

**Die Deoxyhypusin-Synthase als ein mögliches Ziel für die
Behandlung von Glioblastoma multiforme und die Rolle des
eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors eIF-5A2 *in vivo***

Dissertation

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

vorgelegt von

Michael Preukschas

geboren am 27.09.1981 in Bremen

Hamburg 2012

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. J. HAUBER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Priv.-Doz. Dr. S. HOFFMEISTER-ULLRICH
Tag der Disputation: 30. August 2013

Hamburg, den 11. September 2013



Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Korrigierte Fassung

Tag der Disputation:

30.08.2013

1. Gutachter:

Prof. Dr. Joachim Hauber

2. Gutachter:

Prof. Dr. Julia Kehr

„The great tragedy of Science - the slaying of a beautiful hypothesis by an ugly fact.“

Thomas Henry Huxley

Presidential Address at the British Association for 1870, "Biogenesis and Abiogenesis"

(Collected Essays, vol. 8)

I. Inhaltsverzeichnis	
II. Abkürzungsverzeichnis	ii
III. Zusammenfassung	ii
IV. Abstract	ii
1 Einleitung	1
1.1 Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A und die Hypusinmodifikation	1
1.1.1 Molekularbiologische Charakterisierung von eIF-5A und der posttranslationalen Hypusinmodifikation.....	1
1.1.2 Die Rolle von eIF-5A und der Hypusinmodifikation in physiologischen Prozessen.....	3
1.1.3 eIF-5A und die hypusinbildenden Enzyme in neoplastischen Erkrankungen.....	6
1.1.4 eIF-5A und Hypusin in anderen Erkrankungen.....	8
1.2 Hirntumore	10
1.1.1. Pathologie und klinische Merkmale von Gliomen.....	11
1.2.1 Die Genetik von malignen Gliomen	11
1.2.2 Molekulare Klassifikation von Glioblastomen.....	13
1.2.3 Behandlungsmöglichkeiten von Glioblastomen.....	14
2 Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Chemikalien und Medien für Bakterien	19
2.1.2 Geräte und Materialien.....	22
2.1.3 Puffer und Lösungen	23
2.1.4 Oligonukleotide.....	25
2.1.5 Antikörper	26
2.1.6 Medien für die Zellkultur	26
2.1.7 Verwendete Zellen	29
2.1.8 Mausstämme	30
2.1.9 Software	30
2.2 Methoden	30
2.2.1 Zellkultur	30
2.2.2 Zellviabilität, Apoptose und Seneszenz.....	31
2.2.3 Proteinbiochemie.....	35
2.2.4 <i>In vivo</i> Experimente.....	39
2.2.5 Molekularbiologische Methoden.....	40
2.2.6 Bakterielle Arbeiten	45
2.2.7 Herstellung einer <i>eIF5a2</i> -defizienten Knockout-Maus.....	46
2.2.8 Statistische Auswertung.....	54
3 Ergebnisse	55

3.1	Expression von eIF-5A, -A2 und den hypusinbildenden Enzymen DHS&DOHH <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	56
3.1.1	eIF5-A1, -A2, DHS und DOHH-Status in Tumorproben von Gliompatienten	56
3.1.2	Expression von eIF-5A und den hypusinbildenden Enzymen in G55T2 und U87-MG Zellen	59
3.2	Der Effekt verminderter Hypusinierung auf Glioblastomzellen <i>in vitro</i>	60
3.2.1	Nachweis der DHS-Inhibition durch GC7 in U87-MG und G55T2-Zellen.....	60
3.2.2	Die pharmakologische Inhibierung von DHS durch GC7 zeigt einen antiproliferativen Effekt <i>in vitro</i>	61
3.2.3	Die shRNA-vermittelte Herunterregulation von DHS und eIF-5A führt zu einer verminderten Proliferation <i>in vitro</i>	63
3.2.4	Mit GC7 behandelte U87-MG-Zellen gehen in einen p21-abhängigen, Zellzyklusarrest und zeigen Anzeichen einer zellulären Seneszenz.....	65
3.2.5	Die Wiederherstellung von p53 ^{wt} ermöglicht eine zelluläre Seneszenz nach DHS-Inhibition in G55T2-Zellen	67
3.2.6	Die gleichzeitige Behandlung von Glioblastomzellen mit TMZ/BCNU und GC7 hat einen additiven antiproliferativen Effekt.....	69
3.2.7	GC7 und TMZ haben keinen proapoptotischen Effekt in den verwendeten Zellmodellen	72
3.2.8	Der Effekt von GC7 in einem <i>in vivo</i> Xenograft Mausmodell	72
3.3	Erstellung einer <i>eIF5a2</i>-„Knockout“-Maus	75
3.3.1	Herstellung des <i>eIF5a2</i> -Zielkonstruktes	75
3.3.2	Verifizierung positiver Klone nach Elektroporation des A2-pWS-TK6-Vektors in murine ES-Zellen	79
3.3.3	Nachweis des heterozygot „geflochten“ <i>eIF5a2</i>	81
4	Diskussion	83
4.1	Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A und die Hypusinmodifikation in Glioblastomen ...	84
4.1.1	eIF5A und die hypusinbildenden Enzyme weisen in Glioblastomen ein erhöhtes Expressionsniveau auf	84
4.1.2	Die DHS-Inhibition hat einen antiproliferativen Effekt auf GBM-Zellen und induziert p53-abhängige Seneszenz	85
4.1.3	GC7 und alkylierende Substanzen haben einen additiven, antiproliferativen Effekt auf GBM-Zellen <i>in vitro</i>	89
4.2	Etablierung einer <i>eIF-5A2</i> Knock-out Mauslinie	91
4.2.1	Die Herstellung von murinen ESCs mittels eines konstruierten Zielvektors ergab keine nachweisbar positiven Klone	92
4.2.2	Mittels des IKMC-eIF5a2-Klons wurden Mäuse mit „gefloxtem“ <i>eIF5a2</i> generiert	95
4.3	Ausblick	97
5	Danksagung	99

6	Während dieser Arbeit entstandene Publikationen und Posterpräsentationen	100
7	Literatur	102
8	Anhang	115
8.1	Primersequenzen.....	115
8.2	Lentirale Vektoren	116
8.3	eIF-5A-Expression in Glioblastomen (REMBRANDT-Datenbank)	117
8.4	Eidesstattliche Versicherung	122

II. Abkürzungsverzeichnis

Die in dieser Arbeit verwendeten Gen- und Proteinabkürzungen entsprechen den offiziellen Konventionen und können in den jeweiligen Datenbanken wie NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) oder Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) nachvollzogen werden.

ACNU	<i>1-[(4-Amino-2-methylpyrimidin-5-yl) methyl]-3-(2-chlorethyl)-3-nitrosoharnstoff</i>
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BCNU	Bis-Chlorethyl-Nitroso-Urea
bp/kb	Basenpaare/Kilobasenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CCNU	Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea
cDNA	Komplementäre DNA
CML	Chronische myeloische Leukämie
cpm	Ereignisse pro Minute
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ESCs	Embryonale Stammzellen
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und Andere)
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i> (Durchflusszytometer)
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (fetales Kälberserum)
FRT	<i>Flp recognition target</i>
GBM	Glioblastom
GC7	<i>N</i> ¹ -guanyl-1,7-Diaminohepatan
gDNA	Genomische DNA
HAART	Hochaktive Antiretrovirale Therapie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
loxP	<i>Locus of crossover (x) P1</i>
NEAA	Nichtessentielle Aminosäuren
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
TIZ	Tumorinitiierender Zellen

Abkürzungsverzeichnis

TMZ	Temozolomid
TPZ	Tumorpropagierende Zellen
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

III. Zusammenfassung

Krebserkrankungen entstehen durch die Akkumulation von genetischen und epigenetischen Veränderungen, die unter anderem dazu führen, dass zelluläre Mechanismen zur Regulation von Wachstum, Zellteilung und Zellzykluskontrolle außer Kraft gesetzt werden. Diese, für die Transformation der Zellen notwendigen, Mutationen („Driver-Mutationen“) können beispielsweise zur Fehlfunktion von Kontrollproteinen und kritischen Signalrezeptoren führen. Auch die Überexpression von Pro-proliferativen Mechanismen (z. B. in der Transkriptions- und Translationskontrolle) trägt zu einer unkontrollierten Proliferation und damit zum Tumorwachstum bei. Die „Driver-Mutationen“ können zudem von weiteren genetischen Veränderungen begleitet werden, die zu einem aggressiveren Phänotyp und damit zu einer schlechteren Prognose führen können. Die Suche nach weiteren, deregulierten Faktoren, führt zu einem besseren Verständnis von Krebserkrankungen, ermöglicht zum Anderen aber auch die Identifikation neuer molekularer Ziele, die sich für die Behandlung von malignen Neoplasien als nützlich erweisen könnten. Der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 5A (eIF-5A) trägt die einzigartige, posttranslationale Modifikation Hypusin. eIF-5A und die Hypusin bildenden Enzyme werden in hoch proliferativen Geweben und Zellen stark exprimiert, wozu beispielsweise auch aggressive Tumorzellen gehören. Hypusin ist für die bekannten Funktionen von eIF-5A essentiell und seine Synthese durch die Enzyme DHS und DOHH lässt sich durch kleinmolekulare Inhibitoren unterbinden. eIF-5A und insbesondere die Isoform eIF-5A2 konnte in der Vergangenheit als Tumor fördernd und unter bestimmten Bedingungen als Tumor initiiierend identifiziert werden. Da aggressive Hirntumore stark proliferieren, war die Hypothese, dass das Hypusinsystem in diesen Tumoren eine wichtige Rolle für das starke und ungehemmte Wachstum der Tumorzellen spielt. Um diese Hypothese zu bearbeiten, wurde im Rahmen dieser Arbeit die DHS als ein mögliches therapeutisches Ziel in hochgradigen Hirntumoren (Glioblastomen) untersucht und die Auswirkung einer inhibierten Hypusinsynthese auf Glioblastomzelllinien, sowie „gesunde“, primäre Astrozyten analysiert. Die Funktion der Isoform eIF-5A2 ist weitestgehend nicht verstanden, ihre vermutliche Rolle in bestimmten Krebsarten macht es allerdings zu einem interessanten Ziel der biomedizinischen Forschung. Sie wird hauptsächlich im Gehirn und in der Testis exprimiert und hat damit, im Vergleich zu eIF-5A, eine relativ spezifische Expression. Die Untersuchungen, die sich mit eIF-5A2 beschäftigen, wurden bisher weitestgehend in Hefen oder Zellkulturen durchgeführt. Um ein besseres Verständnis für die Funktion von eIF-5A2 in einem pharmakologisch relevanten Modellorganismus zu bekommen, wurde daher damit begonnen eine „Knockout“-Maus zu erstellen, die für zukünftige Analysen zur Verfügung

steht. Mit Hilfe dieser „Knockout“-Maus lassen sich möglicherweise neue Erkenntnisse zu systemischen und organspezifischen Funktionen in Säugern gewinnen.

IV. Abstract

Neoplastic diseases emerge via the accumulation genetic and epigenetic changes, which lead to a deactivation of regulatory mechanisms responsible for the regulation of cell growth, proliferation and cell cycle control. These mutations, which are necessary for a cellular transformation (driver mutations), can result in a malfunction of control factors or critical signal receptors. Additionally, the overexpression of Pro-proliferative mechanisms, e.g. control components of the transcriptional and translational apparatus can contribute to an uncontrolled proliferation and thus, to tumor growth. Driver mutations can be accompanied by additional genetic changes, which can lead to a more aggressive tumor phenotype and a worse prognosis for patients. The search for undiscovered deregulated factors leads to a better understanding of cancers and further might lead to the identification of new molecular targets for the treatment of malignant diseases. The eukaryotic translation initiations factor 5A (eIF-5A) carries a unique post-translational modification, the amino acid hypusine. eIF-5A and the hypusin forming enzymes are expressed in highly proliferative cells, including tumor cells. Hypusine is essential for the activity of eIF-5A, although its cellular and molecular functions aren't fully understood. However, the hypusine formation via the enzymes deoxyhypusine synthase (DHS) and deoxyhypusine hydroxylase (DOHH) can be inhibited by small molecule compounds. eIF-5A and especially the isoform eIF-5A2 have been identified as tumor growth inducing or pro-proliferative factors under certain conditions. Since high-grade brain tumors are highly proliferative, it was our hypothesis that the hypusine system plays an important role in the strong and unregulated growth of these tumors. To test this hypothesis, we investigated the role of eIF-5A in high grade brain tumors (glioblastomas) and the impact of an inhibited hypusine modification on tumor cells and "healthy" primary astrocytes.

The functions of the isoform eIF-5A2 are little understood, though, its probable role in certain cancer types makes it a very interesting target for biomedical research projects. It is expressed mainly in the brain and testis. Hence, it has a rather specific expression pattern, compared to eIF-5A. Most investigations regarding eIF-5A2 have been performed in yeast or cell cultures. The construction of a murine knock out modell was started, to gain a better understanding of the mechanisms of eIF-5A2 *in vivo*. This conditional knock out mouse can be used for further analysis to obtain a deeper insight of the systemic and organ specific eIF-5A2 function.

1 Einleitung

1.1 Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A und die Hypusinmodifikation

1.1.1 Molekularbiologische Charakterisierung von eIF-5A und der posttranslationalen Hypusinmodifikation

Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (**eIF-5A**) ist ein 18 kDA kleines, saures Protein. Es trägt als einzig bekanntes Protein die hochspezifische, posttranslationale Modifikation namens **Hypusin**^{1,2}. Diese ungewöhnliche Aminosäure wird durch die Enzyme

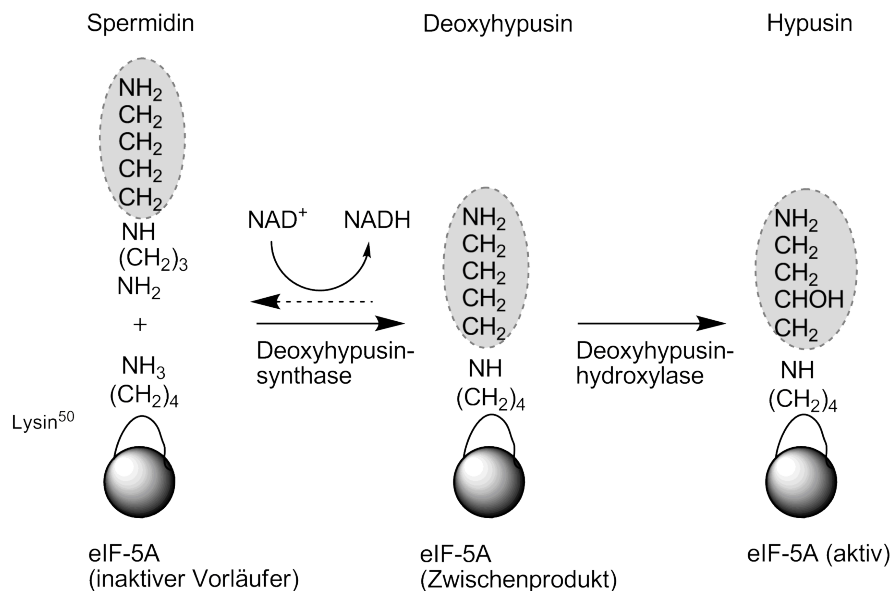


Abb.: 1 Schematische Darstellung der Hypusinsynthese. Zuerst wird ein Aminobutylrest durch die DHS von Spermidin auf das Lysin⁵⁰ im eIF-5A-Vorläufer übertragen. Dieser Schritt benötigt NAD⁺ als Ko-Faktor und ist prinzipiell reversibel. Im zweiten Schritt wird der übertragene Rest an einer spezifischen Stelle durch die DOHH hydroxyliert. Das Endprodukt ist das aktive eIF-5A.

Deoxyhypusinsynthase (**DHS**) und Deoxyhypusinhydroxylase (**DOHH**) mit dem Polyamin Spermidin als Substrat synthetisiert (Abb.: 1). Hierbei erfolgt eine Übertragung des Aminobutylrests vom Spermidin auf einen hochkonservierten Lysinrest am eIF-5A durch die DHS (Lysin⁵⁰ bei Menschen und bei Mäusen). Dieser Rest wird durch die DOHH hydroxyliert, um das aktive, hypusinierte eIF-5A zu bilden³.

In Vertebraten wurden zwei Isoformen von eIF-5A, eIF-5A1 und eIF-5A2, beschrieben⁴⁻⁶. Die erste Isoform (zumeist einfach eIF-5A genannt) ist in Säugerzellen konstitutiv exprimiert und abundant in proliferierenden Zellen^{7,8}. Die zweite Isoform hingegen wird gewebsspezifisch exprimiert, hauptsächlich in Hoden und Teilen des Gehirns. In anderen Geweben ist eIF-5A2

teilweise auf mRNA-Ebene exprimiert, auf Proteinebene hingegen nahezu nicht detektierbar^{5,6,8}. Beide Proteine werden von jeweils einem eigenen Gen kodiert und in jeweils fünf Transkripte umgeschrieben. Die Transkripte weisen teils unterschiedliche 3'-UTRs auf, bzw. sind trunziert, was insbesondere bei den eIF-5A2-Transkripten einen Einfluss auf die Translationsrate und Polysomenbildung der eIF-5A2-mRNA hat und möglicherweise so an der Regulierung der Expression beteiligt ist⁸. Auch hat die eIF-5A2-mRNA eine geringere Stabilität als die von eIF-5A. Somit scheint zumindest ein Teil der unterschiedlichen Expression der beiden Isoformen durch diese posttranskriptionellen Mechanismen erklärbar.

Das Enzym DHS ist für den ersten Schritt der **Hypusinsynthese** verantwortlich. Die meisten Eukaryoten verfügen über ein einzelnes, in Eukaryoten und Archaeen konserviertes, *dhps*-Gen, das für die DHS kodiert. Bisher wurden in Menschen drei Transkriptvarianten gefunden, von denen allerdings nur eine für ein aktives Protein kodiert⁹. Als Substrat für die DHS dient das Polyamin Spermidin. Die Übertragung des Aminobutylrestes vom Spermidin auf eIF-5A-Lysin⁵⁰ ist ein NAD-abhängiger Prozess und prinzipiell reversibel. Die DHS ist ein ~40 kDa großes, tetrameres Protein, das aus vier identischen Untereinheiten besteht^{10,11} und somit ein Holoenzym mit vier Spermidinbindungsstellen bildet. Ein aktives Zentrum wird dabei als eine Art längliche Vertiefung von je zwei Untereinheiten gebildet. Innerhalb dieser Vertiefung befinden sich die Aminosäurereste, die für die Bindung von Spermidin und die Bildung von Zwischen- und Endprodukt notwendig sind. Das aktive Zentrum ist auch das Ziel vieler DHS-Inhibitoren. Insbesondere Spermidinanaloga zeigten eine hohe Spezifität für diesen Bereich der DHS¹². 1,7-Diaminoheptan ist dem Spermidin sehr ähnlich und hat, mit einem K_i -Wert von 5,6 μM , eine sehr ähnliche Affinität (K_m von 4,5 μM für Spermidin). Der bisher wirksamste und am besten beschriebene, spermidinähnliche DHS-Inhibitor ist *N*¹-guanyl-1,7-Diaminoheptan (GC7) mit einem K_i -Wert von 0,01 μM ^{12,13}.

Der zweite Schritt der Hypusinbildung wird durch das eisenhaltige Enzym DOHH bewerkstelligt. Dieses Enzym ist in Eukaryoten ebenfalls hochkonserviert und gehört zu einer Proteinfamilie, die sich durch das Vorhandensein von acht Tandem- α -Helices (HEAT-repeats) auszeichnet. Je zwei Eisenatome werden in einem DOHH-Protein koordiniert und sind für die Hydroxylierung des Deoxyhypusine von entscheidender Bedeutung¹⁴. Die Struktur der DOHH konnte bisher nur bioinformatisch prognostiziert werden und bisher steht keine publizierte Kristallstruktur zu Verfügung. Assays zum Nachweis der DOHH-Aktivität wurden erst vor kurzem entwickelt¹⁵. Daher beschränkte sich die Inhibierung der DOHH auf die Verwendung von chelatierenden Substanzen (z.B. Mimosin und Cyclopirox), welche die Eisenatome aus dem (putativen) aktiven Zentrum lösen und die DOHH damit inaktivieren. Allerdings wirken solche Agenzien recht unspezifisch, da sie auch andere Metallionen aus anderen Proteinen und Cofaktoren chelatieren können.

1.1.2 Die Rolle von eIF-5A und der Hypusinmodifikation in physiologischen Prozessen

eIF-5A ist mit Ribosomen assoziiert und wurde daher ursprünglich als einer der Translationsinitiationsfaktoren beschrieben. In der Tat scheint es eine Rolle bei der Initiation der Proteinsynthese und der Elongation zu haben¹⁶⁻¹⁸. *In vitro* spielt es bei der Bildung der

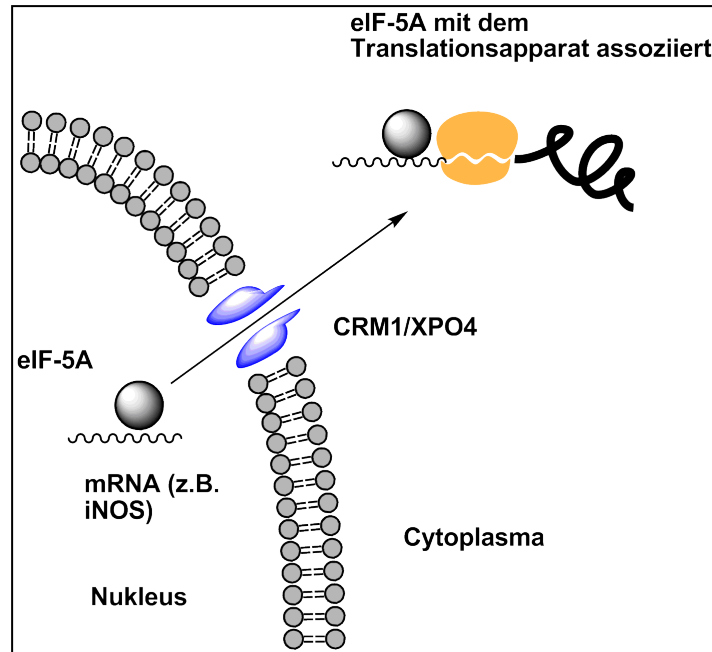


Abb.: 2 Schematische Darstellung der hypothetischen Funktion von eIF-5A. Zur besseren Übersicht sind die weiteren Faktoren, die am Transport, Export und Translation von mRNAs beteiligt sind, nicht dargestellt.

ersten Peptidbindung eine Rolle. Die genaue Funktion von eIF-5A in diesem Prozess ist allerdings noch nicht aufgeklärt. Gegen eine Funktion als allgemeiner Translationsinitiationsfaktor spricht die Tatsache, dass ein „Knockout“ des eIF-5A-Gens in *Saccharomyces cerevisiae* („Bäckerhefe“) nur zu einer begrenzten Reduktion (ca. 30%) der Proteinsynthese führte¹⁹. Die Hypusinmodifikation spielt bei der Regulation der Aktivität von eIF-5A eine entscheidende Rolle. Vorläufer ohne Hypusin zeigen in einem *in vitro* Methionyl-Puromycin Versuch keine Aktivität^{20,21}, d.h. die Funktion, die eIF-5A bei der Translationsinitiation ausübt, ist hypusinabhängig. Auch die Assoziation von eIF-5A mit Ribosomen ist hypusinabhängig²², allerdings im Gegensatz zu anderen Initiationsfaktoren nicht zwingend notwendig für die generelle Initiation der Translation^{23,24}.

Trotzdem scheint die Hypusinierung von eIF-5A essentiell zu sein. Kann es nicht mehr hypusiniert werden (z.B. durch Mutagenese des Lysin⁵⁰ oder Inhibierung/Deletion der DHS), so ist dies letal in Hefen, in Mäusen und in manchen eukaryotischen Zellen²⁵⁻²⁷. Interessanterweise ist das Hefe-DOHH Homolog (*LIA1*) nicht essentiell für die Viabilität der Hefezellen und seine Deaktivierung hat nur einen geringen Effekt auf die Proliferation¹⁴. Allerdings scheint der zweite Schritt der Hypusinierung in höheren Organismen wichtiger zu

sein. Für *Drosophila*-Fliegen ist die DOHH essentiell für das Überleben des Organismus. Ein „Knockout“ des DOHH-Homologs *Nero* in *Drosophila* wirkt sich beispielsweise auf Zellwachstum, Proteinsynthese und Regulation der Autophagie aus²⁸. Dies deutet darauf hin, dass die Hydroxylierung des Deoxyhypusins während der Entwicklung höherer Eukaryoten an Bedeutung gewonnen hat und dass die beiden Schritte der Hypusinsynthese sich unabhängig voneinander entwickelt haben.

Neuere Studien haben weitere zelluläre Funktionen von eIF-5A aufgezeigt. So ist es am Transport und an der Regulation der mRNA Stabilität von **spezifischen mRNAs** beteiligt^{29,30}. In einigen Experimenten wurde eine verminderte Hypusinierung und die Akkumulation von nicht-hypusiniertem eIF-5A mit **Apoptose** in Verbindung gebracht^{31,32}. Auch die intrazelluläre Lokalisation von eIF-5A könnte hierbei eine Rolle spielen. So beobachteten Taylor et al. eine Translokation von eIF-5A aus dem Zytoplasma in den Zellkern, wenn Kolonkarzinomzellen mit Interferon- γ und TFN- α behandelt wurden, was eine proapoptotische Wirkung hatte. Diese Translokation wird vermutlich durch die hypusinabhängige Interaktion mit Exportin 4 (XPO4) und/oder CRM1 bewerkstelligt³³⁻³⁵. Interessanterweise werden TNF- α sensitive Zellen weniger apoptoseanfällig, wenn eIF-5A, in diesem Fall durch eine siRNA, herunterreguliert ist³⁶. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die eIF-5A-vermittelte Apoptose der **p53-abhängigen** Transkriptionskontrolle unterliegt (die Expression von eIF-5A wird in p53-abhängigen apoptotischen Prozessen erhöht) und den intrinsischen mitochondrialen Apoptosesignalweg einschließt^{37,38}.

