3 |
| Talin-1 | P26039 | Tln1 | 2 |
| Tubulin alpha-8 chain (Alpha-tubulin 8) | Q9JJZ2 | Tuba8 | 3 |
| [Pyruvate dehydrogenase [lipoamide]] kinase isozyme 3, mitochondrial (EC 2.7.11.2) (Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 3) | Q922H2 | Pdk3 | 2 |
| Phosphate carrier protein, mitochondrial (Phosphate transport protein) (PTP) (Solute carrier family 25 member 3) | Q8VEM8 | Slc25a3 | 2 |
| Desmoglein-1-beta (Dsg1-beta) (Desmoglein-5) | Q7TSF1 | Dsg1b | 2 |
| Pyruvate carboxylase, mitochondrial (EC 6.4.1.1) (Pyruvic carboxylase) (PCB) | Q05920 | Pc | 3 |
| Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 (MFE-2) (17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 4) (17-beta-HSD 4) (D-bifunctional protein) (DBP) (Multifunctional protein 2) (MPF-2) [Cleaved into: (3R)-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (EC 1.1.1.n12); Enoyl-CoA hydratase 2 (EC 4.2.1.107) (EC 4.2.1.119) (3-alpha,7-alpha,12-alpha-trihydroxy-5-beta-cholest-24-enoil-CoA hydratase)] | P51660 | Hsd17b4 | 4 |
| High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor I (IgG Fc receptor I) (Fc-gamma RI) (FcRI) (CD antigen CD64) | P26151 | Fcgr1 | 3 |
| Annexin A2 (Annexin II) (Annexin-2) (Calpactin I heavy chain) (Calpactin-1 heavy chain) (Chromobindin-8) (Lipocortin II) (Placental anticoagulant protein IV) (PAP-IV) (Protein I) (p36) | P07356 | Anxa2 | 6 |
| Serine/threonine-protein kinase SIK3 (EC 2.7.11.1) (Salt-inducible kinase 3) (SIK-3) (Serine/threonine-protein kinase QSK) | Q6P4S6 | Sik3 | 2 |
| RuvB-like 1 (EC 3.6.4.12) (49 kDa TATA box-binding protein-interacting protein) (49 kDa TBP-interacting protein) (DNA helicase p50) (Pontin 52) (TIP49a) | P60122 | Ruvbl1 | 6 |
| Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial (MCCase subunit alpha) (EC 6.4.1.4) (3-methylcrotonyl-CoA carboxylase 1) (3-methylcrotonyl-CoA carboxylase biotin-containing subunit) (3-methylcrotonyl-CoA:carbon dioxide ligase subunit alpha) | Q99MR8 | Mccc1 | 7 |
| CCR4-NOT transcription complex subunit 4 (EC 6.3.2.-) (CCR4-associated factor 4) (E3 ubiquitin-protein ligase CNOT4) (Potential transcriptional repressor NOT4Hp) | Q8BT14 | Cnot4 | 2 |
| A-kinase anchor protein 8 (AKAP-8) (A-kinase anchor protein 95 kDa) (AKAP 95) | Q9DBR0 | Akap8 | 2 |
| Probable helicase with zinc finger domain (EC 3.6.4.-) | Q6DFV5 | Helz | 3 |
| Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial (EC 1.-.-.-) (Programmed cell death protein 8) | Q9Z0X1 | Aifm1 | 4 |

| | | | |
|--|--------|---------|---|
| Polymerase delta-interacting protein 3 (S6K1 Aly/REF-like target) (SKAR) | Q8BG81 | Poldip3 | 2 |
| DnaJ homolog subfamily A member 1 (DnaJ protein homolog 2) (Heat shock 40 kDa protein 4) (Heat shock protein J2) (HSJ-2) | P63037 | Dnaja1 | 2 |
| Transcription initiation factor IIB (General transcription factor TFIIB) (RNA polymerase II alpha initiation factor) | P62915 | Gtf2b | 2 |
| Nuclear pore complex protein Nup88 (88 kDa nucleoporin) (Nucleoporin Nup88) | Q8CEC0 | Nup88 | 2 |
| TBC1 domain family member 4 (Akt substrate of 160 kDa) (AS160) | Q8BYJ6 | Tbc1d4 | 6 |
| Hexokinase-3 (EC 2.7.1.1) (Hexokinase type III) (HK III) | Q3TRM8 | Hk3 | 2 |
| Lysine-specific histone demethylase 1A (EC 1.-.-) (BRAF35-HDAC complex protein BHC110) (Flavin-containing amine oxidase domain-containing protein 2) | Q6ZQ88 | Kdm1a | 2 |
| Casein kinase II subunit alpha (CK II alpha) (EC 2.7.11.1) | Q60737 | Csnk2a1 | 3 |
| Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12) (Peptidyl-cysteine S-nitrosylase GAPDH) (EC 2.6.99.-) | P16858 | Gapdh | 4 |
| RuvB-like 2 (EC 3.6.4.12) (p47 protein) | Q9WTM5 | Ruvbl2 | 3 |
| ATP-binding cassette sub-family B member 7, mitochondrial (ATP-binding cassette transporter 7) (ABC transporter 7 protein) | Q61102 | Abcb7 | 2 |