Die oben beschriebene Rolle von eIF-5A in apoptotischen Prozessen lässt sich allerdings nicht ohne Weiteres auf alle Zellen und Gewebe anwenden. In einigen Zelltypen wurde keine Apoptose beobachtet, wenn die Hypusinsynthese blockiert ist. In einigen Fällen konnte eine Blockade des Zellzyklus in der G₁-Phase beobachtet werden. So führt beispielsweise eine Inhibierung der Hypusinsynthese durch den DHS-Inhibitor GC7 zu einer stark reduzierten Proliferation in CHO- und HUVEC-Zellen, jedoch nicht zur Apoptose³⁹. In einigen Zelllinien konnte die Verminderung der Proliferation, nach Inhibierung der DHS oder DOHH mit einem Stopp des **Zellzyklus** am Übergang der G₁- zur S-Phase in Verbindung gebracht werden⁴⁰⁻⁴². Die genauen Faktoren, welche die unterschiedlichen Effekte einer blockierten eIF-5A-Hypusinierung erklären, sind allerdings noch unbekannt.

Eine gängige Hypothese ist, dass eIF-5A am **Kernexport** und der **Translation** spezifischer mRNAs beteiligt ist (vereinfacht dargestellt in Abb.: 2). eIF-5A ist sowohl im Zellkern, als auch im Cytoplasma lokalisiert und kann mittels CRM1/XPO4 zwischen den beiden Kompartimenten wechseln. Im Kern kann eIF-5A spezifische mRNAs binden und in das Cytoplasma exportieren. Hier erfolgt die Assoziation mit Ribosomen während der Initiation und Durchführung der Translation, wobei natürlich eine Vielzahl weiterer Faktoren an allen diesen Schritten beteiligt ist. Diese Hypothese könnte erklären, warum ein nicht-funktionelles

eIF-5A nur zu einer begrenzten Verminderung der Translation führt, nämlich nur derjenigen mRNAs, die eIF-5A-abhängig sind.

Zur Rolle der Hypusinmodifikation im zellulären Polyaminhaushalt lässt sich sagen, dass schon die Depletion des Hypusinvorläufers Spermidin unterschiedliche Effekte auf die betroffenen Zellen haben kann. Generell korreliert die Spermidinmenge, die Zellen zur Verfügung steht, mit der Fähigkeit zur Proliferation, und in einigen Versuchen auch mit der Fähigkeit zur Differenzierung⁴³⁻⁴⁵. In *S. cerevisiae* wird bei Spermidinmangel ein Großteil des verfügbaren Spermidins für die Hypusinsynthese verwendet⁴⁶. Dies unterstreicht zum Einen die physiologische Bedeutung der Hypusmodifikation, ist aber auch ein Hinweis darauf, dass die beobachteten Effekte eines Spermidinentzuges (zumindest in Hefen) eine Folge der verminderten Hypusinierung sind und nicht durch den generellen Mangel an Spermidin zustande kommen. Denn so lange genug Spermidin für die Hypusinsynthese zu Verfügung steht, sind die Effekte auf die Proliferation und Viabilität der Hefezellen gering.

Die meisten Erkenntnisse über die systemischen und zellulären Funktionen der beiden eIF-5A-Isoformen stammen aus Experimenten mit Hefen oder Zellkulturen. Wie oben beschrieben, wurden erste Erkenntnisse auch in *Drosophila* (DOHH-KO) oder einem ersten nicht-konditionalen Knockout in einem Säugetier (KO der DHS in Mäusen) gewonnen. Für eIF-5A2 existiert ein Mausmodell, in dem das Protein überexprimiert wird⁴⁷. Hierbei konnte ein destabilisierender Effekt auf die Chromosomen durch die eIF-5A2-Überexpression festgestellt werden. Dies führte in den Mäusen zu einem verfrühten „Alterungsphänotyp“, der sich z.B. in schnell alternden Knochen und Hautzellen, sowie in einer verringerten Wundheilung äußerte. Auch ein Einfluss auf den p53-Signalweg konnte gezeigt werden. Trotz dieser ersten Einblicke in die Funktion von eIF-5A2 *in vivo*, würde ein Knockout-Mausmodell dazu beitragen die systemische Rolle von eIF-5A2 aufzuklären. Da ein solches Modell noch nicht zur Verfügung steht, wurde im Rahmen dieser Arbeit damit begonnen, es anzufertigen

1.1.2.1 Untersuchung von Proteinfunktionen *in vivo* mittels Mausmodellen

Für die Untersuchung von Proteinfunktionen durch einen Knockout (erstmals beschrieben von Thomas und Cappecchi⁴⁸) stehen verschiedene Modellorganismen zur Verfügung. Die am besten charakterisierten Säugermodelle sind Mäuse (*Mus musculus*) und Ratten (*Rattus norvegicus*). Die Verwendung dieser Organismen hat sich bereits in der Vergangenheit bewährt und eine Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen ist ebenfalls häufig (sicher aber nicht immer) möglich, kann aber häufig zu einem besseren Verständnis von biologischen Vorgängen oder Krankheiten führen⁴⁹⁻⁵³. Die Sequenzierung

des Mausgenoms, die Verfügbarkeit von etablierten Methoden zur Manipulation der Tiere und die relativ einfache und kostengünstige Haltung von Mäusen tragen dazu bei, dass dieses Modell in der biomedizinischen Forschung bevorzugt wird.

Besonders die Möglichkeit, die Deletion des Zielgens zeitlich und/oder räumlich steuern zu können (konditionaler Knockout), eröffnet interessante Möglichkeiten. Komplikationen, wie z.B. eine embryonale Letalität, lassen sich umgehen und die Effekte eines Knockouts im adulten Tier beobachten. Auch die Untersuchung der Bedeutung des Zielgens in spezifischen Geweben ist so möglich. Der konditionale KO wird hierbei durch zwei sequenzspezifische Rekombinasen, Cre (*causes recombination*) und Flp (*Flipase*), die aus dem Bakteriophagen P1 bzw. Hefe (*S. cerevisiae*) stammen, ermöglicht. Diese Rekombinasen erkennen spezifische DNA-Sequenzen, die jeweils 34 bp lang sind. Die Erkennungssequenzen sind für die jeweilige Rekombinase spezifisch und werden für die Cre- und Flp-Rekombinasen loxP (locus of crossover (x) P1) und FRT (Flp recombinase recognition target) genannt. Je nachdem wie zwei loxP- bzw. FRT-Sequenzen zueinander orientiert sind, kann die entsprechende Rekombinase die Sequenz dazwischen ausschneiden (Deletion) oder invertieren^{54,55}. Wenn diese Sequenzen ein gewünschtes Gen flankieren (das Gen „gefloxt“ ist), kann es somit durch die entsprechende Rekombinase ausgeschnitten werden (zusammengefasst z.B. von Cappecchi⁵⁶). Dieser KO wird durch die Verpaarung des Tieres mit dem „geflochten“ Gen und einem „Deleter“-Tier bewerkstelligt. Das „Deleter“-Tier ist eine transgene *Knock-in*-Maus und exprimiert die entsprechende Rekombinase. Ort und Zeit der Expression (und damit auch Ort und Zeit des KOs) können durch den Promotor der Rekombinase bestimmt werden. So können Promotoren verwendet werden, die nur in bestimmten Geweben oder Entwicklungsstadien aktiv sind. Außerdem gibt es induzierbare „Deleter“, bei denen die Expression der Rekombinase durch Verabreichung eines bestimmten Wirkstoffes induziert wird. Hier stehen beispielsweise Tetracyclin⁵⁷-, IFN α ⁵⁸- oder tamoxifeninduzierbare⁵⁹ „Deleter“ zur Verfügung.

1.1.3 eIF-5A und die hypusinbildenden Enzyme in neoplastischen Erkrankungen

In einer Reihe von Neoplasien konnten Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von eIF-5A1/2 oder der hypusinbildenden Enzyme bei der Entstehung oder Progression von Tumoren gefunden werden. So wird eIF-5A in Patientenzellen mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) im Vergleich zu Knochenmarkszellen gesunder Spender überexprimiert. Eine gemeinsame Behandlung von *BCR-ABL*⁺ CML-Zellen mit Hypusinierungsinhibitoren und Imatinib (der Goldstandard in der CML-Behandlung) erzielte einen synergistischen, antiproliferativen Effekt⁶⁰. Des Weiteren wurde eine Überexpression von eIF-5A in kolorektalen Karzinomen gefunden⁶¹. Im multiplen Myelom wird zurzeit eine Kombination von

einer siRNA gegen eIF-5A und einem Plasmid, welches für die nicht-hyposinierbare Mutante eIF-5A^{K50R} kodiert, getestet (Senesco Technologies). Hierbei soll zum Einen eine Reduktion des zellulären eIF-5A-Spiegels erreicht werden, was einen antiproliferativen Effekt sowie Herunterregulation von NF- κ B und anderen anti-apoptotischen Proteinen zur Folge haben soll. Zum Anderen wird die mutierte Variante, aufgrund des spezifischen Promotors, hauptsächlich in Myelomzellen exprimiert und soll dort eine pro-apoptotische Wirkung haben, wie sie bereits oben beschrieben ist. Des Weiteren beschrieben Lu *et al.*, dass die ektopische Expression der mikroRNA 7 (mir7), zu einer Herabregulation von eIF-5A und zu einer reduzierten Zellmigration und -Invasion, sowie einer verminderten Tumorbildung *in vitro* und in einem Glioblastommodell *in vivo* führt⁶².

Das Gen, welches für eIF-5A2 kodiert, liegt auf Chromosom 3q26.2, ein Bereich, der häufig in einigen Neoplasien (z.B. Ovarial- und hepatozellulären Karzinomen) amplifiziert ist. Daher wurden die Gene, die in diesem Bereich liegen (unter Anderem eIF-5A2) mit der Entstehung und Progression dieser Krebsarten in Verbindung gebracht^{63,34}. So ist eine Überexpression von eIF-5A2, im Gegensatz zu eIF-5A1, in der Lage, p53^{-/-}, MYC-transduzierte Vorläufer von Hepatozyten zu transformieren und so zu einer Tumorbildung *in vivo* beizutragen³⁴. Hier konnten Zender *et al.* auch zeigen, dass eIF5-A2 und das Kernexportprotein XPO4, welches ja am Export von eIF-5A1 und -A2 beteiligt ist, einen onkogenen, regulatorischen Kreislauf bilden. Sowohl die Herunterregulation von XPO4, als auch eine Überexpression von eIF-5A2 wirken tumorigen. Damit konnte für eIF-5A2 eine Rolle als Onkogen in Zellen, die bereits prämaligne Schäden aufweisen, aufgezeigt werden. Daher ist es auch nicht überraschend, dass eIF-5A2 in einer Reihe von Krebszelllinien exprimiert wird^{63,8}, während es nur in wenigen normalen Geweben auf Proteinebene detektierbar ist. Eine solche Überexpression konnte unter anderem in Patienten mit Ovarial-, Urothel-, und Nicht-Kleinzelligem Bronchialkarzinom nachvollzogen und mit einem schlechteren klinischen Verlauf der Patienten korreliert werden. Das heißt, eIF-5A2 könnte hier möglicherweise als prognostischer Marker genutzt werden^{61,64,65}.

Ramaswamy *et al.* fanden einen Hinweis darauf, dass nicht nur eine veränderte Regulation von eIF-5A und -A2 bei der Entstehung von Neoplasien eine Rolle spielen können. Sie konnten zeigen, dass *dhps*, das für die DHS kodierende Gen, eines von acht Signaturgenen ist, die in metastatischen Tumoren hochreguliert sind (im Vergleich zu nicht-metastasierenden Tumoren)⁶⁶. Zunächst verglichen sie das Genexpressionsprofil von 12 metastatische Adenokarzinomknoten aus verschiedenen Geweben mit dem von 64 primären Adenokarzinomtumoren. Sie beschrieben 128 Gensignaturen, die in metastasierenden Tumoren eine veränderte Expression gegenüber den Primärtumoren aufwiesen. Diese Gensignatur konnte auf 17 Gene präzisiert werden, die in Primärtumoren und Metastasen unterschiedlich reguliert sind (z.B. Medulloblastomen und Adenokarzinomen). Allerdings

scheint keines der 17 Gene alleine als Metastasierungsmarker ausreichend zu sein. Im Falle von *dhps* ist dies in Übereinstimmung mit der Hypothese, dass eIF-5A (bzw. eine vermehrte Hypusinierung) alleine nicht transformierend wirkt, sondern sekundärere tumorfördernde Effekte hat.

1.1.4 eIF-5A und Hypusin in anderen Erkrankungen

Die Replikation des HI-Virus hängt von dem viralen Faktor Rev ab und eine Beteiligung von eIF-5A am Rev-Weg und damit am Kernexport viraler mRNAs, konnte gezeigt werden^{67,68}. eIF-5A interagiert mit den HIV Transaktivatorproteinen REV und HTLV-1 REX und ist dadurch am Kernexport von nicht- und unvollständig gespleißten, viralen mRNAs beteiligt^{69,70}. Hauber *et al.* konnten daraufhin die DHS als ein mögliches, neues Ziel für die Entwicklung einer antiviralen Therapie identifizieren⁷¹. Sie verwendeten den niedermolekularen DHS-Inhibitor CNI-1493, um die HIV-1 Replikation in einem Zellkulturmodell zu unterbinden. CNI-1493 wurde zunächst als antiinflammatorischer Wirkstoff⁷² und Inhibitor einiger MAPK-Kinasen identifiziert, z.B. p38 MAPK⁷³. Hauber und Kollegen konnten in einer Reihe von Versuchen zeigen, dass CNI-1493 auch eine DHS-inhibitorische Aktivität hat und die Inhibition der DHS letztendlich für die verminderte Replikation der HI-Viren verantwortlich ist. Somit stellt die DHS ein mögliches Ziel für die Behandlung von HIV-1-Typen dar, die eine Resistenz gegen die „Hochaktive Antiretrovirale Therapie“ (HAART) aufweisen.

Bereits 2008 konnten Moore *et al.* eine Verbindung von eIF-5A und inflammatorischen Prozessen herstellen. Sie fanden heraus, dass eIF-5A an proinflammatorischen Prozessen während einer schweren Sepsis (Blutvergiftung) beteiligt ist. Eine Herabregulation von eIF-5A mittels siRNA führte in einem murinen *in vivo* Modell zu einer verringerten Entzündungsreaktion und zu einer erhöhten Überlebenschance der Tiere.

Darauf aufbauend konnten Robbins *et al.* zeigen, dass die Deoxyhypusinsynthese und eIF-5A an der Entzündungskaskade von Diabetes im Mausmodell beteiligt sind. Eine Inhibition der DHS führte zu einem verbesserten Glukosehaushalt, verbesserter Glukosetoleranz, vermehrter Insulinausschüttung und einer Zunahme der pankreatischen β -Zellen, die im Laufe einer Diabetes normalerweise absterben⁷⁴. Zudem konnten Mirmira und Kollegen in einem weiteren Maus-Diabetesmodell zeigen, dass eIF-5A am Kernexport (über Exportin-1) und der Regulation der iNOS-mRNA beteiligt ist⁷⁵. iNOS ist eines der Schlüsselenzyme bei der Entstehung von Diabetes. Eine Herunterregulation von eIF-5A durch siRNA oder eine Inhibition der DHS durch GC7 führten hier zu einer verminderten Synthese des iNOS-Proteins und zu einer reduzierten Expression von inflammatorischen Zytokinen und dadurch zu einer verminderten Apoptose der β -Zellen⁷⁵. Somit könnte ein DHS-Inhibitor zur

Verminderung von Apoptose-bedingtem Absterben der pankreatischen Inselzellen beitragen. Die Rolle von eIF-5A bei Entzündungsreaktionen, die für die Entwicklung einer Diabetes entscheidend sind, spiegelte sich auch in anderen Szenarien wieder. Eine oral verabreichbare Form von CNI-1493 namens CPSI-2364 wurde für die Behandlung von Morbus Crohn, einer chronischen-entzündlichen Autoimmunkrankheit des Darms, getestet. Auch hier zeigte sich eine anti-inflammatorische Wirkung, die mit der Inhibierung der DHS in Verbindung gebracht wurde.

Die Hypothese, dass die eIF-5A-Proteine und die hypusinbildenden Enzyme in der Pathogenese vieler maligner Neoplasien beteiligt sind, wird durch eine steigende Anzahl an Studien belegt. Daher bot sich die Evaluierung einer Beteiligung dieser Proteine in weiteren Krebserkrankungen an. Hier waren besonders maligne Neoplasien von Interesse, für die bisher nur wenige, wirksame therapeutische Optionen zur Verfügung stehen. Hierzu gehören insbesondere höhergradige Hirntumore, deren Behandlung, egal ob operativ, mit klassischer Radio-/Chemotherapie oder gezielten molekularen Therapien, nur selten erfolgreich ist. Daher wurden eIF-5A1/2, DHS und DOHH als mögliche therapeutische Ziele in höhergradigen Astrozytomen untersucht.

1.2 Hirntumore

Zu den Hirntumoren werden onkologische Erkrankungen des Gehirns, der Hirnnerven, der Sellaregion, der Meningen gezählt, die aus Hirnzellen hervorgehen. Auch sekundäre Tumore (Metastasen), die ihren Ursprung in anderen Teilen des Körpers haben, gehören dazu. Mit einer Inzidenz von 6 – 11 pro 100.000 Einwohner und Jahr (Männer) und 4 – 11 pro 100.000

Tabelle 1: WHO Klassifikation astrozytärer, oligodendroglialer und ependymaler Gliome und Inzidenz⁷⁶.

	Tumorfamilie	Tumorentität	WHO-Grad	Inzidenz
Gliome	Astrozytome	Pilozytisches Astrozytom	I	20 - 30% der Gliome
		Diffuses Astrozytom	II	
		Anaplastisches Astrozytom	III	
		Glioblastom	IV	50% der Gliome
	Oligodendrogliome	Oligodendrogliom	II	3 - 4% der Gliome
		Anaplastisches Oligodendrogliom	III	
	Mischgliome	Oligoastrozytom	II	
		Anaplastisches Oligoastrozytom	III	
	Ependymome	Myopapilläres Ependymom	I	2 - 6% der Gliome
		Subependymom	I	
		Ependymom	II	
		Anaplastisches Ependymom	III	

Einwohner und Jahr (Frauen) gehören primäre intrakranielle Tumore zu den eher selten vorkommenden Tumoren⁷⁷⁻⁷⁹. Ca. 40% - 50% der Tumore gehören zu den Gliomen. Dabei handelt es sich um Tumore, die sich anhand von immunohistochemischen und histologischen Merkmalen von den Gliazellen des Gehirns ableiten lassen. Die genauen Herkunftszellen der Gliome sind allerdings noch unbekannt. Diskutiert werden neurale Stammzellen oder Vorläuferzellen, die im Laufe ihrer Entwicklung eine Transformation durchlaufen oder eine Dedifferenzierung von neuronalen/glialen Zellen⁸⁰. Bei den Gliazellen (auch Stützzellen genannt) handelt es sich um eine Reihen von Zelltypen, deren Funktion zunächst mit Aufgaben wie Strukturgebung, Versorgung der Neuronen mit Nährstoffen und Sauerstoff, Entsorgung von Abfallstoffen, Beteiligung an immunologischen Prozessen und der Beeinflussung der neuronalen Entwicklung beschrieben wurden. Neure Ergebnisse deuten darauf hin, dass Gliazellen auch wichtige Funktionen bei der Signalweiterleitung und

Feinregulation von Neurotransmittern haben⁸¹. Zu den Gliazellen gehören Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen. Gliome werden entsprechend ihrer morphologisch/histologischen Zuordnung zu den verschiedenen Gliotypen in die Gruppen der Astrozytome, Oligodendrogliome und Ependymome unterteilt. Zudem gibt es Mischformen, z.B. Oligastrozytome und glioneurale Tumore.

1.1.1. Pathologie und klinische Merkmale von Gliomen

Die Gliome werden nach einer Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) seit 1979 entsprechend ihrem Malignitätsgrad in vier Stufen (WHO-Grad I-IV) unterteilt (siehe Tabelle 1). Die histologische Diagnose basiert auf verschiedenen Faktoren, z.B.: auf der Anzahl von Kernatypien, Mitosen, Endothelproliferation/vermehrte Vaskularisierung und Nekrosen. Zudem weisen höhergradige Gliome (anaplastische Astrozytome und Glioblastome) eine diffuse Infiltration des umgebenden Gewebes und einen erhöhten Proliferationsindex auf. Diese Tumore können *de novo* entstehen oder aus bereits bestehenden Astrozytomen mit geringerem Grad hervorgehen⁸⁰, wobei diese sekundären Tumore im Allgemeinen einen höheren Grad haben, als der ursprüngliche Tumor. Tumore mit dem WHO Grad I wachsen langsam, sind scharf abgegrenzt und können operativ oft gut entfernt werden. Tumore mit dem Grad II wachsen ebenfalls langsam, infiltrieren aber das umliegende Gewebe, was eine Resektion schwierig macht. Daher kommt es oft zum Rezidiv. Grad III-Tumore werden als anaplastisch bezeichnet. Sie infiltrieren ebenfalls das umliegende Gewebe, wachsen allerdings schneller. Zudem weisen sie häufig Kernatypien auf. Astrozytome Grad IV (Glioblastome) sind die am häufigsten auftretenden primären Hirntumore und zugleich die aggressivsten. Sie wachsen sehr schnell, infiltrieren massiv in die umliegenden Bereiche, weisen viele Kernatypien auf und werden oft von vaskulären Thrombosen und Nekrosen begleitet⁸². 95% aller Glioblastome entstehen als *de novo* Tumore (primäre Glioblastome). Aufgrund ihres invasiven Wachstums und ihrer diffusen Begrenzung ist eine chirurgische Entfernung (wie bei allen höhergradigen Astrozytomen) schwierig und trotz aller Fortschritte in der Radio- und Chemotherapie überleben weniger als die Hälfte der betroffenen Patienten mehr als ein Jahr nach Diagnosestellung⁸³.

1.2.1 Die Genetik von malignen Gliomen

Da sich ein Teil dieser Arbeit auf die Rolle von eIF-5A und der hypusinbildenden Enzyme in Glioblastomen beschränkt, wird folgend die Untergruppe der Glioblastome näher betrachtet und die anderen Gruppen der Gliome außen vor gelassen.

Krebs entsteht durch die vererbte oder erworbene Veränderung von Genen, die kritische biologische Prozesse kontrollieren. Die Akkumulation solcher genetischer Schäden führt oft zu den sogenannten Markenzeichen des Krebs („Hallmarks of cancer“):

- Replikative Unsterblichkeit
- Induktion von Angiogenese
- Widerstand gegen Apoptose
- Aktivierung/Aufrechterhaltung von proliferativen Signalwegen
- Umgehung von Wachstumssuppressoren
- Aktivierung der Invasion und Metastasierung

Im Laufe der letzten Jahre sind noch weitere Charakteristika von Krebszellen hinzu gekommen. Dazu gehört die Deregulierung des zellulären Energiehaushaltes, die Umgehung des Immunsystems, tumorfördernde Entzündungsreaktionen (Inflammation) und vermehrte genomische Instabilität⁸⁴.

In malignen Gliomen wurden 1984 zuerst Amplifikationen des EGFR-Gens (Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors – „epidermal growth factor receptor“) identifiziert. Dieses Gen liegt auf Chromosom 7 und ist in Gliomen häufig vervielfältigt. In den folgenden Jahren wurden durch weitere karyotypische Analysen die loci von Tumorsuppressoren bestimmt, die in malignen Gliomen oft deletiert sind⁸⁵. Der Verlust des TP53 Tumorsuppressorgens wurde als entscheidende Mutation in GBMs mit Veränderungen von Chromosom 17 bestätigt^{86–88}. Weitere entscheidende Ereignisse sind z.B. der Verlust des p16-Zellzyklusinhibitors und der Phosphatase- und Tensin homolog Phosphatase (PTEN)^{87–89}. Als neueste und in ihrer Bedeutung bestätigte genetische Veränderung wurde eine Punktmutation im Gen der Isocitrat-Dehydrogenase 1 (IDH1) in Gliomen mit niederem Grad und in einer Untergruppe der GBMs beschrieben. Das Enzym verliert seine Fähigkeit Isocitrat in α -Ketoglutarat umzuwandeln, kann dafür aber α -Ketoglutarat zu R(-)-2-Hydroxyglutarat reduzieren. Diese Beispiele sind nur ein Ausschnitt der in GBMs gefundenen Mutationen zeigen aber doch, dass auch in GBMs eine Vielzahl zellulärer Prozesse, z.B.:

- Abhängigkeit von externen Wachstumssignalen
- Der Ausfall wichtiger Kontrollinstanzen
- Deregulierung des Zellzyklus
- Veränderung kataboler Prozesse

an der Entstehung und am Wachstum der Tumore beteiligt sein können.

1.2.2 Molekulare Klassifikation von Glioblastomen

Bisher wurden Hirntumore durch klinisch-pathologisch Beurteilungen diagnostiziert und entsprechend in Tumortypen und –grade eingeteilt, die ihr klinisches Ansprechen widerspiegeln. Durch großangelegte Sequenzierungen von Glioblastomen (z.B. „The Cancer Genome Atlas; TCGA) zeigte sich jedoch, dass es molekulare Untergruppen gibt, die sich anhand von Expressions- und Mutationsprofilen unterscheiden lassen. Anhand dieser Daten konnten vier verschiedene GBM-Gruppen charakterisiert werden (Abb.: 3)

Die erste wird als „klassisch“ bezeichnet. Tumore dieser Gruppe exprimieren Marker von Stammzellen und neuronalen Vorläuferzellen und sie sind empfänglich für Radio- und

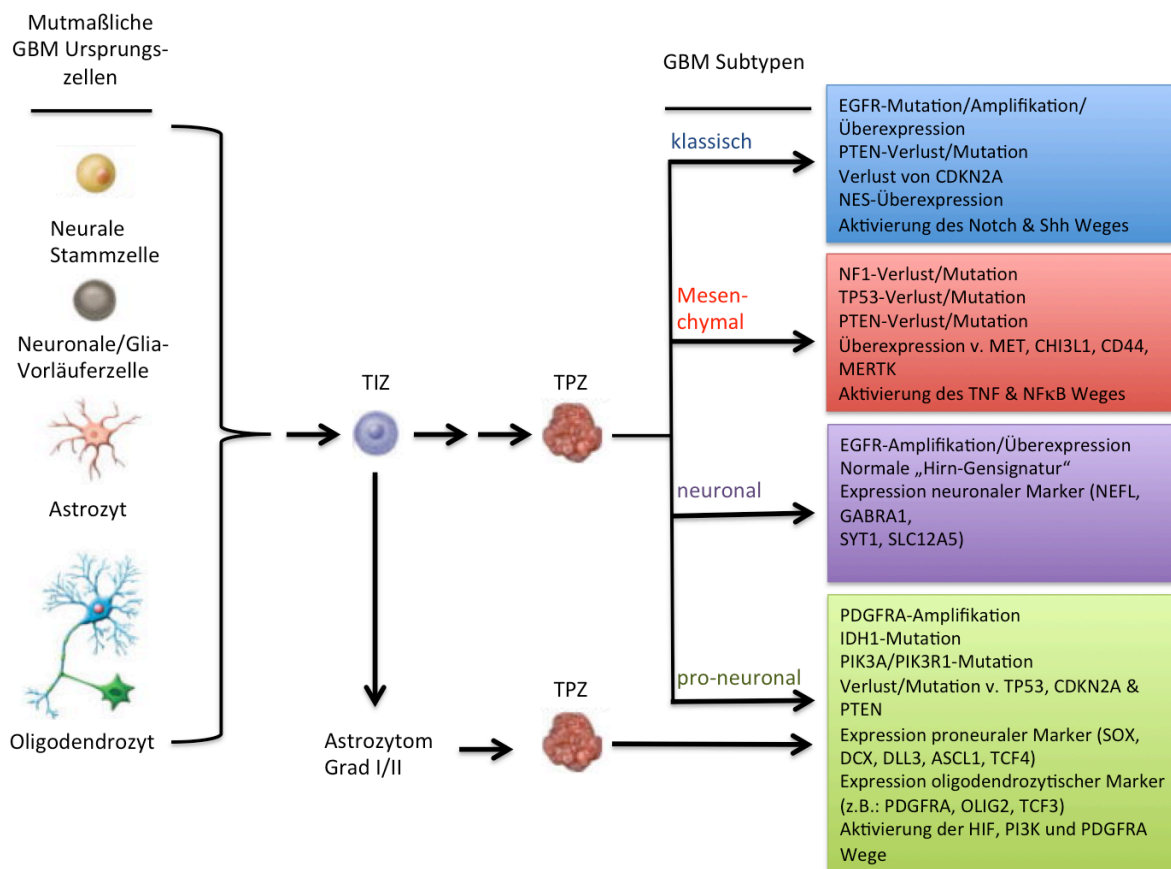


Abb.: 3 Vermutlichen Entwicklung verschiedener Glioblastom-Subtypen und deren charakteristische genetische Veränderungen. Die sequentielle Akkumulation genetischer Veränderungen führt zu einer Population tumorinitierender Zellen (TIZ). Diese können, durch weitere Mutationen, zu tumorpropagierenden Zellen (TPZ) werden, aus denen ein Glioblastom hervorgeht. Die TIZ können aber auch ein Astrozytom niederen Grades hervorbringen, aus dem ein sekundäres Glioblastom werden kann. Nach Meir *et al.*⁶⁶, modifiziert.

Chemotherapie⁹⁰. Die zweite Untergruppe („mesenchymal“) ist durch die Expression mesenchymaler Marker und gesteigerte Angiogenese charakterisiert. Diese Tumore sind wenig anfällig für eine Radiochemotherapie, können aber gelegentlich auf Ras-, PI3K- und Angiogeneseinhibitoren ansprechen. Die dritte Gruppe wird „Proneural“ genannt und zeigt eine verstärkte Expression von Genen, die an der neuronalen Entwicklung beteiligt sind. Die letzte Gruppe wird als „neural“ bezeichnet, ist jedoch weniger gut definiert. Ein Vergleich der Genexpression dieser vier Gruppen mit primären Astrozyten, Oligodendrozyten, Neuronen

und Mikrogliazellen weist darauf hin, dass diese Gruppen die verschiedenen Ursprungszellen der Tumore reflektieren, eine Hypothese, die allerdings noch bestätigt werden muss⁹⁰. Zusammenfassend zeigt der Vergleich dieser Gruppen zumindest, dass sie trotz ihrer Unterschiede alle eine Inaktivierung des p53-Weges, des Retinoblastom-Protein-Weges und die Aktivierung diverser Tyrosinkinase-Wege aufweisen⁹¹.

1.2.3 Behandlungsmöglichkeiten von Glioblastomen

1.2.3.1 Operative Therapie

Die chirurgische Intervention ist für die Behandlung maligner Gliome nach wie vor der Schlüssel bei der Diagnose (Gewinnung von Tumormaterial für die Diagnose) und Behandlung (schnelle Entfernung der Tumormasse). Allerdings kann ein chirurgischer Eingriff durch viele Faktoren begrenzt werden, z.B. Zustand und Alter des Patienten und die Nähe des Tumors zu kritischen Hirnareale⁹². Da hochgradige Gliome zudem stark infiltrierend wachsen und keine definierte Abgrenzung zum umliegenden Gewebe haben, ist eine vollständige Entfernung der Tumorzellen nahezu unmöglich. Daher erfolgt im Allgemeinen eine begleitende Radiochemotherapie.

1.2.3.2 Postoperative Strahlentherapie

Seit Walker *et al.* in einer grundlegenden Arbeit gezeigt haben, dass eine Radiotherapie das Überleben der Patienten signifikant verlängert⁹³, hat sich die Radiotherapie als fester Bestand in der Behandlung hochgradiger Gliome etabliert, obwohl Strahlungsresistenz und der Schutz des gesunden Gewebes wichtige limitierende Faktoren sind. Insbesondere die Überexpression von *EGFR* und die damit verbundene Aktivierung des PI3K-Weges scheint bei der Vermittlung der Strahlungsresistenz eine Rolle zu spielen⁹⁴. Bisherige Versuche, die Sensitivität von Glioblastomen gegenüber Radioaktivität zu erhöhen (z.B. durch PI3K-Inhibitoren), waren wenig erfolgreich.

1.2.3.3 Zytotoxische Chemotherapie

Chemotherapie spielte zunächst keine große Rolle bei der Behandlung von Glioblastomen, da frühe Studien mit Nitrosoharnstoffen nur eine geringe Wirksamkeit zeigten. Metaanalysen ergaben eine Erhöhung der Ein-Jahres-Überlebensrate von 6% - 10%⁹⁵. Die Nitrosoharnstoffe ACNU (Nimustin), BCNU (Carmustin) und CCNU (Lomustin) gehören zu den am häufigsten eingesetzten Zytostatika in der Behandlung von Hirntumoren, speziell

Gliomen. Sie gehören zu den alkylierenden Substanzen, schädigen die DNA der Tumorzellen und sorgen so für deren Absterben. Allerdings haben alle diese Substanzen sehr starke Nebenwirkungen, insbesondere eine ausgeprägte Lungentoxizität und Veränderungen des Blutbildes, was ihren Einsatz problematisch macht. Ein Versuch, dies zu umgehen und den Wirkstoff vor Ort einzusetzen, ist die Verwendung von BCNU-getränkten, abbaubaren Plättchen, die nach der Tumorsektion an die Ränder des vormaligen Tumors platziert werden, um zurückgebliebene Tumorzellen abzutöten. Diese Methode erbrachte einen weiteren, wenn auch geringen Überlebensvorteil für die Patienten⁹⁶.

2005 verglich eine große, randomisierte Studie die Wirksamkeit von Radiotherapie allein mit der Kombination von Radiotherapie und Temozolomid (TMZ; einer weiteren alkylierenden Substanz) und adjuvanter Temozolomidgabe. Hier zeigte sich ein Überlebensvorteil von 2,5 Monaten und ein Anstieg der Zwei-Jahres-Überlebensrate von 10,4% auf 26,5%⁹⁷. Zudem zeigt Temozolomid ein besseres Nebenwirkungsprofil als andere Alkylantien. Allerdings zeigt der Therapieerfolg mit TMZ eine negative Korrelation mit der Demethylierung der Promotoregion des MGMT-Gens. MGMT ist ein DNA-Reparaturenzym und ist vermutlich an der Beseitigung der TMZ-induzierten DNA-Schäden beteiligt. Da mehr als 50% der GBM-Patienten eine Demethylierung des MGMT-Promotors aufweisen⁹⁸, wurde die TMZ-Therapie mit MGMT-Inhibitoren⁹⁹ oder MGMT-Depletion¹⁰⁰ kombiniert. Dies hatte allerdings begrenzten Erfolg, hauptsächlich begründet durch die Dosislimitierung, die sich aus einer Myelosuppression bei der Kombinationstherapie ergab.

1.2.3.4 Ergebnisse erster zielgerichteter Therapien

1.2.3.4.1 Inhibierung intrazellulärer Signalwege

Da maligne Gliome eine Vielzahl von Veränderungen in der Antwort auf Wachstumsfaktoren, Signaltransduktion und der Fähigkeit zur Angiogenese aufweisen wurde eine Reihe zielgerichteter Therapien gegen diese zellulären Komponenten in Betracht gezogen. Als besonders attraktives Ziel bot sich der EGF-Rezeptor an, der in mehr als 40% der GBM-Patienten überexprimiert ist. Zudem trägt ein Teil dieser Patienten die sog. EGFRvIII-Mutation, die einen konstitutiv aktiven EGFR zur Folge hat. Die pharmakologische Inhibition mit niedermolekularen Inhibitoren (Gefitinib, Erlotinib) oder der Einsatz des Anti-EGFR-Antikörpers Cetuximab zeigte jedoch kein verlängertes, progressionsfreies Überleben^{80,101-103}. Kombinationsstudien von Temozolomid-/Radiotherapie und EGFR-Inhibitoren zeigten keine eindeutigen Ergebnisse, bzw. sind noch in der Auswertung.

Der PI3K/AKT-Weg ist ein kritischer Regulator für den Metabolismus, das Wachstum und das Überleben von Tumorzellen. Die Bindung von Liganden an Rezeptortyrosinkinasen

erhöht die Aktivität dieses Weges und führt letztendlich zur Aktivierung vom mTOR. Die Effektoren von mTOR haben eine Vielzahl von Funktionen, z.B. die Anpassung an hypoxische Bedingungen (wie sie häufig in Tumoren herrschen) oder die Translation. Dieser Signalweg ist in malignen Gliomen häufig verstärkt, z.B. durch die Überexpression von Tyrosinkinase, mutierten, onkogenen Untereinheiten der PI3K und/oder den Verlust der Tumorsuppressoraktivität von PTEN. Daher werden mehrere mTOR-Inhibitoren auf Ihre Wirksamkeit in malignen Gliomen getestet. Dazu gehören bereits etablierte Substanzen wie Sirolimus, Everolimus und Temsirolimus^{89,104}. Allerdings zeigte kein Inhibitor alleine eine signifikante Wirkung.

Neben dem oben beschriebenen Signalweg erfolgt eine Signaltransduktion von aktivierten Tyrosinkinase häufig auch über den Ras/Raf/MAPK-Weg. Die Aktivierung von Ras benötigt die Lokalisierung an die Innenseite der Zellmembran, was wiederum abhängig von einer postrationalen Modifikation, der Farnesylierung, ist. Der Einsatz des Farnesyltransferase-Inhibitors Tipifarnib zeigte einen guten Effekt in Gliommodellen, allerdings nur einen mäßigen Effekt in einer klinischen Phase II-Studie¹⁰⁵.

Insgesamt war die erste Generation klinischer Studien mit gezielten Therapien enttäuschend. Sehr selten konnte eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens erreicht werden. Um eine Anpassung des Tumors an die Behandlung mit einer einzelnen Substanz zu vermindern, werden daher vermehrt Kombinationstherapien mit etablierten und neuen Therapieoptionen in klinischen Studien evaluiert. Die Rolle von stammzellähnlichen Gliomzellen, die resistent gegen eine Vielzahl von Behandlungsmöglichkeiten sind, ist ebenfalls ungeklärt. Die Inhibition von typischen Stammzellfaktoren, wie Notch und Sonic hedgehog ist möglicherweise nötig, um diese Zellpopulation gezielt beeinflussen zu können^{101,106}.

1.2.3.4.2 Inhibierung der Angiogenese

Glioblastome gehören zu den am stärksten durchbluteten Tumoren und weisen häufig genetische Aberrationen auf, die zur Hochregulation proangiogener und zur Herunterregulation antiangiogener Faktoren führen^{107,108}. Proangiogene Faktoren wie VEGF, sind sehr häufig in GBM-Patienten hochreguliert und fördern die Vaskularisierung und die Proliferation von Endothelzellen¹⁰⁹. Daher werden verschiedene therapeutische Strategien erprobt, darunter die Inhibition von VEGF und dessen Rezeptor, Integrinantagonisten oder Endothelin Rezeptoren. Da VEGF ein wichtiger stimulatorischer Faktor für die Initiation der Angiogenese ist, verwundert es nicht, dass der Anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab der bisher erfolgreichste Ansatz ist. Bevacizumab zeigte eine vielversprechende Wirkung in GBM-Patienten mit Rezidiv in Kombination mit Chemotherapeutika^{110,111}. Allerdings zeigte sich bei ca. 20% - 30% der Patienten, dass die Therapie keine Wirkung zeigte und zudem in

einem viel invasiveren Wachstum des Tumors resultierte¹¹². Kombinationen von anti-VEGF und anti-invasiven Therapien werden zurzeit klinisch getestet.

1.2.3.4.3 Andere molekulare, zielgerichtete Therapien

Eine Reihe weiterer möglicher Ziele für die Behandlung maligner Gliome wurde identifiziert. Es gibt Hinweise, dass die epigenetische Regulation der Genexpression in malignen Gliomen gestört ist. Die epigenetische Deacetylierung von Histonen führt zu einer Kondensierung der DNA und damit zu einer reduzierten Expression der betroffenen Gene. Eine Inhibierung der Histon-Deacetylase (HDACs) könnte zu einer erhöhten Expression von Genen führen, die den Zellzyklusarrest fördern, die Zellproliferation einschränken, zur Differenzierung führen oder eine Apoptose induzieren^{113,114}.

Das Proteasom ist ein Proteinkomplex, der maßgeblich am Abbau anderer Proteine beteiligt und dadurch in viele zelluläre Vorgänge (z.B. Zellzyklus, Apoptose, Entzündungsreaktionen, Resistenz gegen Antineoplastische Therapien) involviert ist¹¹⁵. Der Inhibitor Bortezomib ist bereits für die Behandlung des multiplen Myeloms und Mantelzellymphomen zugelassen und bewirkt in Gliomzelllinien Zellzyklusarrest und Apoptose¹¹⁶. Allerdings musste eine Phase I/II-Studie wegen zu geringer Wirksamkeit vorzeitig abgebrochen werden¹¹⁷.

Aufgrund der biologische Diversität und Heterogenität verwundert es nicht, dass molekulare, zielgerichtete Therapien, die auf ein einzelnes Molekül abzielen, nicht ausreichen, um Patienten mit malignen Gliomen zu heilen¹¹⁸. Die Vorteile für Patienten sind überschaubar, die Effekte der zielgerichteten Therapien manchmal durchaus messbar, aber doch vorübergehend, trotz vielversprechender Daten *in vitro* und *in vivo*. Die hauptsächliche Ursache für die Entwicklung von Resistenzen gegen Medikamente, ist die große Heterogenität von soliden Tumoren. Hierdurch ergibt sich oft eine Redundanz bei der Signalverarbeitung, eine mehrfache Inaktivierung negativer Regulationsmechanismen oder eine Co-Aktivierung verschiedener Tyrosinkinasen (was wiederum zu einer Mehrfachaktivierung von Signalwegen führen kann). Daher wäre die gleichzeitige Inhibition mehrerer Wege (z.B. durch die Verwendung verschiedener Tyrosinkinaseinhibitoren) eine denkbare Option, die zurzeit in Studien getestet wird. Ein mögliches Hindernis bei der Kombination von zielgerichteten Wirkstoffen ist die additive Toxizität, welche die Dosis limitiert, die Patienten tolerieren können¹¹⁹. Auch die Verwendung von Inhibitoren mit verschiedenen Bindungsstellen gegen ein einzelnes, wichtiges Ziel (z.B. EGFR) wäre denkbar, da die Mutation mehrerer Bindungsstellen gleichzeitig relativ unwahrscheinlich ist. Allerdings besteht hier die Gefahr, Tumorzellen zu selektieren, die nicht von dem betroffenen Ziel abhängig sind.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Identifizierung von (Onko-)Genen, von denen Tumore abhängig sind, weiterhin eine entscheidende Rolle spielen wird. Die Identifikation

der spezifischen Onkogene in jedem Patienten wird angesichts der Heterogenität zwischen Tumoren notwendig sein. Da es auch eine große Heterogenität und u. U. eine klonale Entwicklung innerhalb eines GBM-Tumors gibt¹²⁰ und mit einer Biopsie oft nicht alle Mutationen erfasst werden können¹²¹, werden vermutlich neue, kosteneffektive Technologien (z.B. Exom-Sequenzierung) und das Targeting verschiedener, nicht-redundanter Ziele helfen, diese Schwierigkeiten zu überwinden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Medien für Bakterien

Tabelle 2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie/Reagenz/Medium	Hersteller
Aceglow ECL-Lösung	Peqlab
Acrylamid-Bis, 30 %	Roth
Adriamycin (Doxorubicin)	Sigma-Aldrich
Agarose	Invitrogen
Ampicillin	Sigma-Aldrich
BCNU	Sigma-Aldrich
Bradfordreagenz	Bio-Rad
BSA	Roth
Bromphenolblau	Roth
CHAPS	Roth
Chloroform	Sigma-Aldrich
Chloroquin-Diphosphat	Sigma-Aldrich
DEPC-Wasser	Invitrogen
DMEM+Glutamax	Invitrogen
DMSO	Sigma-Aldrich
dNTP Mix	Fermentas
EDTA	Sigma-Aldrich
Essigsäure (Eisessig)	Roth
Ethanol (EtOH)	Roth
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen
Glutaraldehyd (50%)	Roth
Glycin	Roth
Glycerin	Roth
Hämalaun nach Mayer	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Roth

Kaliumchlorid	Roth
LB-Agar	Roth
LB-Medium	Roth
Magermilchpulver	Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Methanol (MeOH)	J.T. Baker
M-MuLV	Fermentas
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydroxid	J.T. Baker
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich
Nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco
Oligo d(T) Primer	Invitrogen
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
PBS	Lonza
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Pharmalyte	GE Healthcare
Propidiumiodid	Invitrogen
Proteaseinhibitor	Sigma-Aldrich
Puromycin	Sigma-Aldrich
RNase A	Roth
RNaseOUT	Invitrogen
Ribolock	Fermentas
Rotiblock	Roth
Rotiszint eco plus	Roth
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich
SDS	Roth
SOC-Medium	Invitrogen
Spermin	Roth
Spermidin	Roth
SYBR Green PCR Master Mix	Finnzymes
TEMED	Roth
Temozolomid	Sigma-Aldrich
Tritiumspemidin	Perkin-Elmer
Tris Base	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
TriFast	Peqlab

Trypanblau	Biochrom
TritonX-100	Sigma-Aldrich
0,5 %Trypsin + EDTA	Gibco
Tween20	Roth
Urea	Sigma-Aldrich

2.1.2 Geräte und Materialien

Nicht aufgelistete Materialien und Geräte gehören zur Laborstandardausrüstung

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Geräte und Materialien.

Geräte/Materialien	Hersteller
Cryoröhrchen	Simport
CultureSlides, 4 Kammern	BD Biosciences
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences
Elektrophorese-Kammern	Biorad/Invitrogen
FUSION SL Advance™	Peqlab
Gel-Dokumentation Cabinet Eagle Eye II	Stratagene
GenePulser XCell	Biorad
Homogenisierer Omni TH	Omni International
Immobilon PVDF Membran	Millipore
Mastercycler Gradient	Eppendorf
Mikroplattenleser Wallac Victor	Perkin-Elmer
Mikroskop Zellkultur Axiovert 40C	Zeiss
Millipore Wasserbereiter	Millipore
Mineralöl	Roth
„Mr. Frosty“	Nalgene
Multi-Pipettor	Peqlab
Nanodrop, ND 1000	Eppendorf
Netzgerät PowerPac	Biorad
NuPage Polyacrilamidgele	Invitrogen
ProteanXL Size ExtraThick Blot Paper	Biorad
Realtime PCR-Cycler Mx3000P	Stratagene
Röntgenfilme	Thermo-Scientific
Röntgenkassette	Rego
TransBlot SemiDry-Blotter	Biorad
Tri-Carb 2900TR	Perkin-Elmer
Vi-cell XR	Beckman-Coulter
Zellkulturflaschen, verschiedene Größen	Sarstedt
Zellkulturschalen und Platten	Sarstedt
Zentrifuge 5810R	Eppendorf
Zentrifuge 5415C	Eppendorf
96-Loch-Platten	Sarstedt

2.1.3 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben wurde Millipore gefiltertes H₂O zum Ansetzen verwendet und die Lösungen bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
<u>Bakterienarbeiten</u>	
Resuspensionslösung	50 mM Glukose 25 mM Tris, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0 Lagerung bei 4°C
Alkalischer Lysepuffer	0,2 N NaOH 0,5% SDS
Präzipitationspuffer	25% 5M KAc 15% HCl
TE-Puffer	0,1 mM EDTA 10 mM Tris (pH 7,5)
<u>Molekularbiologie</u>	
50x TAE	242 g Tris-Base 57,1 ml Acetat 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) H₂O ad 1000 ml
<u>Proteinbiochemie</u>	
100% Trichloressigsäure (TCA)	40 g TCA 20 ml H₂O
0,5 M Tris, pH 6,8	50 mM DTT 6 g Tris-Base 60 ml H₂O pH 6,8 H₂O ad 100 ml

1,5 M Tris	27,23 g Tris-Base 80 ml H₂O ph 8,8 H₂O ad 100 ml
5x SDS-Laufpuffer	360 g Glycin 75 g Tris-Base H₂O ad 1000 ml
Äquilibrierungspuffer 1	0,375 M Tris-HCl (pH 8,8) 6 M Urea 20% Glyzerol (v/v) 2% SDS (w/v) 130 mM DTT
Aquilibrierungspuffer 2	0,375 M Tris-HCl (pH 8,8) 6 M Urea 20% Glyzerol (v/v) 2% SDS (w/v) 135 mM Iodacetamid
PBST	2000 ml PBS 1 ml Tween20
Ureapuffer	8 M Urea 2 M Thiourea 2% CHAPS 50 mM DTT
Semi-Dry Blottingpuffer	25 g SDS 5,82 g Tris-Base 2,93 g Glycin 1,90 ml 20%SDS 200 ml Methanol H₂O ad 1000 ml Lagerung bei 4°C

Zellysepuffer (RIPA)	150 µl 1 M NaCl 50 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,6) 50 µl 20%iges Nonident P40 (v/v) 25 µl 10% Na-Desoxycholat (v/v) 10 µl Proteaseinhibitor ad 1000 µl H ₂ O
<u>Zellzyklus, Apoptose und Seneszenz</u>	
DNA-Extraktionspuffer	192 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ 8 ml 0,1% Triton X-100 (v/v) pH 7,8
Propidiumiodidlösung	200 µg Propidiumiodid 1 mg RNase 10 ml PBS
Fixierlösung	0,25% Glutaraldehyd (250 µl) 2% Paraformaldehyd (1 g) PBS (pH 5,5; 50 ml)
20x Kaliumzyanid (KC)	820 mg K ₃ F(CN) ₆ 1050 mg K ₄ FE(CN) ₆ x 3H ₂ O 25 ml PBS
40x X-GAL	40 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-Galactosid 1 ml N,N-Dimethylformamid

2.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden, wenn möglich, mit Hilfe der Primer3-Software¹²² entworfen. Die Eigenschaften der Primer für die homologen Rekombinationen (insbesondere die Neigung zu Dimerbildung) wurde mit der Software Oligoanalyzer 1.2 (Freeware, T. Kuulasmaa, Universität Turku, Finnland) ermittelt.

2.1.5 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für Immunoblots und FACS-Anwendungen. Angegeben sind Zielprotein, Ursprungswirt, eingesetzte Verdünnung und Hersteller.

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus-HRP	Schaf	1:10000	GE Healthcare
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege	1:10000	Cell Signaling Technologies
Anti-eIF-5A	Kaninchen	1:5000	Novus
Anti-DHS	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz
Anti-DOHH	Kaninchen	1:1000	Eurogentec
Anti-p53	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz
Anti- p21 ^{Waf1/Cip1}	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technologies
Anti-AKT	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technologies
Anti-pAKT	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technologies
Anti-Rb	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technologies
Anti-pRB	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technologies
Anti-β-Tubulin	Maus	1:10000	Oncogene
Anti-active-Caspase3- PE	Maus	1:5	BD Pharmingen
IgG ₁ -PE Isotype Control			

2.1.6 Medien für die Zellkultur

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Zellkulturmedien und deren Zusammensetzung.