5.3. Danksagung

Ich bedanke mich bei Dr. Stefan Balabanov für die hervorragende Betreuung und Unterstützung während der gesamten Arbeit an meiner Dissertation, sowie bei Prof. Joachim Hauber und PD Sabine Hoffmeister-Ullerich für die Betreuung der Doktorarbeit. Dr. Melanie Balabanov danke ich außerdem für die kritische Durchsicht und konstruktive Kritik an dieser Arbeit. Ich bedanke mich auch bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe und den Wissenschaftlern und Mitarbeitern des gesamten onkologischen Zentrums für die hilfreiche und schöne Zusammenarbeit. Prof. Carsten Bokemeyer danke ich außerdem für die Möglichkeit, meine Forschungen an seinem Institut durchzuführen.

Weiterhin möchte ich allen Kooperationspartnern aus dem UKE, dem Heinrich-Pette-Institut, dem ZMNH, der TU Hamburg-Harburg und der Universität Greifswald danken. Hier ist besonders PD Irm Hermans-Borgmeyer hervorzuheben, die mich nicht nur bei der Herstellung und Charakterisierung der *knock-out* Mäuse, sondern auch in vielen anderen Dingen immer sehr unterstützt hat.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Großvater und meiner Frau bedanken, die mich sehr unterstützt haben und immer Geduld und Verständnis für die Anforderungen eines Promotionsprojektes hatten.

5.4. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 15.03.2012

(Henning Sievert)

5.5. Während dieser Arbeit entstandene Publikationen und Posterpräsentationen

Sievert H, Pällmann N, Hermans-Borgmeyer I, Schweizer M, Fehr S, Preukschas M, Bokemeyer C, Braig M, Balabanov S: Heterozygous disruption of the deoxyhypusine hydroxylase gene is essential for embryonic development and adult organismal viability. *In Vorbereitung*

Sievert H, Venz S, Platas-Barradas O, Dhople VM, Schaletzky M, Nagel C, Braig M, Preukschas M, Pällmann N, Bokemeyer C, Brümmendorf TH, Duncan KE, Pörtner R, Walther R, Hauber J, Balabanov S: Network organization of the hypusine modification system. *Zur Publikation eingereicht (2012)*

Preukschas M, Hagel C, Schulte A, Lamszus K, **Sievert H**, Bokemeyer C, Hauber J, Braig M, Balabanov S: Overexpression of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) and hypusine forming enzymes in glioblastoma patient samples: implications for a new targeted therapy. *Zur Publikation eingereicht (2011)*

Dyshlovoy SA, Naeth I, Venz S, Preukschas M, **Sievert H**, Shubina LK, Walther R, Hauber J, Stonik VA, Bokemeyer C, Fedorov SN, Balabanov S, Honecker F (2012): Proteomic profiling of germ cell cancer cells treated with aaptamine, a marine alkaloid with antiproliferative activity. *Journal of Proteome Research* [Epub ahead of print]

Schaletzky M, Platas Barradas O, **Sievert H**, Balabanov S, Zeng A-P, Pörtner R (2012): Cultivation strategies of a BA/F3 cell line for fundamental cell research. *BMC Proceedings* 5(Suppl8):P48

Sievert H, Venz S, Platas Barradas O, Schaletzky M, Preukschas M, Bokemeyer C, Pörtner R, Walther R, Balabanov S (2011): Comprehensive protein interaction network of the cancer related hypusine modification. *EMBO Conference Cancer Proteomics 2011 Posterpräsentation*

Meyer-Schwesinger C, Meyer TN, **Sievert H**, Hoxha E, Sachs M, Klupp EM, Münster S, Balabanov S, Carrier L, Helmchen U, Thaiss F, Stahl RA (2011): Ubiquitin C-terminal hydrolase-11 activity induces polyubiquitin accumulation in podocytes and increases proteinuria in rat membranous nephropathy. *The American Journal of Pathology* 178(5):2044-57