Lösung	Zusammensetzung
Gliommedium	Dulbeccos modified Eagle medium 4500 mg/L Glucose L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 1:100 Penicillin/Streptomycin 10% FCS
Astrozytenmedium	DMEM/F-12 4500 mg/L Glucose 1 mM L-Glutamin

	1 mM Natriumpyruvat 1:100 Penicillin/Streptomycin 20% FCS
DMEM Wachstumsmedium	Dulbeccos modified Eagle medium 4500 mg/L Glucose 1 mM L-Glutamin 1:100 Penicillin/Streptomycin 10% FCS (20% FCS für NHAs)
Einfriermedium	FCS 10% DMSO
DMEM-ES-Medium	Dulbeccos modified Eagle medium (25 mM HEPES) 15% FCS 2 mM L-Glutamin 0,1mM MEM 0,05 mg/mL Penicillin/Streptomycin Nukleosidmix (Adenosin 1,3µg/ml; Guanosin 1,37µg/ml; Cytidin 1,18µg/ml; Uridin 1,18µg/ml; Thymidin 0,38µg/ml) 1 mM Natriumpyruvat 100 µM 2-Mercaptoethanol 1000 U/ml ESGRO-LIF ggf. Selektionszusatz: 150 – 250 µg/ml G418
KSOM/HEPES-Medium, pH 7,4	95 mM NaCl 2,5 mM KCl 350 µM KH₄PO₄ 200 µM MgSO₄
Medium für MEF (Feeder Zellen)	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

2.1.7 Verwendete Zellen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und Primärzellen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Für die Kultivierung von ES-Zellen wurden zudem primäre murine, embryonale Fibroblasten (MEFs) als Feederzellen genutzt.

Tabelle 7: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zelllinien, sowie deren Nährmedien und Herkunft.

Zelllinie	Medium	Quelle
Phoenix Eco ϕ (Modifizierte HEK293T, stabil transfiziert mit zwei Plasmiden, die für MML-Virussequenzen für "gag", "pol" und "env" kodieren.)	DMEM	Universität Stanford (USA)
U87-MG (Adhärente humane Astrozytomzelllinie, isoliert aus einem Astrozytom WHO Grad IV. Relevante Mutationen: Deletierter Ink4Arf-Lokus)	Gliommedium	ATCC (Nummer: HTB-14)
G55T2 (Adhärente humane Astrozytomzelllinie, isoliert aus einem Astrozytom WHO Grad IV. Relevante Mutationen: Deletierter Ink4Arf-Lokus, p53-Punktmutation in der DNA-Bindungsdomäne)	Gliommedium	Neurochirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf; Westphal 1994
NHA (normale humane Astrozyten, Primäre, ausdifferenzierte Astrozyten aus humanem Hirngewebe)	Astrozytenmedium	Invitrogen (Darmstadt; N7805-100)
C57BL/6N JM8.F6-Zellen (Murine embryonale Stammzellen)	DMEM-ES-Medium	W. Skarnes, Wellcome Trust Sanger Institute, Kalifornien, USA

2.1.8 Mausstämme

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Mausstämme, Zweck ihrer Verwendung und Herkunft.

Name	Beschreibung	Herkunft
Balb/c	Spendertiere zur Gewinnung von Blastocysten-Spendertiere für die Injektion von ES-Zellen zur Etablierung einer Balb/c-chimären Maus	Versuchstierhaltung des UKE
C57Bl/6J	Zuchttiere für Überprüfung der Keimbahnübertragung bei chimären Böcken	Versuchstierhaltung des UKE
NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ	Auch bekannt als NOD scid gamma (NSG) Maus. Immundefiziente Maus ohne T-, B- und NK-Zellen. Zudem Deletion der IL2-Gamma-Kette. Benutzt für Xenograft-Implantationen von humanen Tumorzellen.	The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA)

2.1.9 Software

Für statistische Auswertungen und die Erstellung von Graphen wurde die GraphPad Prism 5.01 Software (GraphPad Software, La Jolla, USA) verwendet. Genexpressionsdaten wurden mit der MxPro (Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, USA) und Proteinexpressionen mit der Bio1D Software (Vilber Lourmat, Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland) ausgewertet. DNA-Sequenzanalysen wurden mit Vector NTI Advance (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Alle Abbildungen wurden mit Photoshop CS3 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA) und Corel Draw X5 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) erstellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Wenn nicht anders angegeben, wurden Zellen unter Standardbedingungen kultiviert (37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit). Abhängig von ihrer Teilungsgeschwindigkeit wurden Zellen bei einer Konfluenz von >80% passagiert. Hierfür wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit Trypsin (1 ml/10 cm Schale oder T25-

Kulturschflasche) abgelöst. Anschließend wurden sie mit Medium verdünnt und in der gewünschten Dichte ausgesät.

Einfrieren von Zellen

Zur Kryokonservierung von adhärennten Zellen wurden diese mit Trypsin abgelöst, in Medium aufgenommen und für 5 Minuten bei 450 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in kaltem Einfriermedium aufgenommen (1 ml/Röhrchen und ca. $1-2 \times 10^6$ Zellen) und in Cryoröhrchen überführt. Die Cryoröhrchen wurden bei -80°C in einer „Mr. Frosty“ Box platziert und dort für mindestens 12 Stunden abgekühlt. Anschließend wurden die Cryoröhrchen in der Gasphase von Flüssigstickstoff gelagert.

Auftauen von Zellen

Zellen wurden in der Gasphase von flüssigem Stickstoff (oder kurzfristig bei -80°C) gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen möglichst schnell in einem 37°C warmen Wasserbad angetaut, jedoch nicht vollständig aufgetaut, um zytotoxische Effekte durch das DMSO im Einfriermedium zu verhindern. Der angetauten Zellsuspension wurde 1 ml vorgewärmtes Wachstumsmedium (abhängig vom Zelltyp) zugefügt. Die Suspension wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 10 ml Medium überführt und die Zellen bei 1000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden in 10 ml frischem Medium resuspendiert und in eine T75-Zellkulturflasche oder eine 10 cm Zellkulturschale gegeben.

2.2.2 Zellviabilität, Apoptose und Seneszenz

2.2.2.1 Proliferations- und Vitalitätsbestimmungen

Der Einfluss einer Inhibierung der Desoxyhypusinsynthese durch den Inhibitor GC7 auf die Proliferation und Viabilität von Glioblastomzelllinien und primäre Astrocyten wurde mittels Trypanblaufärbung in einem ViCell-Zellzählgerät ermittelt. Diese Parameter wurden analog ebenfalls für Glioblastomzellen bestimmt, in denen die DHS-mRNA mittels „small hairpin RNAs“ (shRNAs) herunterreguliert wurde. Zu Beginn wurden 4×10^4 Zellen/Vertiefung in einer 12er-Platte ausgesät. Nach 12-stündiger Inkubation wurden die zu testenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen zugegeben (Tabelle 9). Als Lösemittelkontrollen wurden H_2O (GC7), DMSO (DHSI-15, TMZ, Doxorubicin) und 50% EtOH in Wasser (BCNU) verwendet. Nach 48 und 72 Stunden wurden Zellzahl und –viabilität bestimmt. Hierfür wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 500 μl PBS/Vertiefung gewaschen und mit 300 μl Trypsin/Vertiefung bei 37°C für zwei Minuten abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit 300 μl Medium/ Vertiefung verdünnt und die gesamten 600 μl in einen Probenbecher gegeben.

Die Messung erfolgte mit der Standardeinstellung für CHO-Zellen (min./max. Durchmesser = 6 µm/50 µm; 50 Aufnahmen pro Probe). Pro eingesetzter Konzentration/shRNA-Zelllinie wurden Triplikate gemessen und ein Mittelwert aus den Triplikaten gebildet. Im Falle der shRNA-transduzierten U87-MG und G55T2 Zelllinien wurde die Zellzahl und Viabilität nach 24, 48, 72 und 120 Stunden bestimmt.

Tabelle 9: Konzentrationen, Lösungsmittel und Inkubationszeiten der verwendeten, niedermolekularen Substanzen.

Substanz	Konzentrationen	Lösungsmittel	Inkubationsdauer
BCNU	10 µM, 50 µM	50% EtOH	2 – 5 Tage
DHSI-15	2 – 8 µM	DMSO	2 – 7 Tage
Doxorubicin	0,5 µM	DMSO	2 Tage
GC7	10 – 100 µM	H₂O	2 – 5 Tage
TMZ	150 µM, 200 µM	DMSO	2 – 5 Tage

2.2.2.2 Zellzyklusanalysen und Bestimmung nekrotischer/apoptotischer Zellen mittels Propidiumiodidfärbung

Propidiumiodid (PI) ist eine interkalierende, fluoreszierende Substanz. Die Menge an interkaliertem PI korreliert mit der DNA-Menge in einer Zelle. Mittels Durchflusszytometrie („fluorescence activated cell sorting“; FACS) kann daher der Zellzyklus anhand der DNA-Menge bestimmt werden. Nekrotische und apoptotische Zellen sind hingegen durch den Verlust von intakter und der Akkumulierung von fragmentierter DNA gekennzeichnet. Für PI-Färbungen wurden G55T2 und U87-MG Zellen, wie in 2.2.2 beschrieben mit den entsprechenden Substanzen inkubiert. Für die Fixierung der Zellen und die Färbung wurde das Protokoll von Riccardi und Nicoletti verwendet¹²³. $1 - 2 \times 10^6$ Zellen wurden mit je 5 ml kaltem PBS gewaschen und in 500 µl PBS resuspendiert. Dann wurden je 4,5 ml kaltes 70% Ethanol in PBS zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann für mindestens 12 Stunden bei -20°C fixiert, konnte so aber auch bis zu vier Wochen gelagert werden. Nach der Fixierung wurden die Zellen bei 400x g herunterzentrifugiert und mit je 5 ml PBS gewaschen. Die genomische DNA wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) mit DNA-Extraktionspuffer aus dem Zellkern gelöst, damit das PI einen besseren Zugang hat. Nach Zentrifugation bei 400x g für 5 Minuten wurde der Extraktionspuffer abgenommen und die Zellen in 1 ml PI-Färbelösung resuspendiert, in ein FACS-Röhrchen überführt und für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte am FACSCalibur im FL3-A Kanal (linear für die Zellzyklusanalyse und exponentiell für die Detektion von apoptotischen/nekrotischen Zellen). FL3-A wurde über FL3-W aufgetragen, um Einzelzellen von Doubletten zu unterscheiden.

2.2.2.3 TdT-vermittelte dUTP DNA-Strangbruchfärbung (TUNEL)

Für die mikroskopische Bestimmung apoptotischer Zellen wurde die enzymatische Anfärbung von apoptosespezifischer DNA-Einzelstrangbrüche (*In Situ* Cell Death Detection Kit, POD von Roche) verwendet. Bei dieser Methode werden DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche, die während der frühen Apoptose entstehen, durch die terminale Desoxyribonukleotidyltransferase mit Fluorescein-markierten Nukleotiden versehen. Diese modifizierten Nukleotide werden durch einen Antikörper markiert, der wiederum an eine Meerrettichperoxidase (POD) gekoppelt ist. Die POD katalysiert die Umsetzung eines künstlichen Substrates und das Produkt dieser Reaktion ist ein roter Farbstoff, der lichtmikroskopisch detektiert werden kann.

In je eine Kammer eines 4-Kammer-Kulturobjektträgers wurden 1×10^4 U87-MG- oder G55T2-Zellen ausgesät. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit 50/100 μM GC7, bzw. für 12 Stunden mit 500 nM Doxorubicin (als Positivkontrolle) behandelt. Das GC7 wurde täglich frisch zu den Zellen gegeben. Nach 72 Stunden wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen, für 20 Minuten mit 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert und anschließend für 10 Minuten mit 3% H_2O_2 /Methanol blockiert. Nach einem weiteren Waschschriff wurden die Zellen mit 0,1% Triton X-100/0,1% Natriumcitrat für 2 Minuten auf Eis permeabilisiert. Die DNA-Strangbrüche wurden nach Herstellerangaben gefärbt und die Zellkerne mit Hämalaun (pur) für 45 Sekunden gegengefärbt. Die Objektträger wurden abschließend drei Mal in Ammoniak getaucht und zwei Mal für je 2 Minuten mit H_2O gewaschen. Danach erfolgte die lichtmikroskopische Auswertung.

2.2.2.4 Bestimmung aktiver Caspase-3 (späte Apoptose)

$0,5 - 1 \times 10^6$ Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, zwei Mal mit PBS gewaschen und mit 5 ml 2% Paraformaldehyd (PFA, pH 7,4) bei 37°C für 10 Minuten und einer Minute auf Eis fixiert. Nach Zentrifugation (450x g/5 Min.) wurde das PFA abgenommen, die Zellen in 5 ml 90% MeOH/PBS für 30 Min. bei 4°C und dann für mindestens 12 Stunden bei -20° gelagert. Für die Immunofärbung wurde das MeOH abzentrifugiert (500x g, 5 Min.), das Zellpellet in 500 μl 0,5% BSA in PBS gewaschen und die Zellen letztlich in 50 μl 0,5% BSA in PBS für 10 Min. bei RT blockiert. Die aktive Form der Caspase-3 wurde mit PE-gekoppeltem anti-Caspase-3 Antikörper für eine Stunde bei RT angefärbt. Als Isotypkontrolle wurde PE-gekoppeltes IgG1 verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit 500 μl 0,5% BSA in PBS gewaschen und das Zellpellet für die Messung am FACS in 300 μl PBS aufgenommen. Die PE Fluoreszenz wurde im logarithmischen FL2-Kanal am FACSCalibur gemessen.

2.2.2.5 Detektion von seneszenzassoziierter β -Galactosidaseaktivität

Die Aktivität von seneszenzassoziierter, lysosomaler β -Galactosidase wurde nach einem modifizierten Protokoll von Schmitt et al.¹²⁴ ermittelt. 2×10^4 Zellen (Kontrolle) oder 4×10^4 (für

die GC7-Behandlung) wurden in einer 12-Loch Platte ausgesät und für 48 Stunden mit 100 μM GC7 behandelt. Das GC7-haltige Medium wurde täglich ersetzt. Nach der Behandlung wurden die Zellen 2x für 3 Minuten mit PBS/MgCl₂ gewaschen und nach Zugabe von 1 ml Fixierlösung für 10 Minuten bei RT fixiert. Die Fixierlösung wurde verworfen und die Zellen 2x 3 Minuten mit PBS/MgCl₂ gewaschen. Von der 1x X-Gal Lösung (9,3 ml PBS/MgCl₂, 0,5 ml 20x KC, 0,25 ml X-Gal pro 10 ml Lösung) wurde je 1 ml/Vertiefung auf die Zellen gegeben. Die Platte wurde mit Parafilm versiegelt, mit Aluminiumfolie, zum Ausschluss des Lichts, umhüllt und für 12 Stunden – 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Die exakte Färbedauer war dabei von der Farbintensität abhängig. Die Färbung wurde durch Verwerfen der X-Gal Lösung und Zugabe von PBS/MgCl₂ gestoppt. Der Anteil der gefärbten Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl wurde unter dem Mikroskop ermittelt. Die Ansätze wurde in Triplikaten angefertigt und ausgezählt.

2.2.2.6 Lentivirale Transduktion von G55T2- und U87-MG-Zellen

Lentiviralen Vektoren (pLKO.1-puro), die „small hairpin“-RNAs (shRNAs) gegen eIF-5A, wurden von Sigma-Aldrich gekauft (MISSION shRNA Klone TRCN0000062551, TRCN0000062552, TRCN0000062548, TRCN0000062549, TRCN0000062550). pLKO.1-puro-Vektoren mit shRNAs gegen DHS wurden von Dr. Jan Chemnitz (Heinrich Pette Institut, Hamburg) zur Verfügung gestellt. G55T2- und U87-MG-Zellen wurden lentiviral mit diesen Vektoren transduziert. Die viralen Vektoren pMDLg/pRRE (Gag/Pol), pRSV-Rev (Rev) and phCMV-VSV-G (Envelope) wurden für die Produktion letiviraler Partikel verwendet¹²⁵.

Kalziumphosphattransfektion von HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen (5x 10⁶/10 cm Schale) wurden am Vorabend ausgesät. 20 μg letivirale(s) Plasmid(e), 10 μg pMDLg/pRRE, 5 μg pRSV-Rev, 2 μg phCMV-VSV-G wurden in einem FACS-Röhrchen mit 62,5 μl 2M CaCl₂ gemischt und mit H₂O auf 500 μl aufgefüllt. 500 μl 2x HBS-Puffer wurden, bei ständiger Luftzufuhr durch eine Pasteurpipette, tropfenweise zugegeben und die Lösung für 20 Minuten bei RT inkubiert. Die HEK293T-Zellen wurden mit 10 ml frischem Medium (+ 25 μM Chloroquin in PBS) überschichtet und das DNA-Präzipitat tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 6 – 12 Stunden wurde das Medium durch 5 ml frisches ersetzt.

Transduktion der Zielzellen

1x 10⁶ G55T2- oder U87-MG-Zellen wurden am Tag der Transfektion ausgesät. Nach 24 Stunden Virusproduktion wurde der erste Überstand der HEK293T-Zellen, welcher Viruspartikel enthält, durch einen 0,45 μm Spritzenfilter passagiert und direkt auf die Zielzellen gegeben. 1/1000 Volumen Polybren (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) diente als Infektionsverstärker. 5 ml frisches Medium wurden auf die HEK293T-Zellen gegeben und nach weiteren 24 Stunden

wurde der zweite Überstand, wie oben beschrieben auf die Zielzellen gegeben. Nach insgesamt 48 Stunden Transduktion wurde frisches Medium auf die Zielzellen gegeben und nach weiteren 24 Stunden die Puromycinselektion mit 2,5 µg/ml für 48 Stunden durchgeführt. Als Selektionskontrolle dienten nicht transduzierte G55T2, bzw. U87-MG.

2.2.3 Proteinbiochemie

2.2.3.1 SDS-Page (nach Laemmli) und Western blot

Zelllyse

Nahezu konfluente (> 80%) Zellen in einer 6-Loch-Platte oder 10 cm-Schale wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und mit dem 10-fachen Volumen Medium verdünnt. Die Zellen wurden herunterzentrifugiert (450x g, 5 Minuten) und das Pellet 1x mit PBS gewaschen und dann in RIPA-Puffer (ca. 1 ml/1x 10⁷ Zellen) resuspendiert. Das Volumen des RIPA Die Zellen wurden für 10 Minuten auf Eis lysiert und dabei ca. alle drei Minuten gevortext. Zelltrümmer wurden herunterzentrifugiert (20.800x g, 10 Minuten bei 4°C) und das geklärte Lysat bei -80°C gelagert.

Proteinbestimmung

Der Proteingehalt in einem Zelllysate wurde mit der BCA-Methode nach Smith et al.¹²⁶ bestimmt. Hierfür wurde der colormetrische BCA Protein Assay (Thermo-Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. 10 µl Lysat (1:10 mit RIPA-Puffer verdünnt) wurden mit 200 µl Reagenz in einer 96-Loch-Platte gemischt und bei 37°C für 30' inkubiert. Die Färbung der Probe wurde bei 562nm in einem Mikroplattenleser quantifiziert. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Als Standard wurde BSA verwendet. Anhand dieses Standards wurde eine Eichgrade erstellt, anhand derer der Proteingehalt in den Probengehalten absolut quantifiziert werden konnte.

SDS-Page

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden 12% Polyacrylamidgele verwendet. Die Glasplatten wurden im Gießstand angebracht und das Trenngel (10 ml) aus folgenden Lösungen gemischt:

- 3,35 ml H₂O
- 4 ml 30% Acrylamid
- 2,5 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8)
- 50 µl 20% SDS
- 50 µl 10% APS
- 10 µl TEMED

Das Gemisch wurde zwischen die Glasplatten gegossen, mit 1 ml Isopropanol überschichtet, bis es nach ca. 20 Minuten polymerisiert war. Das Sammelgel (4%, 5 ml) wurde zwischenzeitlich angesetzt:

- 3,05 ml H₂O
- 0,66 ml 30% Acrylamid
- 1,25 ml 0,5M Tris-HCl (pH 6,8)
- 25 µl 20% SDS
- 5 µl TEMED

Nach Entfernung des Isopropanols und Spülung des Trenngels mit Wasser, wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Taschenkamm eingefügt (10 Taschen, 1,5 mm Dicke). Nach 20' wurde das Gel in die Laufkammer gesetzt und diese mit Laufpuffer gefüllt.

Probenvorbereitung

5x Ladepuffer und 20x Denaturierungszugabe (beides von Fermentas, St. Leon-Roth) wurden mit dem gewünschten Volumen an Proteinlysat gemischt und mit RIPA-Puffer auf das gewünschte Volumen (10 – 50 µl) aufgefüllt. Das Gemisch wurde für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht, um die Proteine zu denaturieren und danach auf Eis gelagert.

Gellauf

Nach Beladung des Gels wurden die Taschen mit einem vorgefärbten Proteinstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas, St. Leon-Roth, 10 µl) bzw. 5x Ladebuffer (entsprechend der Menge in den Proben) beladen. Die SDS-Page wurde bei 80V gestartet, bis die Lauffront das Trenngel erreicht hat. Dann wurde eine Spannung von 120V angelegt, bis die Proteine die gewünschte Auftrennung erreichten.

„Semi-Dry“-Blotten

Zum Blotten der aufgetrennten Proteine wurden zwei extradicke Whatmanpapiere und eine PVDF-Membran in Größe des Gels zurechtgeschnitten. Die Membran wurde durch Inkubation in MeOH für 30 Sekunden aktiviert und dann für 2 Minuten in H₂O gewaschen. Die Whatmanpapiere, die Membran und das Gel wurden in Transferpuffer äquillibriert und der Blot wie folgt zusammengestellt:

- Kathode
- Whatmanpapier
- Gel
- Membran
- Whatmanpapier
- Anode

Luftblasen wurden herausgepresst und die Proteine bei 60 mA/Gel für 60 Minuten auf die Membran transferiert.

Immunfärbung von Proteinen

Die Membran wurde nach dem Blotten für 60 Minuten bei RT oder über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (verdünnt in 5% BSA/PBST) inkubiert. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (verdünnt in PBST) erfolgte für 60 Minuten bei RT. Nach den Inkubationsschritten wurde die Membran jeweils 3x für 5-10 Minuten mit PBST gewaschen. Nach Inkubation für 60 Sekunden mit ECL-Lösung (je 600 µl Luminol- und H₂O₂-Lösung), konnte die emittierte Biolumineszenz, mittels einem CCD-Kamera basierendem Detektionssystem, aufgenommen und analysiert werden.

2.2.3.2 2D-Western blot

Hypusiniertes eIF-5A kann von solchem ohne Hypusin anhand eines unterschiedlichen isoelektrischen Punktes (PI) unterschieden werden. Diese Unterscheidung wurde mit einem 2-dimensionalen (2D) Western-blot realisiert. Hierfür wurden 25 µg Proteinlysate mit

Ureapuffer auf 120 µl aufgefüllt. Für die erste Dimension wurden IPG-Streifen (7 cm, pH 7-14, GE Healthcare) mit der verdünnten Proteinlösung über Nacht rehydriert. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte mit den Parametern: 30 Minuten bei 500V, 5000 Vh lineare Fokussierung, gefolgt von 5000 Vh "schnelle" Fokussierung bei 5000 V und bis zu zwei Stunden Lagerung bei 500 V. Nach der Fokussierung wurden die Streifen in Äquilibrationpuffer 1 und 2 für je 15 Minuten inkubiert. Für die zweite Dimension wurden die Streifen auf ein 12%iges SDS-Gel aufgebracht, mit 0,5% Agarose (versetzt mit Bromophenolblau als optischer Marker) überschichtet und die Proteine bei 120 V aufgetrennt. Die Blot-Prozedur und Immunfärbung von eIF-5A wurde, wie in 2.2.3.1 beschrieben, durchgeführt.

2.2.3.3 ³H-Spermidin Einbau

eIF-5A1 und eIF5A2 sind die einzigen bekannten Proteine, die einen, aus Spermidin abgeleiteten, Aminobutylrest in Form von Hypusin einbauen. Wie bereits beschrieben¹²⁷, kann dies genutzt werden, um die Hypusinerung durch metabolische Markierung mit ³H-Spermidin zu analysieren und quantifizieren. Hierfür wurden 2,5x 10⁶ U87-MG- oder G55T2-Zellen/10 cm Schale ausgesät und mit 25 µCi ³H-Spermidin für 48 Stunden inkubiert und Proteinlysate präpariert (siehe 2.2.3.1). 200 µg Protein wurden durch die Zugabe von einem Volumenteil 100% Trichloressigsäure (TCA) zu 9 Teilen Lysat, mit anschließender Inkubation bei -20°C für 5 Minuten und 15 Minuten bei 4°C, ausgefällt. Proteine wurden durch Zentrifugation (5 Minuten bei 16000x g) herunterzentrifugiert und das Pellet zwei Mal mit 10% TCA (mit 1 mM Spermidin und Spermin) gewaschen. Um eine bessere Entfernung von überschüssigem ³H-Spermidin zu gewährleisten wurde das Pelletes in 100 µl 1N NaOH (mit 1 mM Spermidin und Spermin) resuspendiert und durch Zugabe von 1 ml 10% TCA repräzipitiert. Die Radioaktivität im Überstand (überschüssiges ³H-Spermidin) wurde mit einem Flüssigszintillationszähler (Tri-Carb 2900TR) bestimmt. 100 µl Überstand wurden in ein Szintillationsröhrchen gegeben, 3 ml Szintillationscocktail zugefügt und die Proben für 10 Minuten im entsprechenden Tritiummessprogramm gemessen. Die Waschschrte wurden wiederholt, bis die Aktivität im Überstand <200 dps (Zerfälle/Sekunde) betrug. Nach Resuspendierung des Proteinpellet in 100 µl 1N NaOH wurde die Aktivität wie oben beschrieben gemessen.

2.2.4 *In vivo* Experimente

Zur Etablierung eines möglichen *in vivo*-Behandlungsschemas für die Validierung der Wirkung von GC7 (stellvertretend für Hypusinierungsinhibitoren im Allgemeinen) auf GBM-Zellen in Mäusen, wurde eine Versuchsreihe mit subkutan injizierten Zellen durchgeführt. Hierbei sollte eine erste Abschätzung der zu verwendenden Dosis GC7 in Korrelation mit Verträglichkeit für den Organismus und Wirkung auf die Tumorzellen vorgenommen werden.

Subkutane Injektion der G55T2-Zellen und Überwachung des Tumorwachstums

Die G55T2-Zellen wurden 1:10 verdünnt und für zwei Tage in 2 T75-Flaschen inkubiert. Die Zellen wurden abtrypsinisiert, einmal mit 10 ml PBS gewaschen, in serumfreiem Medium resuspendiert und durch ein 10 µm Zellsieb filtriert, um Zellklumpen zu entfernen. Die Konzentration wurde auf 10^6 Zellen/200 µl eingestellt. NSG-Mäuse (13 Tiere) mit einem Alter von 11 Wochen wurden für die Injektion verwendet. Die Tiere wurden gewogen und farblich markiert. Dann wurde je 200 µl Zellsuspension subkutan in den vorderen Rückenbereich injiziert. Der Verlauf des Tumorwachstums, Gewichtsveränderungen und der allgemeine Zustand wurden alle zwei bis drei Tage dokumentiert.

Behandlung mit GC7

Bei einem Tumordurchmesser von ca. 2 mm wurde mit der GC7-Behandlung begonnen. GC7 wurde in steril in PBS gelöst. Die Tiere bekamen das GC7 täglich intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die verwendeten Dosen betragen 0,1 mg, 0,15 mg und 0,2 mg (in einem Volumen von 100 µl, 150 µl bzw. 200 µl. Dies entspricht 4/6/8 mg/Kg Körpergewicht. Als Kontrolle wurden 200 µl steriles PBS verabreicht. Jede Gruppe bestand aus drei Tieren und die Behandlungsdauer betrug sieben Tage. Die Dosis wurde anhand der Arbeiten von Robbins *et al.* gewählt, die in einem Diabetis-Mausmodell die Wirkung von 0,1 mg GC7 i.p. täglich auf die endogene DHS nachweisen konnten⁷⁴.

Präparation der Tumore

Am Ende der GC7-Behandlung wurden die Mäuse mit einem O₂/CO₂-Gemisch betäubt und dann durch das Einleiten von CO₂ geopfert. Die Haut um den Tumor wurde aufgeschnitten und das Häutchen, das den Tumor einkapselt, durchtrennt und der Tumor entnommen. Nach Fotografie, Vermessung und Gewichtsbestimmung wurde jeder Tumor in der Mitte geteilt und die eine Hälfte in ein 15-ml Röhrchen mit 5 ml 4% Formaldehyd gegeben und die andere Hälfte in Cryoröhrchen überführt und in Flüssigstickstoff eingefroren. Das in Formaldehyd fixierte Gewebe wurde bei 4°C gelagert.

Vorbereitung der eingefrorenen Tumore für 2D-Western Blots

Die Tumore wurden in je ein 15-ml Röhrchen (gefüllt mit je 1 ml Ureapuffer) gegeben, anschließend auf niedriger Stufe mit einem Homogenisator zerkleinert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 Minuten bei 20.800x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und bei -80°C gelagert.

2.2.5 Molekularbiologische Methoden

2.2.5.1 RNA-Isolation

Es wurden nur RNase-freie Reagenzien und Materialien verwendet. Für die Verdünnung von Ethanol und die Lösung der RNA wurde nur DEPC H₂O benutzt.

Für die RNA-Isolation aus Zellen wurde das TriFast-Reagenz verwendet. Zellen wurden pelletiert (450x g bei RT für 5 Minuten) und die Zellen in TriFast (ca. 1 ml/1x 10⁶ Zellen) resuspendiert. Die Suspension wurde für 15 Sekunden gevortext und für 3' bei RT inkubiert. Proteine und RNA wurden durch Zentrifugation für 15 Minuten (20.800x g/4°C) getrennt und die RNA in der oberen wässrigen Phase anschließend in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Für die RNA-Präzipitation wurden 500 µl Isopropanol zugegeben, für 10' bei RT inkubiert und die RNA für 15 Minuten herunterzentrifugiert (20.800x g/4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Nach der Zentrifugation für 10' wurde der Überstand verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet, bis das Ethanol komplett verdunstet war. Die RNA wurde in 30 – 50 µl DEPC H₂O gelöst (Inkubation bei 55°C für 10 Minuten). Die RNA-Konzentration wurde photometrisch am Nanodrop bestimmt und die RNA bei -80°C gelagert.

2.2.5.2 cDNA-Synthese für PCRs und qPCRs

Die Umschrift der isolierten RNA in cDNA erfolgte mit der M-MuLV reverse Transkriptase. 1 µg RNA wurde mit 1 µl Oligo-dT-Primern (0,5 µg), 4 µl 5x Reaktionspuffer, 0,5 µl Ribolock und 2 µl dNTPs (10 mM) gemischt und mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die cDNA wurde für 60 Minuten bei 37°C synthetisiert und anschließend die Reaktion für 10 Minuten bei 70°C gestoppt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für eine möglichst fehlerfreie Amplifikation von Homologiearmen für die homologe Rekombination und die Klonierung von cDNAs/Sonden für Southern Blots wurde die

Komponente	Volumen
5x HF-Puffer	10 µl
10 mM dNTPs	1 µl
Primer A	1 µl
Primer B	1 µl
Template DNA	x µl
Polymerase	0,2 – 0,5 µl
H₂O	ad. 50 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Phusion-Polymerase (Fynnzymes) verwendet, die über einen „proof reading“ Mechanismus verfügt. Die Komponenten für die PCR-Reaktionen wurden, wie unten angegeben, gemischt. Die Menge an eingesetzter DNA und Polymerase hingen von der DNA Konzentration, dem jeweiligen Produkt (Expressionstärke, Effizienz der Amplifikation usw.) ab und wurde empirisch ermittelt. Pro Reaktion wurden 50 – 200 ng DNA eingesetzt.

Die Annealingtemperatur jedes Primerpaares wurde zuvor bioinformatisch ermittelt und das PCR-Protokoll entsprechend angepasst.

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	30s	1
Denaturierung	98°C	10s	30
Annealing	x°C	20s	30
Elongation	72°C	30s/kb	30
Finale Elongation	72°C	10'	1
Lagerung	4°C	∞	1

2.2.5.4 Quantitative PCR (qPCR)

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	7'	1
Denaturierung	95°C	10s	40
Annealing/Elongation	60°C	15s	40
Terminale Denaturierung	95°C	1'	1
Schmelzkurve	55 - 95°C	30s/°C	1

Für quantitative PCRs wurde das DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit (Fynnzymes) genutzt. Es basiert auf dem interkalierenden Effekt von SYBR Green mit der amplifizierten DNA. Es wurden vorgefertigte, validierte Primerpaare verwendet (Qiagen, eIF-5A: QT00099911; eIF-5A2: QT00031283; DHS: QT00013888; DOHH: QT00235536). Als Referenzgen diente RPLP0 („ribosomales Protein, large“, P0; QT01839887). 10 µl Reaktionspuffer, 2 µl Primer, 0,03 µl 50x ROX Referenzfarbstoff und 1 µl cDNA (entspricht etwa 50 ng) wurden in einer Vertiefung einer 96-Loch-Platte gemischt und mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Für jedes Primerpaar wurde zudem je ein Ansatz ohne cDNA als Kontaminationskontrolle angesetzt („Non template control“).

2.2.5.5 Restriktionsverdau von DNA

DNA wurde mit Restriktionsenzymen für die Präparation von DNA-Produkten und Plasmiden, sowie für die Validierung von Klonierungen und Rekombinationen verdaut. Die Restriktionsverdauungen wurden wie unten angegeben angesetzt und für 10 – 60 Minuten bei 37°C oder 30°C (je nach Restriktionsenzym) inkubiert. Für die Präparation von PCR-Produkten und Vektoren wurden 5 – 10 µg und analytische Zwecke 0,5 µg DNA verwendet.

Komponente	Volumen
10x FastDigest	3 µl
Puffer	ad. 30 µl
H ₂ O	x µl
DNA (0,5 – 10 µg)	0,5 µl
Restriktionsenzym	

Der gesamte Ansatz wurde für die Agarosegelelektrophorese eingesetzt und ggf. die gewünschte Bande präpariert (siehe 2.2.5.7.1).

Für die Entfernung von Plasmid-DNA aus PCR-Ansätzen für die Elektroporation in *E.coli*, wurden die jeweiligen PCR-Ansätze mit *DpnI* verdaut. Hierfür wurde der komplette PCR-Ansatz mit der

entsprechenden Menge 10x FastDigest Puffer und 1 µl *DpnI* versetzt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die PCR-Produkte wurden dann mittels Säulen aufgereinigt (siehe 2.2.5.7.1) und mit 30 µl H₂O eluiert.

2.2.5.6 Fällung von DNA

DNA, wie PCR-Produkte und Plasmide, wurden mittels Ethanol-Präzipitation ausgefällt. Hierfür wurde der zu fällenden DNA 1/10 Volumen 3 M-Natrium-Acetat (pH 7) und drei Volumen absoluter Ethanol hinzugefügt. Anschließend wurde für mindestens 10 Minuten bei -80°C gefällt und für 10 Minuten zentrifugiert (20800 x g, 20 Minuten, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei 37°C (unsteril) oder an der Luft unter der Sterilbank getrocknet (z.B. für die Transfektion von Zellen). Die gefällte DNA wurde dann in dem benötigten Volumen ddH₂O aufgenommen. Aufgereinigte PCR-Produkte wurden, wenn nicht anders angegeben, in 5 µl ddH₂O und Plasmide in 30 µl ddH₂O aufgenommen.

2.2.5.7 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA verwendet. Für die Beladung wurde der DNA eine 6x konzentrierte Ladelösung zugefügt (6x DNA Loading Dye, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland, Abb.: 4). Je nach Größe der zu erwartenden DNA-Fragmente, erfolgte eine Auftrennung in 1- oder 2%igen TAE-Agarosegelen mit einer Spannung von ca. 5V/cm Gellänge. Zur Färbung der DNA erfolgte der Zusatz von 1 µl Ethidiumbromid pro 50 ml Gelvolumen (= 0,2 µg/ml) nach Aufkochen der Agarose.

2.2.5.7.1 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolation von DNA aus Agarosegelen wurde das "NucleoSpin® Extraction Kit" von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) oder das „GeneJET Gel Extraction Kit“ von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

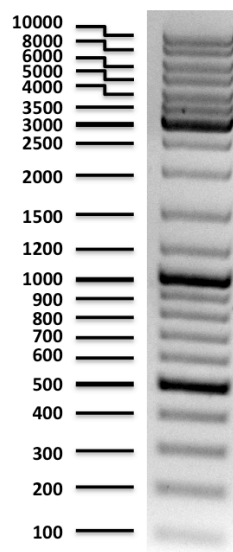


Abb.: 4 Verwendete DNA-Leiter mit Angabe der Bandengröße in Basenpaare (100 - 10.000 bp). DNA-Leiter peqGold von Pqlab (Erlangen, Deutschland). 5 μ l DNA-Leiter aufgetrennt in einem 1% Agarosegel und angefärbt mit Ethidiumbromid.

Das gewünschte Fragment wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 312 nm mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und gewogen. Das gleiche Volumen Gellysepuffer (enthält Guanidiniumthiocyanat) wurde zum Gelstück gegeben und bei 55°C erwärmt, bis das Gel vollständig aufgelöst war. Im Anschluss wurde die DNA auf die Silica-Membran aufgegeben und durch Zentrifugation (1 Minute, 11.000 x g) an die Membran gebunden. Darauf wurde die DNA mit Waschpuffer (enthält 96-100%iges Ethanol) gewaschen, die Membran durch nochmalige Zentrifugation getrocknet und die DNA in 15-50 μ l Elutionspuffer (5 mM Tris-HCl, pH 8,5) eluiert.

2.2.6 Bakterielle Arbeiten

2.2.6.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Für die hier beschriebenen bakteriellen Arbeiten wurden *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm DH5a (Invitrogen) verwendet.

Kultivierung in Flüssigmedium

20 g LB-Medium in Pulverform wurden in 800 ml H₂O suspendiert und autoklaviert. Für Plasmidpreparationen in kleinem Maßstab (Minipreps) wurde *E. coli* in 2 ml LB-Medium angeimpft. Je nach Selektionsmarker wurde das entsprechende Antibiotikum in der angegebenen Konzentration zugesetzt (siehe Tabelle 4). Die Inkubation erfolgte, wenn nicht anders angegeben, für 10 - 14 Stunden bei 37°C in einem Schüttelinkubator (250 rpm).

Für Plasmidpreparationen in großem Maßstab (Maxipreps) wurden *E. coli* in 250 ml LB-Medium, mit den entsprechenden Antibiotika, in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben angeimpft und wie oben beschrieben inkubiert.

Kultivierung auf Agarplatten

LB-Agar wurde mit H₂O gemischt (25g/L) und autoklaviert. Der sterile LB-Agar wurde, wenn er nach dem Autoklavieren nicht direkt verwendet wurde, bei 4°C gelagert. Zum Gießen von LB-Agarplatten wurde der feste LB-Agar in einer Mikrowelle erhitzt, bis keine festen

Tabelle 10: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antibiotika zur Kultivierung von *E.coli*. Angegeben sind Bezeichnung und ihre eingesetzten Endkonzentrationen.

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	50 µg/ml
Tetracyclin (Tet)	3 µg/ml
Carbenicillin (Cb)	100 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	15 µg/ml

Bestandteile mehr übrig waren. Nach dem Abkühlen auf Handtemperatur wurden Antibiotika zugegeben (Konzentrationen siehe Tabelle 10) und der LB-Agar in die Kulturschalen gegossen (ca. 15 - 20 ml/Schale). Nach einer Trockenzeit von einer Stunde wurden die LB-Agarplatten verwendet oder bei 4°C gelagert.

Transformierte *E. coli* wurden in die Mitte einer Agarplatte gegeben und mit einem Drigalskispatel gleichmäßig

verteilt. Anschließend wurden die Agarplatten über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.6.2 Transformation von *E. coli*

E. coli DH5α wurden mit Plasmiden (0,5 µl) und klonierten Vektoren (5 µl) durch Hitzeschock transformiert. DH5a wurden auf Eis aufgetaut (50 µl pro Plasmid), die Plasmid-

DNA zu den Bakterien gegeben und durch leichtes anschnipsen des Reaktionsgefäßes verteilt und die Bakterien zusammen mit der DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C und eine Abkühlung auf Eis für 2 Minuten. Dann wurden 200 µl, auf 37°C vorgewärmtes, SOC-Medium zu den Zellen gegeben und diese für 60 Minuten bei 37°C und 800 rpm schüttelnd inkubiert. Das gesamte Volumen wurde dann wie oben beschrieben (1.2.6.1) auf eine LB-Agarplatte gegeben und die transformierten Bakterien über Nacht kultiviert.

2.2.6.3 Plasmidpräparationen

Minipräparation

2 ml LB-Medium wurden über Nacht mit dem gewünschten Bakterienstamm bei 37°C oder 30°C (RedET-Plasmide) kultiviert. Die Bakterien wurde für 60 Sekunden bei 20.800 x g heruntrezentrifugiert und das Zellpellet in 100 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. 200 µl alkalischer Lysepuffer wurde zugegeben, durch invertieren mit den Bakterien gemischt. Nach der Lyse (5 Minuten bei RT) wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl Präzipitationspuffer und Inkubation für 10 Minuten auf Eis gestoppt und Zelltrümmer ausgefällt. Nach Zentrifugation (20.800x g/10 Minuten bei RT) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Ethanol gefällt. Durch Zentrifugation (20.800x g/10 Minuten bei RT) wurde die Plasmid-DNA pelletiert, anschließend der Ethanol verworfen und das Pellet bei 37°C getrocknet, bis keine Ethanolrückstände, mehr erkennbar waren. Zuletzt wurde die Plasmid-DNA in 30 µl H₂O aufgenommen und durch Erhitzung (10 Minuten bei 37°C) gelöst.

Midipräparation

Für die Präparation von pStart-K („low copy“ Plasmid) wurden 10 ml *E.coli*-Kultur verwendet und die Plasmid-DNA mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) präpariert.

Maxipräparation

Plasmidpräparationen in größerem Maßstab (250 ml Bakterienkultur) wurde mit dem PureYield™ Plasmid Maxiprep System Kit (Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Transduktion von Zellen wurde die DNA nach der Maxipräparation zusätzlich noch, wie oben beschrieben, gefällt, unter der Sterilbank getrocknet und in sterilem H₂O gelöst.

2.2.7 Herstellung einer *eIF5a2*-defizienten Knockout-Maus

Die Kultivierung und Elektroporation der ES-Zellen, so wie die Präparation genomischer DNA aus den ES-Zellen und Überprüfung der ES-Klone mittels Southern-Blot wurde von der Servicegruppe Transgene Tiere am ZMNH (Hamburg) durchgeführt. Auch sämtliche

Mausarbeiten zur Herstellung der *eIF5a2*-KO-Maus (Präparation und Injektion von Blastozysten, Implantation in pseudo-schwangere Ammenmütter und Zucht der chimären)

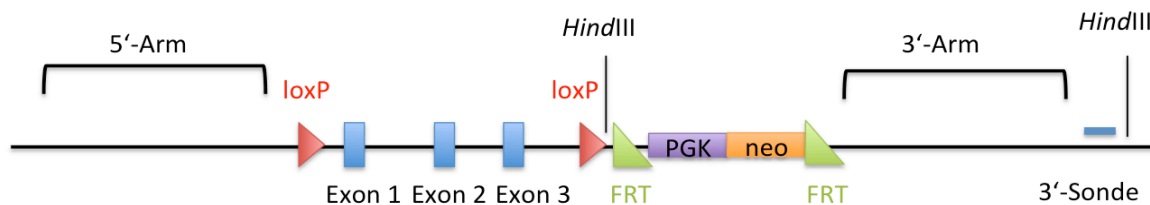


Abb.: 5 Schematische Darstellung der geflochtenen Exons des *eIF-5A2*-Gens nach der homologen Rekombination in ES-Zellen. Gezeigt sind die loxP- und FRT-Stellen, die geflochten Exons und die Lokalisation der loxP-FRT-neo-FRT-Kassette. Zudem sind die 5'- und 3'-Homologiearme, die Bindestelle für die 3'-Southern-Blot-Sonde und die dafür relevanten *HindIII*-Schnittstellen angedeutet.

wurden von PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer und Sarah Homann aus der Servicegruppe Transgene Tiere oder unter deren Anleitung durchgeführt.

2.2.7.1 Herstellung des „Targeting-Vektors“ durch RedET-vermittelte homologe Rekombination

Subklonierung aus BACs

Für die Erstellung des Vektorkonstruktes wurde zunächst ein Teil des murinen *eIF5a2*-Gen mit 5'- und 3'-Bereichen (insgesamt 12475 bp) aus einem „Bacterial Artificial Chromosome“ (BAC) (RP23-361F2; BACPAC Resources Center, Oakland, USA), der einen Teil des murinen Chromosom 3 enthält, durch homologe Rekombination in einen Minimalvektor (MV) kloniert. Dieser Schritt war nötig, da BACs aufgrund ihrer Größe schwerer zu handhaben sind. Sie können beispielsweise durch Scherkräfte leichter beschädigt werden als Plasmide. Für die Subklonierung wurde der pStartK-Minimalvektor¹²⁸ (MV) verwendet. Für die Expression der Rekombinationsproteine wurde das pRedET-Plasmid von Genebridge genutzt. Zuerst wurde der Minimalvektor mittels PCR (50 ng/Reaktion) amplifiziert. Bei diesem Schritt wurden Homologiearme angefügt, die mit den 5'- und 3'-Enden des zu klonierenden Abschnittes übereinstimmen (siehe 2.2.5.3). Nach der PCR wurden die Ansätze mit *DpnI* verdaut (siehe 2.2.5.5) um den zirkulären MV, der als Template für die PCR diente, gezielt zu verdauen, ohne das PCR-Produkt (= den linearen MV + Homologiearme) nicht zu beeinträchtigen.

E.coli DH5 α wurden dann mit dem pRedET-Plasmid elektroporiert. Dieses Plasmid trägt die Gene, die für die Rekombinationsvermittelnden Proteine RecE und RecT codieren. Hierfür wurde ein BAC-Klon in 2 ml LB+Cm angeimpft und ü.N. bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1,4 ml LB+Cm in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß mit 30 μ l der Übernachtskultur angeimpft und für 2 - 3 Stunden bei 37°C und 1000 rpm schüttelnd inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden bei 2° - 4°C durchgeführt. Die *E.coli* wurden herunterzentrifugiert und das Pellet zwei Mal mit eiskaltem H₂O gewaschen. Anschließend wurden die Bakterienzellen in

30 µl H₂O resuspendiert, 1 µl pRedET (20 ng) zugegeben und das Gemisch in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 2 mm Spalt gegeben. Die Elektroporation erfolgte mit den folgenden Parametern: 2500 V, 25 µF und 200 Ω, bei einer Zeitkonstante von ca. 5 ms. Danach wurde sofort 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium zu den Zellen gegeben und diese für 70 Minuten bei 30°C und 1000 rpm inkubiert (das pRedET-Plasmid repliziert sich nicht bei 37°C). 100 µl Zellen wurden auf LB-Agar mit Tc (3 µg/ml) und Cm (15 µg/ml) ausplattiert und unter Lichtausschluss (Tc ist lichtsensitiv) über Nacht bei 30°C inkubiert.

Eine Kolonie wurde gepickt, 2 ml LB-Medium (+Cm/Tet) angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1,4 ml LB+Cm/Tet in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß mit 30 µl der Übernachtskultur angeimpft und bei 30°C und 1000 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,3 (nach ca. 2 – 3 Stunden) wurden 50 µl 10% L-Arabinose zu den *E.coli* gegeben (Endkonzentration ca. 0,3% – 0,4%) und die Kultur für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die L-Arabinose induziert die Expression der RedET Proteine. Die Kultur wurde anschließend, wie oben beschrieben, für die Elektroporation vorbereitet. 200 ng des amplifizierten, linearen MV mit angefügten Homologiearmen wurden in die *E.coli*^{RP23361-F2+RedET} elektroporiert und die Kultur dann für 70 Minuten bei 37°C in 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika inkubiert. Während dieser Zeit vermitteln die RedET-Proteine die Rekombination des gewählten DNA-Fragments aus dem BAC in den MV. Anschließend wurde die Kultur herunterzentrifugiert (2600 x g/5 Minuten), die Zellen in 50 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agar+Kan ausplattiert. Am folgenden Tag wurden 3 Kolonien gepickt und für eine Plasmidmidipräparation angeimpft. Eine korrekte Rekombination wurde mittels Restriktionsverdau mit *Sma*I überprüft.

Herstellung von RedET-kompetenten DH5α

E.coli DH5α wurden, wie oben beschrieben, mit pRedET elektroporiert und in 2 ml LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8 bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden 3 mal mit 10% Glycerol gewaschen, in 500 µl Glycerin resuspendiert und in 50 µl Aliquots in -80°C gelagert.

Insertion der loxP-cm-loxP Kasette

Für die Insertion der ersten loxP-Stelle in das *eIF5a2*-Gen wurde die loxP-flankierte Chloramphenicolkasette von Genebridges verwendet. Analog zum pStart-K-Plasmid wurde die Kasette per PCR amplifiziert und gleichzeitig Homologiearme an beiden Seiten angefügt. Die Homologiearme entsprachen dabei einem Bereich 300 – 200 bp „upstream“ des ersten Exons von *eIF-5A2*.

Das aufgereinigte, *DpnI*-verdaute PCR-Produkt (200 ng) und *eIF5a2* (500 ng) wurden, wie oben beschrieben, in 50 µl RedET-kompetente DH5α elektroporiert und die Rekombination für zwei Stunden bei 37°C durchgeführt. Die DH5α auf LB-Agar mit Kanamycin und Chloramphenicol ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert. Sieben große Klone wurden, nach Midipräparation, mittels *SmaI*-Verdau überprüft.

Entfernung von nicht-rekombiniertem eIF5a2-pStart-K

Da rekombinierte Plasmide (mit loxP-Kasette) und solche, in denen keine Rekombination stattgefunden hat, zusammen in einer Zelle vorkommen können, müssen die nicht-rekombinierten Plasmide entfernt werden. Hierfür wurde die Plasmid-DNA von zwei Klonen aus der Rekombination gepoolt und mit *NruI* linearisiert (2 µg), um miteinander verwundene Plasmide zu trennen. Nach Fällung der DNA wurde eine Religation durchgeführt: 2 µl 10x Puffer wurden hierfür mit 300 ng DNA und 1 µl T4-Ligase gemischt, mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt und 30 Minuten bei RT ligiert. Kompetente DH5α wurden mit 0,25 µl / 0,5 µl und 1 µl Ligationsansatz retransformiert. Drei 0,25 µl-, zwei 0,5 µl- und ein 1 µl-Klon wurden gepickt und nach einer Plasmidpräparation mittels *XhoI*-Verdau auf Anwesenheit von nicht-rekombinierten Plasmiden überprüft.

Ausschneiden von loxP-Kassetten durch die Cre-Rekombinase

Die loxP-cm-loxP-Kasette wurde durch die Verwendung der Cre-Rekombinase aus dem Zielgen im Minimalvektor entfernt, wobei eine einzelne loxP-Stelle im Zielgen zurückbleibt. Hierfür wurde ein *eIF5a2*-pStart-K+loxP-cm-loxP-Klon mit dem 706-Cre-Plasmid (Tet-Resistenz; Genebridges) elektroporiert und auf LB-Agar+Kan/Cm/Tet ausplattiert. Ein Tet^r – positiver Klon wurde gepickt und für 3 Stunden bei 30°C in 2 ml LB+Kan inkubiert. Die Cre-Expression und Cre-vermittelte Rekombination wurde durch über Nacht Inkubation bei 37°C induziert. Ein erfolgreiches Herausschneiden der loxP-Kasette wurde durch einen Restriktionsverdau mit *SmaI* überprüft.

Insertion der loxP-FRT-cm-Neo-FRT Kasette

Die zweite loxP-Kasette beinhaltet zudem zwei FRT-Stellen, die es ermöglichen, die Kasette durch die Flip-Rekombinase zu entfernen. Diese Kasette wurde analog zur ersten loxP-Kasette durch PCR amplifiziert und 3,2 kb „downstream“ zur ersten loxP-Stelle, mittels RedE/T-Rekombination, in das eIF5a2-pStartK-Konstrukt eingefügt. Eine erfolgreiche Rekombination wurde durch Verdau mit *FseI* und *PacI* überprüft (*PacI* schneidet in der Kasette).

Klonierung des „geflochten“ eIF5a2-Gens in den Zielvektor pWS-TK6

Nachdem Exon 1 und 2 des *eIF5a2*-Gens mit loxP-Sequenzen flankiert wurden („geflocht“), wurde das modifizierte Gen in den endgültigen Zielvektor pWS-TK6¹²⁸ kloniert. Hierfür wurde eine „Gateway“-Rekombination (Clonase-Reaktion; Invitrogen) genutzt. Der pStart-K-Vektor enthält Erkennungssequenzen für die Gateway-Rekombinasen (*attL1* und *attL2*). Diese Sequenzen flankieren den Bereich, der zuvor aus dem BAC kloniert wurde. Der Zielvektor pWS-TK6 enthält die entsprechenden Zielsequenzen für die Rekombination (*attR1* und

Komponente	Volumen
eIF-5A2-pStart-K (150 ng)	0,86 µl
pWS-TK6 (150 ng)	10,7 µl
TE-Puffer (pH 7,5)	0,44 µl
Clonasemix	3 µl

attR2). Die Clonase-Reaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und 1 µl des Ansatzes in DH5 α , mittels Hitzeschock transformiert und auf LB-Agar+Amp+Cm ausplattiert.

Ein Klon wurde gepickt und die Rekombination mit Hilfe eines *NcoI* oder *FseI*-Verdau überprüft. Nach Bestätigung der

Rekombination wurde das fertige Konstrukt mit den Primern A2-MVCass2-r, A2-MVPGK-f, A2-MVCass-f und A2-MVCass1-r sequenziert, um die Integrität der loxP-Sequenzen und der loxP-FRT-cm-Neo-FRT Kasette (vermittelt die G418-Resistenz) zu gewährleisten.

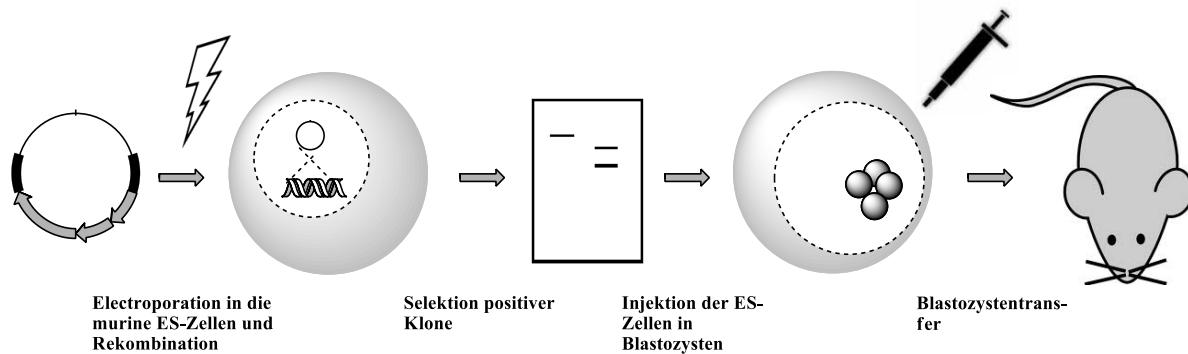


Abb.: 6 Übersicht der notwendigen Schritte zur Erstellung einer KO-Maus, vom fertigen Vektorkonstrukt bis zum Transfer in Ammenmütter. (1) Elektroporation des Vektorkonstruktes in murine ES-Zellen. Rekombination des modifizierten Gens in das Genom der ES-Zellen. (2) Expansion und Selektion positiver Klone, z.B. durch Southern-Blots und PCR-Screening. (3) Injektion positiver ES-Zellen in Blastozysten. (4) Implantation der Blastozysten in Ammenmütter.

Kultivierung, Elektroporation und Selektion embryonaler Stammzellen

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 teilweise unter deren Anleitung durchgeführt.

Für die Elektroporation des Zielvektors wurde die murine, embryonale Stammzelllinie R1 genutzt. Diese Zellen wurden in ES-Medium kultiviert. LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) wurde dem Medium zugefügt, um eine Proliferation der ES-Zellen ohne Differenzierung und den Erhalt der Pluripotenz zu gewährleisten. Als weiterer Schutz gegen die Differenzierung erfolgte die Kultivierung auf einer Schicht mitotisch inaktiver embryonaler Mausfibroblasten (MEFs). Diese Zellen wurden von Dr. Irm Hermans-Borgmeyer (ZMNH; Hamburg) zur Verfügung gestellt. 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 und einmal zusätzlich zwei Stunden vor der Elektroporation erneuert. Die Zellen wurden abtrypsiniert (0,25% Trypsin/EDTA), mit PBS gewaschen und 10^7 Zellen pro Ansatz in 800 µl Elektroporationspuffer gegeben. Die Suspension wurde mit 30 µg des durch *SnaBI* linearisierten Zielvektors gemischt, in eine Elektroporationsküvette mit 4 mm Spalt überführt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Zellen wurden elektroporiert (250V Spannung, max. 500 µF Kapazität, 5,5-6,5 ms Pulslänge), anschließend 10 min inkubiert und wie oben beschrieben auf fünf 10 cm Schalen ausgesät. Am Tag darauf wurde das Medium erneuert und die Selektion durch Zugabe von 150-250 µg/ml G418 (Geneticin) begonnen. Das Selektionsmedium wurde eine Woche lang täglich gewechselt. Am neunten Tag wurden die Platten mit PBS gewaschen und mit 10 ml PBS überschichtet. 300 Kolonien (rund und mit scharf begrenzter Morphologie) wurden in 96 Well-Platten mit vorgelegtem Trypsin/EDTA überführt, vereinzelt und anschließend in gelatinierte, mit MEF beschichtete 96 Well-Platten ausgesät. Nach zwei Tagen wurden die Klone 1:4 passagiert. So waren für jeden Klon

ausreichend Zellen für die Präparation der genomischen DNA, als auch für den Blastozystentransfer verfügbar.

Zum Einfrieren wurde das Medium gewechselt, die Zellen zwei Stunden später mit PBS/EDTA gewaschen und mit je 40 µl 0,25% Trypsin/EDTA vereinzelt. Durch Zugabe von 60 µl Stammzellmedium wurde das Trypsin inhibiert und die Zellen auf Eis abgekühlt. Nun wurde zu jedem Well 100 µl 2x Einfriermedium zugegeben und sorgfältig gemischt. Die Platten wurden versiegelt und bei -80°C eingefroren.

Herstellung von Sonden für Southern-Blots

Nach der homologen Rekombination des Zielkonstruktes in den murinen ES-Zellen, wurden diese mit dem Aminoglykosid G418 (Geneticin, ein Derivat von Gentamycin) behandelt. Nur die ES-Zellen, die das transgene Konstrukt tragen, überleben im Allgemeinen diese Selektion. Allerdings lässt sich damit keine Aussage treffen, ob das Konstrukt korrekt rekombiniert ist (also das Wildtypgen ausgetauscht wurde), oder ob das Konstrukt zufällig ins Genom integriert wurde. Da nur ca. einer von 1000 G418-resistenten Klonen ein Produkt eines homologen Rekombinationsereignisses ist⁴⁸, wird die ortsspezifische Integration des Transgens durch einen Southern-Blot.

Für die Sonde wurde ein 500 bp Bereich außerhalb des 3'-Homologiearms gewählt. Dieser Bereich wurde mittels Phusion-Polymerase amplifiziert. Als Template wurde das Ursprungsbac RP23-361F2 verwendet. Das PCR-Produkt wurde nach Herstellerangaben mit dem CloneJET-Kit (Fermentas) in den Subklonierungsvektor pJET1.2 kloniert, in DH5α transformiert und auf LB-Agar+Kan ausplattiert. Zwei Klone wurden durch Verdau mit *Bgl*II und Sequenzierung validiert. Die Plasmid-DNA eines positiven Klons wurde in 3 Ansätzen verdaut (je 10 µg), die Sonde durch Agarosegelelektrophorese präpariert und die Sonden aus den Verdau gepoolt. Die Präparation der genomischen DNA aus den selektionierten Klonen im 96-Well-Format, sowie das Screening der ES-Klone mittels Southern-Blot wurde 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 vorsichtig ausgespült. Die Blastozysten wurden unter Öl in kleinen Tropfen KSOM-Medium bei 37°C und 5% CO₂ bis zur weiteren Verwendung inkubiert.

Injektion von embryonalen Stammzellen in Blastozysten und Transfer der injizierten Blastozysten in scheinchwangere Ammen

Die Injektion der ES-Zellen in Blastozysten und der Transfer in die Ammenmütter wurde von Dr. Irm Hermans-Borgmeyer und Sarah Homann durchgeführt.

2.2.7.2 Bestätigung der korrekten Integration des *eIF5a2-loxP-neo-FRT-loxP* Konstruktes

Da kein positiver Klon, nach Elektroporation der ES-Zellen mit dem *eIF5a2-pWS-TK6*-Konstrukt, identifiziert werden konnte, wurden ES-Zellen mit einem „gefloxtem“ *eIF5a2*-Gen

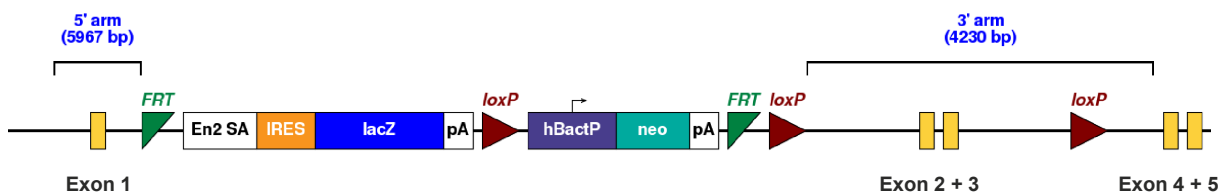


Abb.: 7 Darstellung des geflochten *eIF5a2*-Gens in den IKMC-ES-Zellen¹⁰. Gezeigt sind die Exons 1 – 5 und die integrierte *loxP-neo-FRT-loxP*-Kassette. Die 5'- und 3'-homologiearme und deren Größe sind ebenfalls angegeben. Entnommen aus dem IKMC-Projektreport ID: 72200; modifiziert.

vom internationalen Knockout-Maus Konsortium (IKMC) erworben.

Diese ES-Zellen waren zu Beginn dieser Arbeit noch nicht verfügbar, erschienen angesichts der problematischen Identifikation eines positiven Klons aber als gute Alternative für die Herstellung einer *eIF5a2*-KO-Maus. Der verwendete Klon (HEPD0734_3_A07) verfügt über eine *loxP-neo-FRT-loxP*-Kassette mit einem *hBactP*-Promotor. In 5'-Richtung befindet sich zudem noch eine *lacZ*-Kassette unter Kontrolle eines *IRES*-Promotors. Zwischen Exon 3 und 4 befindet sich die erste *loxP*-Stelle. Die Aktivität der *Cre*-Rekombinase würde zu einer Deletion von Exon 1 und 2 führen. Dadurch käme es zu einem Verlust der 5'-UTR

Temperatur	Zeit	Zyklen	Komponente	Volumen
98°C	3'	1	5x HF-Puffer	10 µl
98°C	10s	8	10 mM dNTPs	1 µl
72°C	15s	8	DMSO	0,05 µl
72°C	4'30s	8	Primer A	2,5 µl
98°C	10s	30	Primer B	2,5 µl
66°C	15s	30	gDNA [ca. 200 ng]	x µl
72°C	4'30s	30	Polymerase	0,5 µl
72°C	10'	1	H ₂ O	ad. 50 µl
4°C	∞	1	Gesamtvolumen	50 µl

(„untranslatierten Region“), des Startcodons und der Hypusinierungsstelle.

Zu Bestätigung der Integration an der richtigen genomischen Position der loxP-neo-FRT-loxP-Kassette wurden „long range PCRs“ (LR-PCRs; PCRs, die einen großen Bereich amplifizieren) durchgeführt. Für den 3'-Bereich wurden der Universalprimer RAF5 (bindet in der poly-A-Sequenz der Kassette) und die genspezifischen Primer GR3 und GR4 verwendet.

Diese

binden in 3'-Richtung des 3'-Homologiearms. Für den 5'-Bereich wurde der 5'-Universalprimer LAR3 und die genspezifischen Primer GF3 und GF4 verwendet.

2.2.8 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung von Proliferationsassays, mRNA- und Proteinexpressionen, ³H-Spermidineinbau und SA-β-GAL-Versuche wurde der ungepaarte, zweiseitige t-Test mit der GraphPad Prism 5.01 Software (GraphPad Software) durchgeführt. Die statistische Analyse der immunohistochemischen Färbungen wurden von Prof. Dr. Christian Hagel (Abteilung für Neuropathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurde die SPSS Software (Version 15) verwendet. Alter und Geschlecht der Patienten, Tumortyp (Astrozytom gegen Oligodendrogliom) Tumorgrad und Intensität der immunohistochemischen Färbung wurden in Korrelation zueinander gesetzt. Die Abschätzung einer Korrelation der metrischen Variablen wurde nach Pearson analysiert, wobei der Kendall-Tau-b Test verwendet wurde.

3 Ergebnisse

Ergebnisse, die von Kooperationspartnern erbracht wurde, sind in der Darstellung der Daten als solche gekennzeichnet.

- Die Präparation, Kultivierung und Selektion von murinen ES-Zellen, die Präparation von gDNA aus ES-Zellen, die Aufreinigung von Southern-Blot-Sonden, sowie die Durchführung der Southern-Blots, Injektionen von ES-Zellen in Blastozysten und die Implantation der befruchteten Eizellen in scheinchwangere Ammenmütter wurden von PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer und Sarah Homann in der UKE Core Facility „Transgene Tiere“ durchgeführt.
- Die Bestimmung der Expression von eIF-5A, -A2, DHS und DOHH in Mikrogewebsschnitten (tissue microarrays; TMAs) von Gliompatienten und in nicht-malignen Hirngewebsschnitten mittels Immunohistochemie (IHC) wurde durchgeführt von Prof. Dr. Christian Hagel (Abteilung für Neuropathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland).

Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Rolle des eukaryotischen Initiationsfaktors 5A und der hypusinbildenden Enzyme DHS und DOHH in Glioblastomen untersucht werden. Der Effekt von inhibierter DHS in Glioblastomzellen wird *in vitro* und *in vivo* analysiert, um die DHS-Inhibierung als eine mögliche therapeutische Option zu evaluieren.

Die zweite Isoform von eIF-5A, mit der Bezeichnung eIF-5A2, ist bereits in anderen Krebsentitäten als prädiktiver und tumorfördernder Faktor beschrieben worden. Da aber die genaue Rolle von eIF-5A2 sowohl in malignen, als auch in gesunden Geweben noch weitgehend unbekannt ist, soll ein Zielvektor zur Generierung einer konditionalen *eIF5a2*-„Knockout“ Maus hergestellt werden, mit der sich die Funktion dieses Proteins gewebs- und zeitspezifisch untersuchen lässt.

3.1 Expression von eIF-5A, -A2 und den hypusinbildenden Enzymen DHS&DOHH *in vivo* und *in vitro*

3.1.1 eIF5-A1, -A2, DHS und DOHH-Status in Tumorproben von Gliompatienten

Mittels Immunohistochemie (IHC) wurden Mikrogewebeschnitte von 30 pilozytischen Astrozytomen (WHO Grad I), 30 diffusen Astrozytomen (WHO Grad II), 27 anaplastischen Astrozytomen (WHO Grad III), 28 Oligodendrogliomen (WHO Grad II), 28 anaplastischen Oligodendrogliomen (WHO Grad III) und 30 Glioblastomen (WHO Grad IV) auf die Expression von eIF-5A, -A2 und den hypusinbildenden Enzymen DHS und DOHH untersucht. Eine erhöhte Expression von eIF-5A im Vergleich zu Normalhirn wurde in allen Tumoren gefunden, unabhängig von ihrer Graduierung. eIF-5A2 konnte hingegen nur in einem Tumor detektiert werden. Interessanterweise war die Expression von DHS und DOHH in Glioblastomen signifikant höher als in Gliomen mit Grad I – III (siehe Abb.: 9A und B). Um die Expression im Normalhirn abschätzen zu können, wurden Hirngewebeschnitte von zwei post-mortem Spendern für die IHC verwendet (I: weiblich, 25 Jahre alt: Frontal-, Temporal- und Okzipitallappen, Thalamus, Basalganglien, Pons, Hirnstamm, Cerebellum, Hypophyse und Dura Mater; II: männlich, 89 Jahre alt: Frontal- und Temporallappen, Pons und Cerebellum). Als weitere Negativkontrolle wurde ein Hirn-TMA mit neurodegenerativen, nicht-neoplastischen Veränderungen (Spender weiblich, 67 Jahre alt) verwendet. Hier zeigte sich, dass die Immunfärbung gegen DOHH eine Markierung von Astrozyten, Neuronen, Oligodendroglia, Fibroblasten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen von Blutgefäßen und Hypophysengewebe zur Folge hatte. Immunfärbungen der anderen drei Proteine hingegen

färbten Astrozyten im Allgemeinen nicht an. Eine DHS-Expression konnte in Neuronen, Ependymzellen, Fibroblasten und Zellen der Hypophyse nachgewiesen werden. eIF-5A

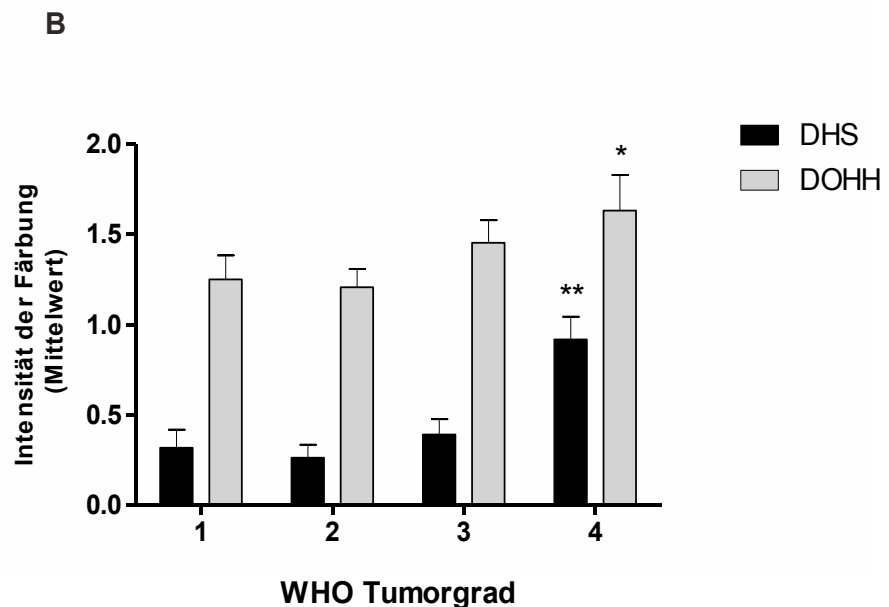
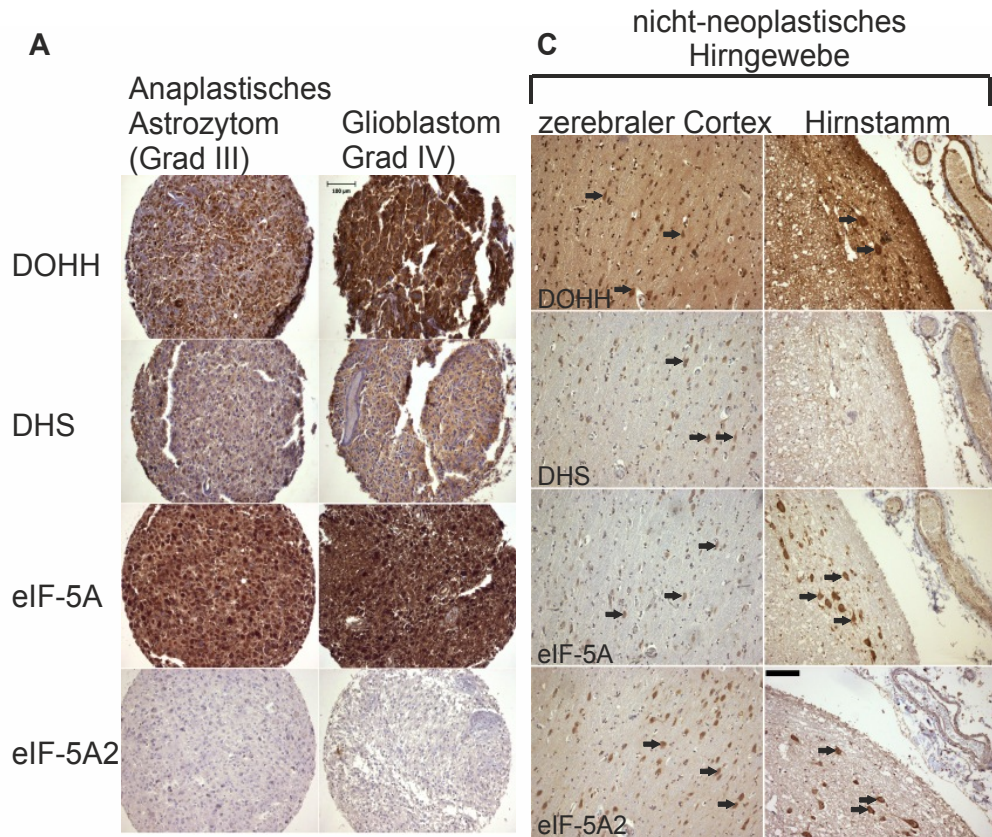


Abb.: 8 eIF-5A, -A2, DHS und DOHH-Level in Gliompatientenproben unterschiedlicher Graduierung und in nicht-neoplastischen Hirngeweben. (A) Eine starke Expression von DOHH, DHS und eIF-5A konnte in Astrozytomen und Glioblastomen immunohistochemisch nachgewiesen werden. Eine Expression von eIF-5A2 konnte nicht detektiert werden. (B) Die DHS- und DOHH - Expression korreliert signifikant mit dem Tumorgrad (*: $P < 0,01$ und **: $P < 0,001$; zweiseitige, nichtparametrische Kendall's Tau Korrelation); (C) In normalem Hirngewebe werden hauptsächlich Neurone (siehe Pfeile), z. B. Pyramidalzellen im Cortex (linke Spalte) oder im Hirnstamm (rechte Spalte, Pfeile zeigen auf Neuronen der Nuclei arcuati) für die Expression von eIF-5A, -A2 oder der hypusinbildenden Enzyme angefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

wurde ebenfalls in Neuronen, Ependymzellen und in Hypophysegewebe detektiert. Zusätzlich detektiert wurde eine Expression in Meningothelzellen, im Plexus choroideus und in einigen reaktiven Astrozyten. Die Isoform eIF-5A2 war in Neuronen, Ependym- und Meningothelzellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und der Hypophysezellen präsent. Die IHC der TMAs und Gewebsschnitte wurde in der Neuropathologie des Uniklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Die Auswertung und Quantifizierung der Expression wurde von Prof. Christian Hagel, Neuropathologe, durchgeführt.

3.1.2 Expression von eIF-5A und den hypusinbildenden Enzymen in G55T2 und U87-MG Zellen

Um ein *in vitro* Modell für die weitere Charakterisierung der Hypusinmodifikation in Gliomen zu etablieren, wurde die Expression von eIF-5A, DHS und DOHH in verschiedenen Zelllinien analysiert. Die Bestimmung der mRNA-Level in U87-MG- und G55T2-Zellen zeigte eine Überexpression von eIF-5A (45-fach in G55T2-Zellen und 8-fach in U87-MG-Zellen), DHS (11-fach in G55T2-Zellen und 5-fach in U87-MG-Zellen) und DOHH (45-fach in G55T2-Zellen und 17-fach in U87-MG-Zellen), verglichen mit primären humanen Astrozyten (Abb.: 9A). Eine Überexpression von eIF-5A2 (6-fach) wurde ebenfalls in G55T2-Zellen gefunden,

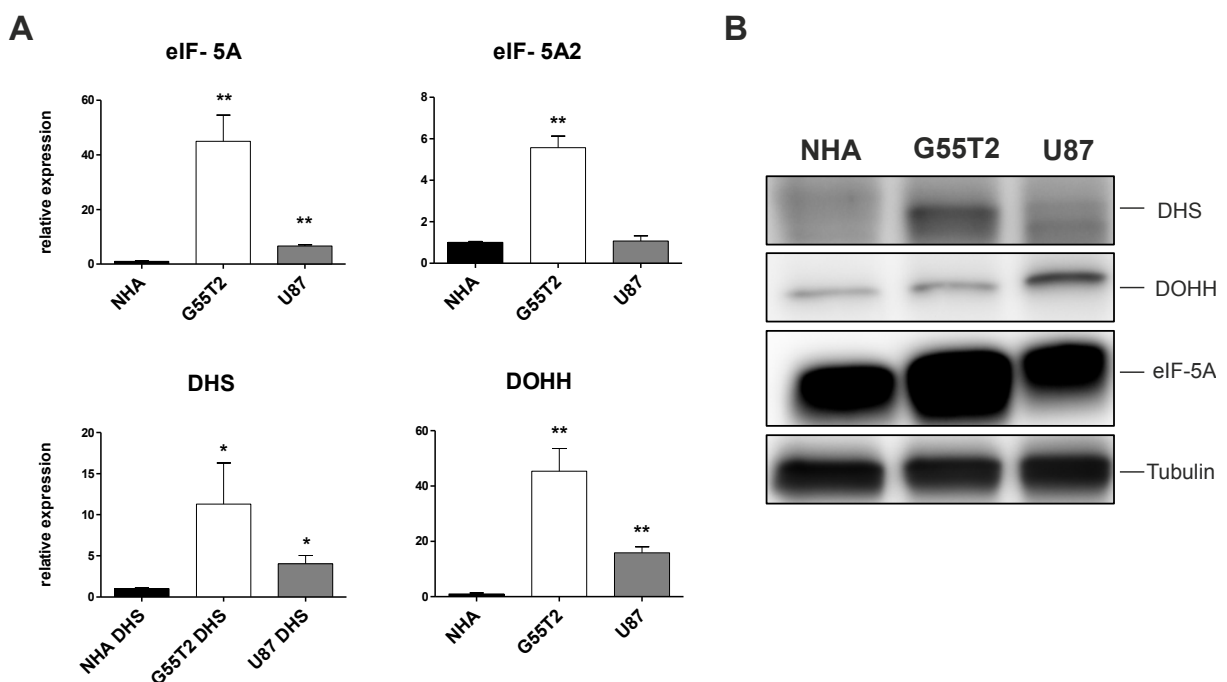


Abb.: 9 eIF-5A und die hypusinbildenden Enzyme sind in den GBM-Zelllinien G55T2 und U87-MG überexpimiert. (A) Die Expression der mRNA von eIF-5A, -A2, DHS und DOHH wurden mittels qPCR analysiert und mit der Expression in primären Astrozyten (NHAs) verglichen (Mittelwert \pm SD, n = 3; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.001$). SYBR green Ct-Werte wurden gegen die GAPDH Expression normalisiert und mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode ausgewertet. (B) Die Überexpression von eIF-5A, DHS und DOHH wurde durch Immunoblots mit Zelllysaten (je 30 μ g) bestätigt.

jedoch nicht in U87-MG. Generell war die Überexpression der vier analysierten mRNAs in U87-MG-Zellen nicht so ausgeprägt, aber statistisch signifikant. Diese Ergebnisse wurde auf Proteinebene weitgehend bestätigt, wobei hier, im Gegensatz zu den qPCR-Ergebnissen die DOHH-Expression in den U87-MG-Zellen höher ist als in den G55T2 (Abb.: 9B).

3.2 Der Effekt verminderter Hypusiniierung auf Glioblastomzellen *in vitro*

3.2.1 Nachweis der DHS-Inhibition durch GC7 in U87-MG und G55T2-Zellen

Basierend auf der signifikanten Überexpression der hypusinasozierten Enzyme in Gliomen und Glioblastomzellen stellte sich die Frage, ob Hypusiniierungsinhibitoren (HI) in der Lage sind die Proliferation von Glioblastomzellen *in vitro* zu hemmen. In einer ersten Reihe von Experimenten konnte die Hemmung der DHS durch den etablierten Inhibitor GC7¹² in GBM-Zellen nachgewiesen werden. Hierfür wurden 2D-Western Blots gegen eIF-5A und ³H-Spermidineinbau-Versuche durchgeführt. Hypusiniertes und nicht-modifiziertes eIF-5A können mit einem 2D-Western-Blot unterschieden werden, da sich die beiden Formen in ihrem isoelektrischen Punkt unterscheiden. Die nicht-hypusinierte Form hat einen saureren isoelektrischen Punkt (pI 5,2 im Gegensatz zur modifizierten Form mit pI 5,5). In U87-MG- und G55T2-Zellen liegt eIF-5A in größtenteils hypusinierter Form vor, zu erkennen anhand des einzelnen Proteinspots (Abb.: 10A). Die Hypusiniierung konnte durch GC7, ein

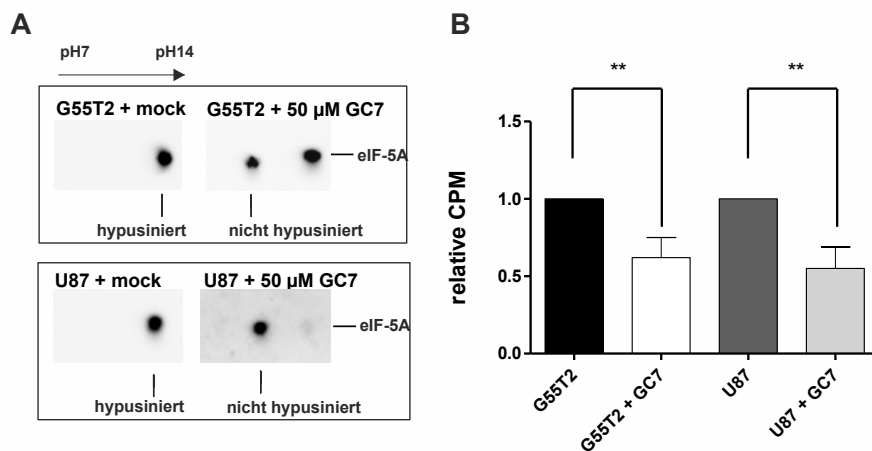


Abb.: 10 Der Effekt der DHS-Inhibition auf die Hypusinsynthese. (A) Zellen wurden mit 50 μM GC7 für 48 Stunden inkubiert. Der Effekt von GC7 auf die Hypusiniierung von eIF-5A wurde durch eine Veränderung des pI von eIF-5A ermittelt. Diese Veränderung wurde anhand eines 2D-Immunoblots mit einem Antikörper gegen eIF-5A sichtbar gemacht (25 μg Proteinlysät, erste Dimension pH 4 – 7). (B) Um die reduzierte Hypusiniierung zu bestätigen, wurden G55T2- und U87-MG-Zellen mit 50 μM GC7 und 25 μCi ³H-Spermidin für zwei Tage inkubiert. 200 μg Gesamtprotein wurde mit 10% TCA gefällt und überschüssige Radioaktivität durch Waschen entfernt. Das Proteinpellet wurde in 1N NaOH gelöst und die Aktivität (in Ereignisse pro Minute, CPM) des ³H, gebunden in Hypusin, bestimmt (**: $P < 0,001$).

kompetitives Spermidinanalogen, welches das aktive Zentrum der DHS blockiert, inhibiert werden. Dies ist anhand des zweiten, saureren Proteinspots in 2D-Western-Blots der behandelten Zellen zu erkennen. Mit dieser Methode wurde ein 50%iger Rückgang des modifizierten eIF-5A in G55T2-Zellen und eine 90%ige Abnahme in U87-MG-Zellen gezeigt. Diese Ergebnisse wurden durch Analyse des ³H-Spermidin Einbaus validiert. Da eIF-5A das einzig bekannte Protein ist, welches Spermidin inkorporiert, kann anhand des

Spermidineinbaus auf die Aktivität der DHS geschlossen werden, welche diesen Einbau katalysiert. Wie in Abb.: 10B dargestellt ist, zeigte sich ein 40% - 50%iger Rückgang in der Hypusinierung innerhalb von 48h unter GC7-Behandlung, womit die DHS-Inhibition in dem gewählten zellulären Modell und der verwendeten Konzentration bestätigt wurde.

3.2.2 Die pharmakologische Inhibierung von DHS durch GC7 zeigt einen antiproliferativen Effekt *in vitro*

Die Inhibierung der DHS mit verschiedenen Konzentrationen an GC7 zeigte eine dosisabhängigen, antiproliferativen Effekt in GBM-Zellen (Abb.: 11). Der Effekt war bereits nach 48 Stunden zu bemerken. Nach 72 Stunden zeigten 10 μ M GC7 keinen Effekt, 50 μ M

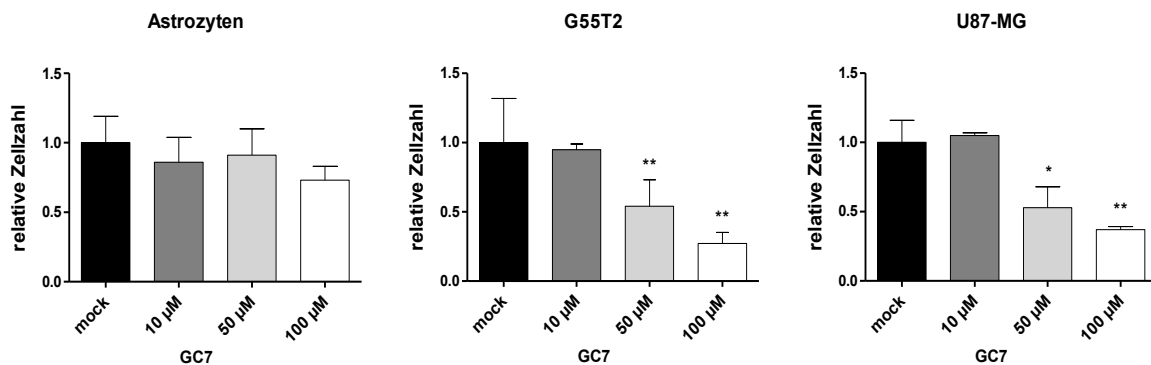


Abb.: 11 Der Effekt von GC7 auf die Proliferation von NHAs und Glioblastomlinien. Normale humane Astrozyten, G55T2- und U87-MG-Zellen wurden für 72 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen GC7 behandelt. Viable Zellen wurden mittels Tryphanblauausschluss gezählt und als relativer Wert zur Mock-Kontrolle dargestellt (Mittelwert \pm SD, $n = 6$). Zellzahlen, die signifikant von den Kontrollwerten abweichen sind mit einem Asterisk markiert (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,001$).

eine Reduktion der Proliferation um 50% und ca. 45% - 75%. Der Effekt auf die beiden Zelllinien war hierbei annähernd gleich. Interessanterweise zeigten normale humane Astrozyten (NHA) keine signifikante Reduktion der Proliferation innerhalb von 72 Stunden. Der größte Effekt war bei 100 μ M GC7 mit einer Reduktion der Proliferation auf 73% im Vergleich zu Kontrollzellen zu beobachten. Die Behandlung der GBM-Zellen zeigte keinen Effekt auf die sub-G₁ Fraktion von PI-gefärbten Zellen (sowohl in behandelten und unbehandelten Zellpopulationen >5%), und keinen Anstieg von Caspase-3 positiven Zellen (Abb.: 12A und B). Auch die TUNEL-Färbung zeigte keine Zunahme apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abb.: 12C). Als Positivkontrolle wurden G55T2 und U87-MG Zellen mit 0,5 μ M Doxorubicin behandelt. Dieses Zytostatikum interkaliert in DNA und führt zu Apoptose.

Die mikroskopische Beobachtung der mit GC7 behandelten Zellen, zeigte sowohl in den U87-MG, als auch in den G55T2 morphologische Veränderungen. Nach ca. 72h begann eine

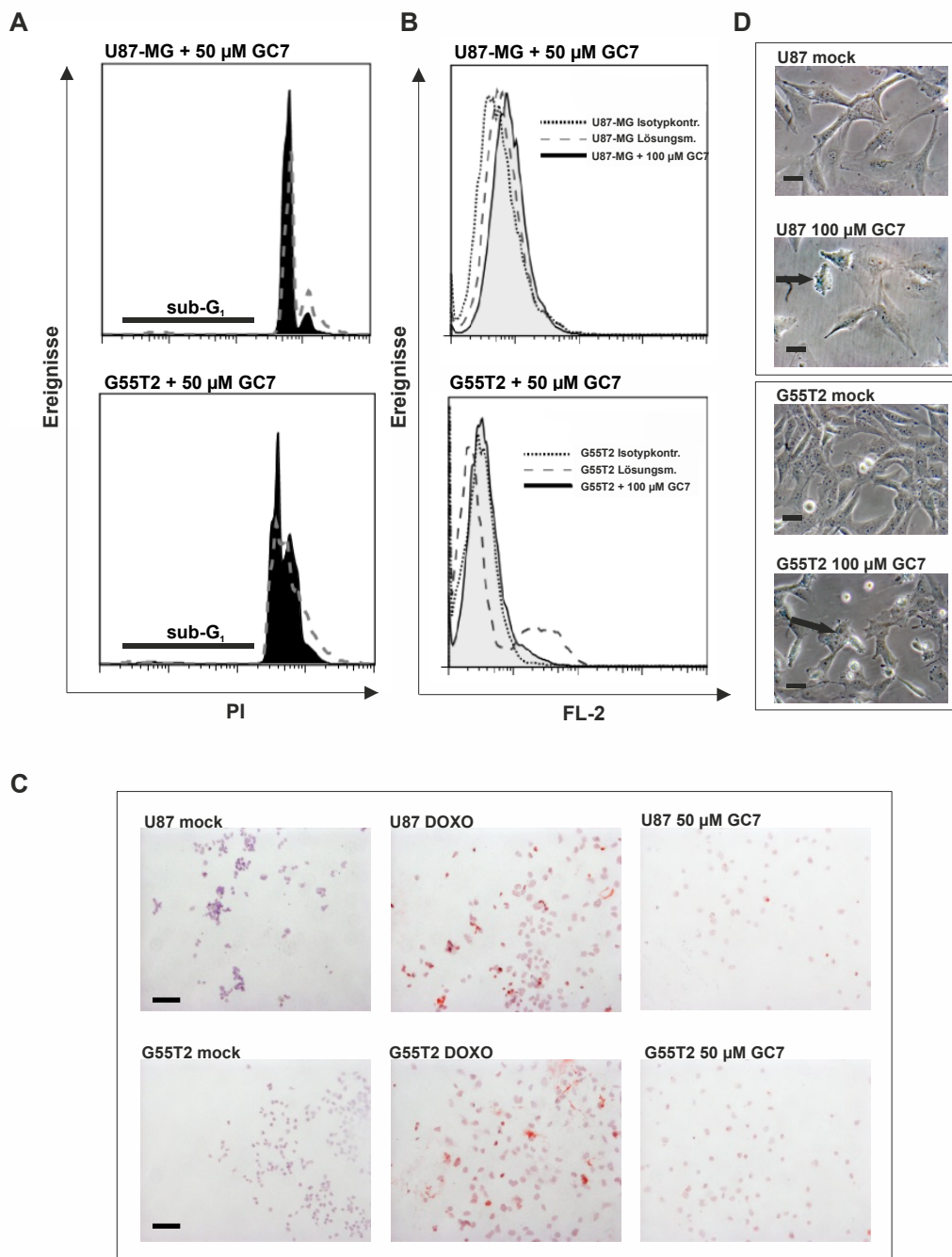


Abb.: 12 Analyse von Apoptosemerkmalen und Morphologie nach GC7-Behandlung. (A) U87-MG- und G55T2-Zellen wurden mit 50 μM GC7 (schwarzer Bereich) oder H₂O (gepunkteter Bereich) für 72 Stunden behandelt, in 70% Ethanol fixiert und mit PI gefärbt. Apoptotische/nekrotische (sub-G₁) Populationen wurden mittels FACS bestimmt. (B) U87-MG- und G55T2-Zellen wurden mit 50 μM GC7 (grauer Bereich) oder H₂O (gestrichelter Bereich) für 72 Stunden behandelt und mit einem Antikörper gegen aktive Caspase3 oder einer Isotypkontrolle (gepunkteter Bereich) angefärbt, um eine GC7-induzierte Apoptose nachzuweisen. (C) U87-MG- und G55T2-Zellen wurden mit 50 μM GC7, 0,5 μM Doxorubicin oder einem entsprechenden Volumen DMSO (mock) behandelt. Anschließend wurden apoptoseinduzierte DNA-Einzelstrangbrüche mittels eines TUNEL-Assay angefärbt (rote Zellen). Zellkerne wurden mit Hämalaun gegengefärbt (lila). Der Maßstabsbalken repräsentiert 100 μm . (D) Mikrofotografien von Kontroll- und GC7 behandelten U87-MG- und G55T2-Zellen nach fünf Tagen Behandlung. Die Aufnahmen wurden bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Beispielhafte morphologische Veränderungen sind durch Pfeile markiert. Der Maßstabsbalken repräsentiert 20 μm .

größere Zahl der U87-MG-Zellen sich abzuflachen und zu vergrößern („Spiegelei“-Form; assoziiert mit zellulärer Seneszenz). Im Gegensatz dazu wiesen die G55T2 diese Morphologie nicht auf. Hier fanden sich hingegen viele Zellen, die eine ovale bis kugelige Form aufwiesen und dabei eine Vielzahl vesikelartiger Strukturen bildeten (Abb.: 12D).

3.2.3 Die shRNA-vermittelte Herunterregulation von DHS und eIF-5A führt zu einer verminderten Proliferation *in vitro*

Da GC7 ein Polyaminanalog ist, kann es zu physiologischen Veränderungen führen, die nicht auf eine verminderte Hypusinierung zurückzuführen sind. Um die Ausmaße dieser Nebenwirkungen zu evaluieren, wurden jeweils DHS und eIF-5A durch lentivirale Expression von shRNAs herunterreguliert. Ein Gemisch aus vier verschiedenen shRNA-Vektoren konnte die Expression der DHS in U87-MG und G55T2-Zellen signifikant reduzieren. Dies wurde auf mRNA-Ebene mittels qPCR und auf Proteinebene durch Immunoblotting nachgewiesen (Abb.: 13A und B). Auf mRNA-Ebene konnte für beide Zelllinien eine Herunterregulierung um 80% - 90% nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war die Reduktion des DHS-Proteinlevels in den U87-MG Zellen sehr viel ausgeprägter, als in G55T2-Zellen. Dies ist möglicherweise mit den unterschiedlichen Expressionsniveaus in den beiden Linien zu erklären. Analog zur Behandlung mit GC7 werden die U87-MG flacher und breiten sich aus. Die G55T2 verlieren teilweise ihre dreieckige bis spindelartige Form, sie scheinen kleiner und abgerundeter zu sein (Abb.: 13C). In beiden Linien ist der Effekt aber nicht so ausgeprägt, wie bei der Behandlung mit GC7. Wie erwartet führte die Herunterregulierung der DHS zu einer signifikant verminderten Proliferation auf 30% in U87-MG ($P < 0,001$) und 45% in G55T2-Zellen ($P < 0,001$), verglichen mit Zellen, die mit einer Kontroll-shRNA transduziert wurden (Abb.: 13D). Die Herunterregulierung von eIF-5A mit vier verschiedenen shRNAs führte zu einer mäßigen bis starken (U87-MG), bzw. geringen bis mäßigen (G55T2) Reduktion des eIF-5A Proteinlevels (Abb.: 13E). Beide U87-MG-Linien (mit mäßiger und starker Herunterregulation von eIF-5A) zeigten eine signifikant reduzierte Proliferation nach fünf Tagen im Vergleich zu Kontrollzellen. Die Herunterregulation in G55T2-Linien hingegen reichte nicht aus, um einen Effekt auf die Proliferation zu induzieren (Abb.: 13F).

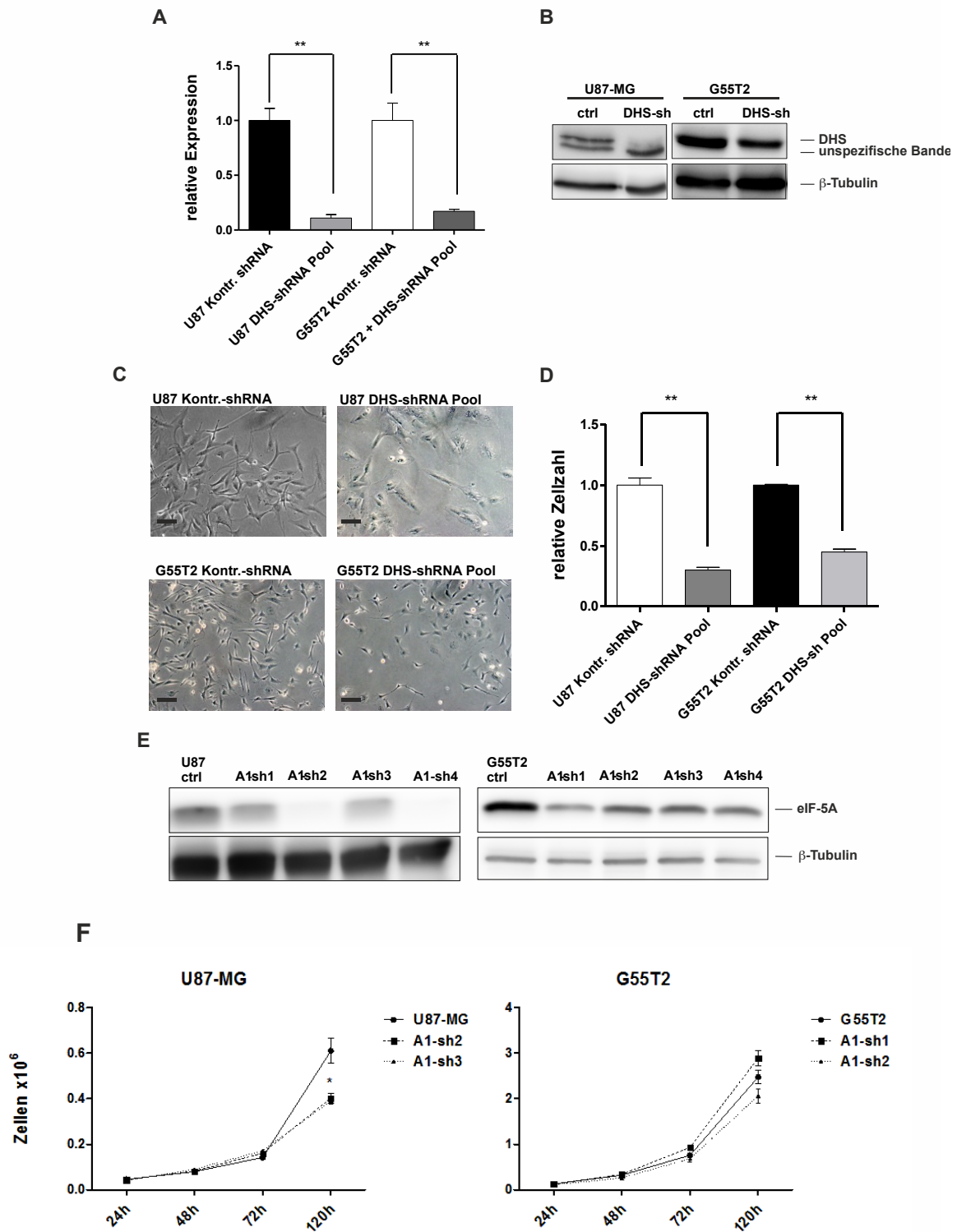


Abb.: 13 Reduzierung der DHS-Expression in G55T2- und U87-MG-Zelle mittels shRNA. GBM-Zelllinien wurden mit einer Kontroll-shRNA oder einem Gemisch aus fünf anti-DHS-shRNAs lentiviral transduziert. (A) Die Expression von DHS wurde auf mRNA-Ebene mittels qPCRs überprüft (Mittelwert ± SD, n = 3; **: $P < 0.001$). SYBR green Ct-Werte wurden gegen die GAPDH Expression normalisiert. (B) Die DHS-Expression auf Proteinebene wurde mittels Immunoblotting überprüft (30 μg Proteinlysate; ctrl = Kontroll-shRNA, DHS-sh = DHS-shRNA-Pool). Als Ladekontrolle diente die Expression von β-Tubulin. (C) Mikrofotografie der transduzierten Glioblastomazellen bei 100-facher Vergrößerung. Der Maßstabsbalken repräsentiert 100 μm. (D) Proliferation der transduzierten GBM-Zellen nach 72 Stunden. Die Anzahl viable Zellen wurde durch Tryphanblauausschluss bestimmt (n = 3; **: $P < 0,001$). (E) Verringerte eIF-5A-Expression durch lentiviralen Transduktion von shRNAs führt zu einer mäßigen (U87-MG) oder keiner Reduktion (G55T2) der Proliferation. Immunoblots gegen eIF-5A und β-Tubulin als Ladekontrolle mit Proteinlysaten (je 30 μg) aus shRNA-transduzierten GBM-Zellen. (F) Die Proliferation der transduzierten Zellen wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen gemessen. Die Zellzahl wurde alle 24 Stunden mittels Tryphanblauausschluss bestimmt (n = 3; *: $P < 0,05$).

3.2.4 Mit GC7 behandelte U87-MG-Zellen gehen in einen p21-abhängigen, Zellzyklusarrest und zeigen Anzeichen einer zellulären Seneszenz

Die Morphologie der U87-MG unter GC7 entsprach einer, für die zelluläre Seneszenz beschriebenen Morphologie. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde zunächst der Zellzyklus der behandelten GBM-Zelllinien analysiert. Die Inhibierung der DHS durch GC7

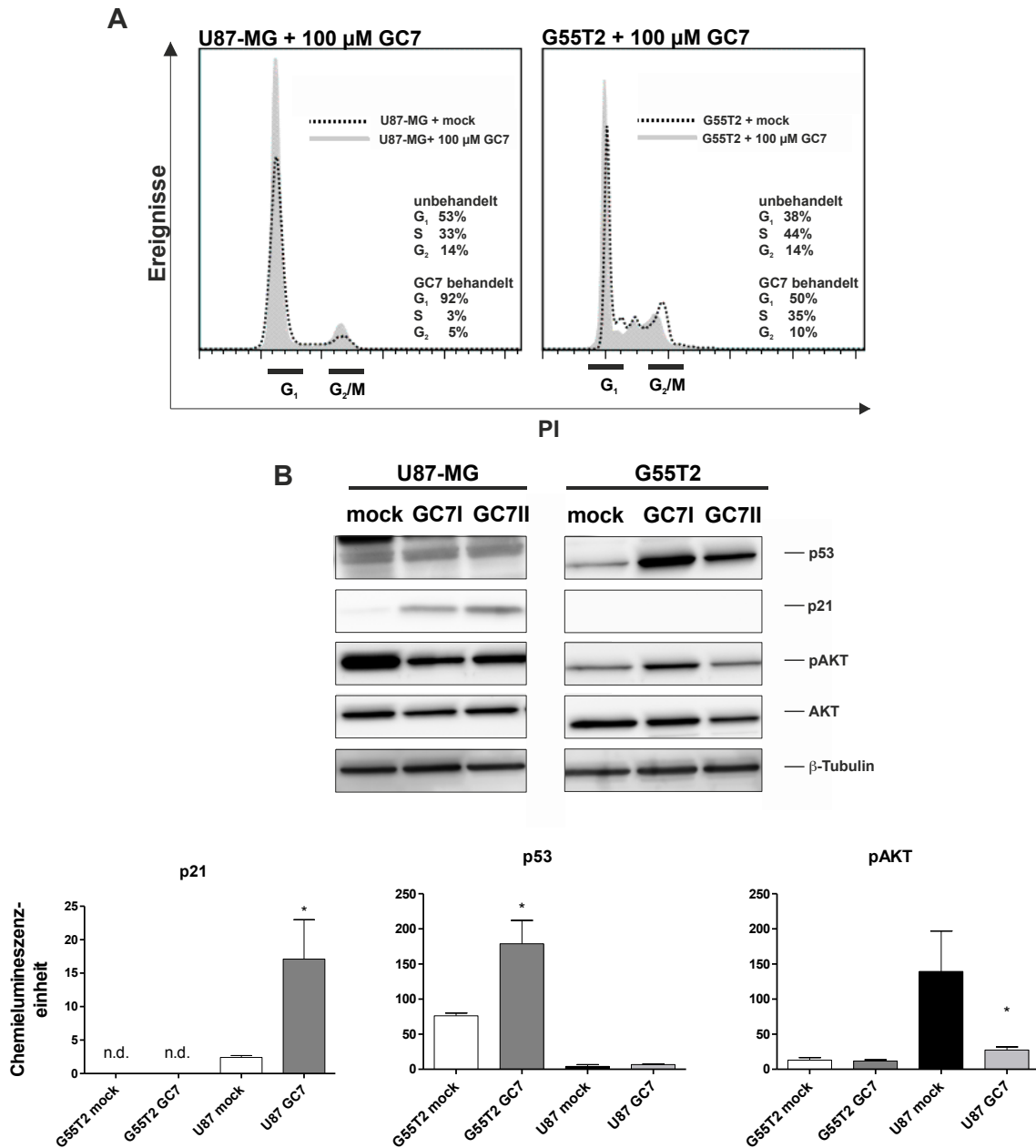


Abb.: 14 GC7-induzierter Zellzyklusarrest und hochregulation von p21 und verminderte Phosphorylierung von AKT. (A) Die GC7-Behandlung von U87-MG- und G55T2-Zellen führte zu einem höheren Anteil von Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus. Die Verteilung der Zellzyklusphase wurde durch DNA-Färbung mit PI bestimmt und mit unbehandelten Kontrollzellen verglichen. (B) GBM-Zellen wurden in Duplikaten mit 100 μM GC7, bzw. DMSO als Negativkontrolle behandelt. Die Expression von p53, p21 und AKT, sowie die Phosphorylierung von AKT wurden mittels Immunoblotting densitometrisch bestimmt (n = 2; *: P < 0,05). Als Ladekontrolle wurde β-Tubulin verwendet.

fürte in U87-MG-Zellen zu einem Anstieg der Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus, während weniger Zellen in S- und G₂-Phase zu finden waren (Abb.: 14A). G55T2-Zellen zeigten ebenfalls mehr Zellen in der G₁-Phase, allerdings weniger ausgeprägt. Einer der Hauptsignalwege, der letztendlich in zellulärer Seneszenz resultiert, ist p53- und p21-abhängig. Der Einfluss der DHS-Inhibition auf diesen Signalweg wurde mittels Western-blot-Analyse untersucht (Abb.: 14B). Hier zeigte sich, dass eine GC7-Behandlung zu einem Anstieg der p53-Expression in G55T2-Zellen führte. Die p53-Expression in U87-MG blieb unverändert niedrigem Niveau. Demgegenüber stieg die p21-Expression in GC7-behandelten U87-MG-Zellen stark an (etwa um das 15-fache) während in G55T2 kein p21 detektiert werden konnte. Der Anstieg der p21-Expression wurde begleitet von einer verminderten Phosphorylierung des AKT-Proteins um 70%. G55T2-Zellen zeigte auch hier keine Veränderung durch GC7-Behandlung.

Als Goldstandardmarker für die zelluläre Seneszenz gilt der SA-β-Gal-Assay. Hierbei wird die Aktivität der lysosomalen β-Galactosidase, die während der Seneszenz akkumuliert, durch Umsatz von X-Gal als blaue Färbung sichtbar gemacht. Auch hier ergab sich ein Unterschied zwischen den beiden GBM-Linien. Die G55T2 zeigten weder mit noch ohne GC7 eine SA-β-Gal Färbung. Die U87-MG-Zellen dagegen hatten unbehandelt einen Anteil von ca. 2,5-5% SA-β-Gal⁺. Nach einer 72-stündigen Behandlung mit 100 μM GC7 war dieser Anteil auf 50% angestiegen (Abb.: 15).

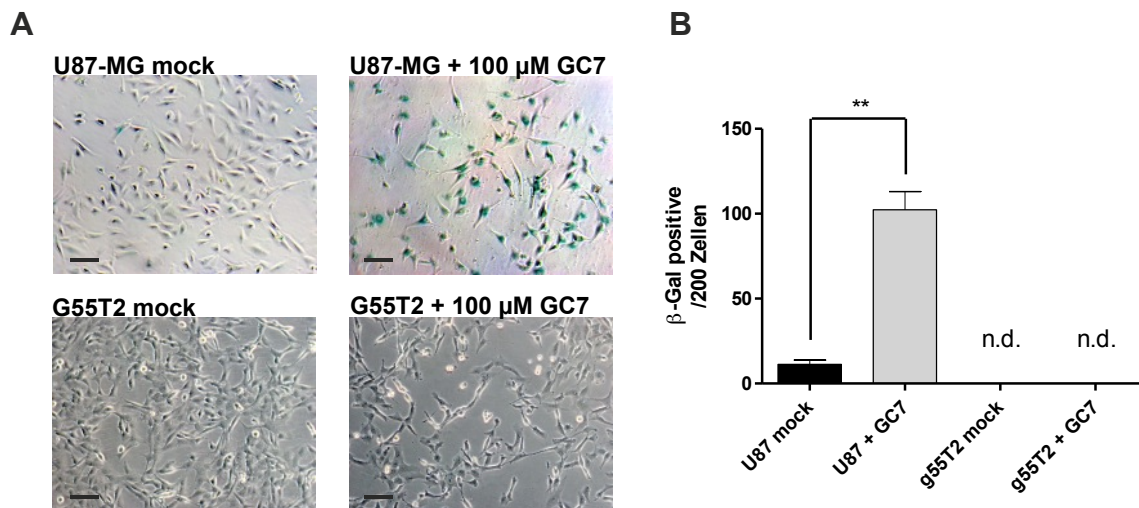


Abb.: 15 Die Behandlung von GBM-Zellen mit GC7 führt zu einer erhöhten Expression der SA-β-Galaktosidase in U87-MG-, aber nicht in G55T2-Zellen. (A) Die Aktivität von seneszenzassoziierter lysosomaler β-Galaktosidase in GC7-behandelten und Kontrollzellen wurde durch einen SA-β-Gal-Assay ermittelt. (B) Der Anteil blau gefärbter Zellen wurde mikroskopisch bei 100-facher Vergrößerung ausgezählt (Triplikate, 200 Zellen pro Well wurden gezählt, **: $P < 0,001$). Der Maßstabsbalken repräsentiert 100 μm.

3.2.5 Die Wiederherstellung von p53^{wt} ermöglicht eine zelluläre Seneszenz nach DHS-Inhibition in G55T2-Zellen

Um die Rolle von p53 in der hypusinabhängigen Induktion der Seneszenz weiter zu analysieren, wurde p53 („Wildtyp-p53“) in G55T2-Zellen exprimiert. Als Kontrolle diente der entsprechende Leervektor. Die Multiplizität der Infektion (MOI) wurde so gewählt, dass eine Transduktionsrate von 50% erreicht wurde. Wie in Abb.: 16A dargestellt ist, wurde sowohl bei Kontroll-, als auch bei p53^{wt}-Zellen eine zu ca. 50% transduzierte Population erreicht. Diese Population blieb im Falle der Kontrollzellen über mindestens acht Tage stabil, wohingegen die p53^{wt}-Population innerhalb von acht Tagen unter 10% fiel. 2, 4 und 8 Tage post-Transduktion wurde zudem die PI-Gängigkeit der Zellen analysiert, um ihre Viabilität zu bestimmen. Die Transduktion der Zellen mit p53^{wt} führte zu einem Anstieg der PI⁺-Zellen von ca. 5% auf 26%. Bei den Kontrollzellen hingegen schwankte dieser Wert zwischen 1,5% und 7,5% (Abb.: 16B). Dies deutet stark auf eine p53-Sensitivität der G55T2-Zellen hin. Die Behandlung der transduzierten Zellen mit 100 µM GC7 für 72 Stunden (beginnend 24 Stunden nach der Transduktion) führte zu einem signifikanten Anstieg der Zahl seneszenten Zellen gegenüber Kontroll-/unbehandelten ($P < 0,001$) Zellen, bzw. Kontrollzellen, die mit GC7 behandelt wurden ($P < 0,01$, siehe Abb.: 16C). Zellen, die unbehandelt belassen wurden, aber mit p53^{wt} transduziert waren, wiesen ebenfalls eine Rate seneszenten Zellen auf, jedoch signifikant weniger, als unter GC7-Behandlung ($P < 0,01$). Wie bereits in U87-MG Zellen beobachtet werden konnte, ging die GC7-Behandlung in den p53^{wt}-Zellen mit einer Hochregulation von p21 einher, während die p21-Expression in Kontrollzellen mit Leervektor gering blieb (Abb.: 16D). Wie zuvor konnte ebenfalls eine reduzierte Phosphorylierung von AKT nachgewiesen werden.

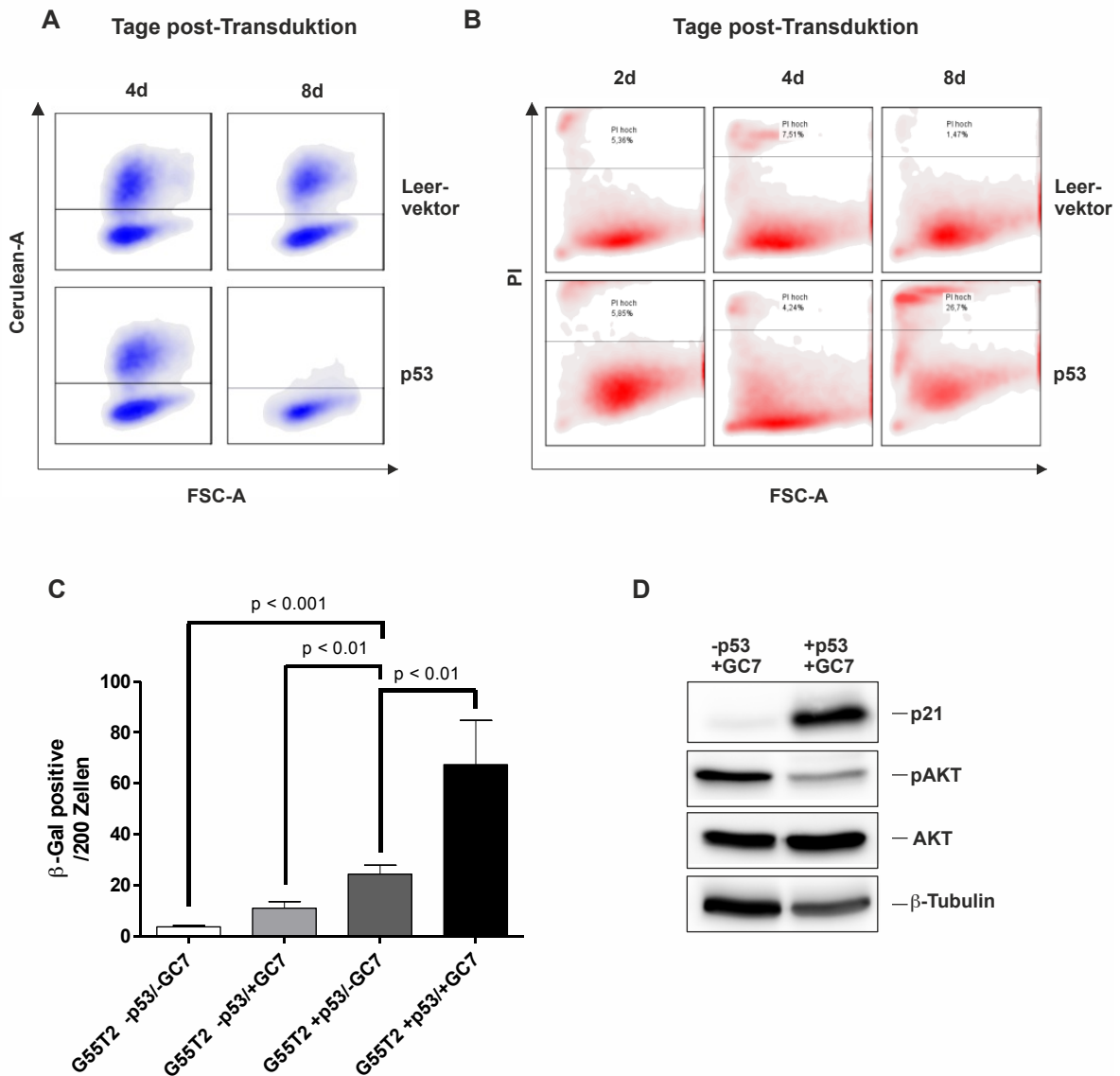


Abb.: 16 Die Wiederherstellung von p53 in G55T2-Zellen führt zu einer vermehrten zellulären Seneszenz durch DHS-Inhibition. (A) G55T2-Populationen (mit einem Leervektor oder p53^{wt} transduziert) wurden mittels FACS 4 und 8 Tage nach der Transduktion auf die Expression des transduzierten Markergens hin untersucht. (B) Die PI-Gängigkeit von wt- oder p53^{wt}-transduzierten Zellen als Anhaltspunkt für eine stattfindende Apoptose wurde mittels FACS-Analyse ermittelt. Die Analyse erfolgte 2, 4 und 8 Tage nach der Transduktion. (C) Die Aktivität der SA- β -Galactosidase wurde in GC7-behandelten und unbehandelten G55T2-Zellen bestimmt. Der Anteil blau gefärbter Zellen wurde mikroskopisch bei 100-facher Vergrößerung ausgezählt (Triplikate, 200 Zellen pro Well wurden gezählt). (D) Die Expression von p21^{Waf1/Cip1}, phospho-AKT, AKT und β -Tubulin in GC7-behandelten G55T2-Zellen +/- p53^{wt} wurde mittels Immunoblot bestimmt.

3.2.6 Die gleichzeitige Behandlung von Glioblastomzellen mit TMZ/BCNU und GC7 hat einen additiven antiproliferativen Effekt

Alkylantien, wie TMZ und BCNU, werden klinisch für die adjuvante und palliative Behandlung von Glioblastomen eingesetzt^{96,97}. Dies spiegelt sich in der Anfälligkeit von U87-MG- und G55T2-Zellen gegenüber Alkylantien wieder. Beide Zelllinien zeigten eine dosisabhängige Reduktion der Proliferation, mit Ausnahme der U87-MG bei 150 μM TMZ (Abb.: 17). Beide Zelllinien reagierten ähnlich auf BCNU und zeigten eine um mehr als 50%ige Reduktion des

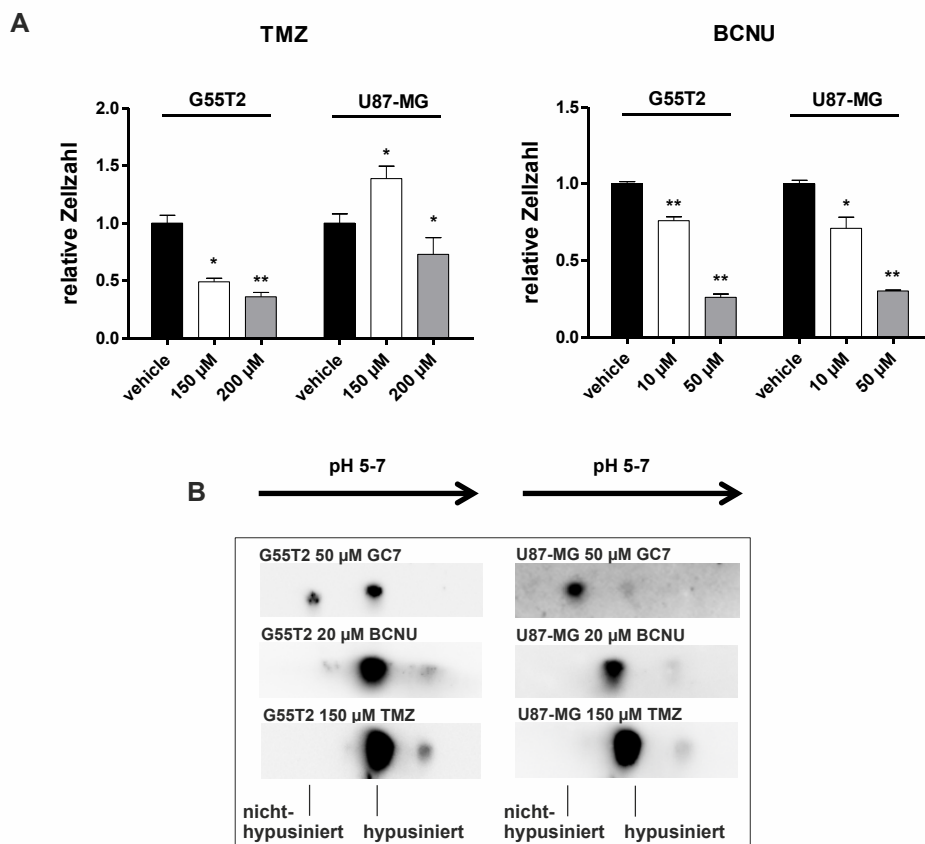


Abb.: 17 Der Effekt von Temozolomid und BCNU auf die Proliferation der verwendeten Glioblastomlinien (A) G55T2- und U87-MG-Zellen wurden für 72 Stunden mit TMZ (150 μM und 200 μM) bzw. BCNU (10 μM und 50 μM) behandelt. Die Anzahl viable Zellen, relativ zu unbehandelten Zellen, wurde durch Tryphanblauausschluss und Zellzählung ermittelt ($n = 3$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.001$). (B) Untersuchung des direkten Effektes von alkylierenden Medikamenten auf die Synthese von hypusiniertem eIF-5A. GBM-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an TMZ oder BCNU für 72 Stunden inkubiert und der Hypusinstatus von eIF-5A durch einen 2D-Immunoblot ermittelt. Als Positivkontrolle für unhypusiniertes eIF-5A wurden GBM-Zellen mit GC7 behandelt.

Wachstums innerhalb von 72 Stunden unter Behandlung mit 50 μM , verglichen mit unbehandelten Zellen. Im Gegensatz dazu waren G55T2-Zellen empfindlicher gegen TMZ. Nach Zugabe von 150 μM oder 200 μM TMZ verminderte sich ihre Proliferationsrate innerhalb von 72 Stunden um 50% - 60%. Im Gegensatz dazu zeigten 150 μM TMZ bei den U87-MG-Zellen eher einen wachstumsfördernden Effekt. 200 μM TMZ führte zu einer geringen Reduktion des Wachstums auf ca. 70% des Kontrollwertes.

Um einen möglichen Effekt der alkylierenden Medikamente auf den Hypusinsyntheseweg auszuschließen, wurde der Hypusinstatus von Zellen analysiert, die mit 150 μ M TMZ oder 20 μ M BCNU behandelt wurden. Als Kontrollgruppe dienten Zellen, die mit GC7 inkubiert wurden. Wie oben beschrieben, resultiert die DHS-Inhibition in einer Akkumulation von unhyposiniertem eIF-5A. Wie in Abb.: 17B zu sehen ist, hatten TMZ und BCNU keinen vergleichbaren Effekt und es war keine Akkumulation von nicht-modifiziertem eIF-5A zu beobachten. Allerdings war ein schwacher, basischerer Proteinspot unbekanntes Ursprungs zu erkennen.

Eine gleichzeitige Behandlung von G55T2-Zellen mit 150 μ M TMZ und 10 μ M GC7

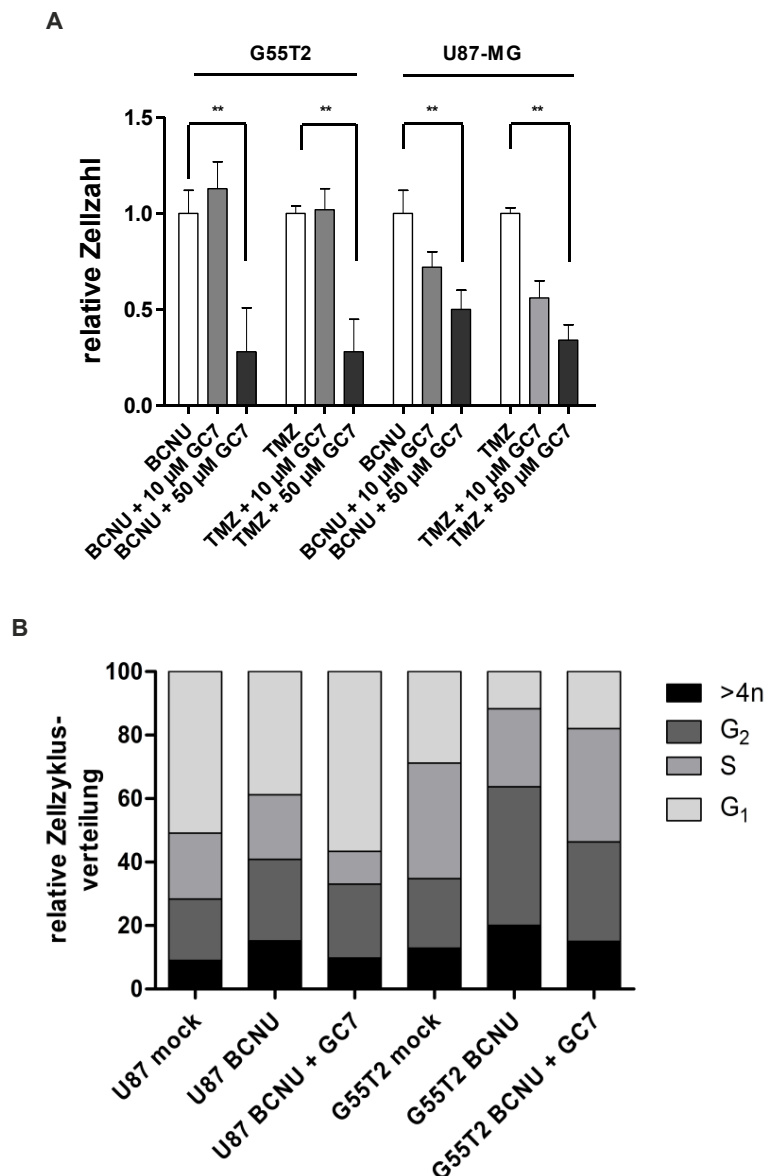


Abb.: 18 Die kombinierte Behandlung von Glioblastomzellen mit alkylierenden Substanzen und GC7 hat einen additiven, antiproliferativen Effekt. (A) GBM-Zellen wurden für 72 Stunden mit TMZ/BCNU alleine oder zusammen mit zwei verschiedenen Konzentrationen GC7 behandelt. Der Effekt auf die Proliferation wurde durch Zellzählung bestimmt. Signifikante Unterschiede zu den, nur mit TMZ/BCNU behandelten Zellen sind mit einem Asterisk markiert ($n = 3$; **: $P < 0,001$). (B) Der Einfluss BCNU als alkylierendes Medikament alleine und in Kombination mit GC7 auf den Zellzyklus von U87-MG und G55T2-Zellen, wurde durch PI-Färbung und anschließende FACS-Analyse erfasst. Als Negativkontrolle diente das Lösungsmittel.

resultierte nicht in einem verbessertem antiproliferativen Effekt innerhalb von 72 Stunden. Aber die Zugabe von 50 μM GC7 führte zu einer signifikant ($P < 0,001$) reduzierten Zellzahl (28%) verglichen mit Zellen, die nur mit TMZ behandelt wurden (Abb.: 18A). Die Behandlung mit 20 μM BCNU und 50 μM GC7 hatte einen vergleichbaren Effekt, mit einer Reduktion der Proliferation auf 44%, verglichen mit Zellen, die nur mit 20 μM BCNU behandelt wurden ($P < 0,001$). Die Reaktion der U87-MG-Zellen war etwas abweichend, mit einer Zellzahl von 70% (gleichzeitige Behandlung mit 20 μM BCNU und 10 μM GC7; $P < 0,05$) und 50% (20 μM BCNU und 50 μM GC7; $P < 0,001$) verglichen mit der BCNU-Einzelbehandlung. Die gleichzeitige Behandlung mit TMZ und GC7 ergab einen stärkeren, mit den G55T2-Zellen vergleichbaren, antiproliferativen Effekt (56% mit 10 μM GC7; $P < 0,05$ und 34% mit 50 μM GC7; $P < 0,001$).

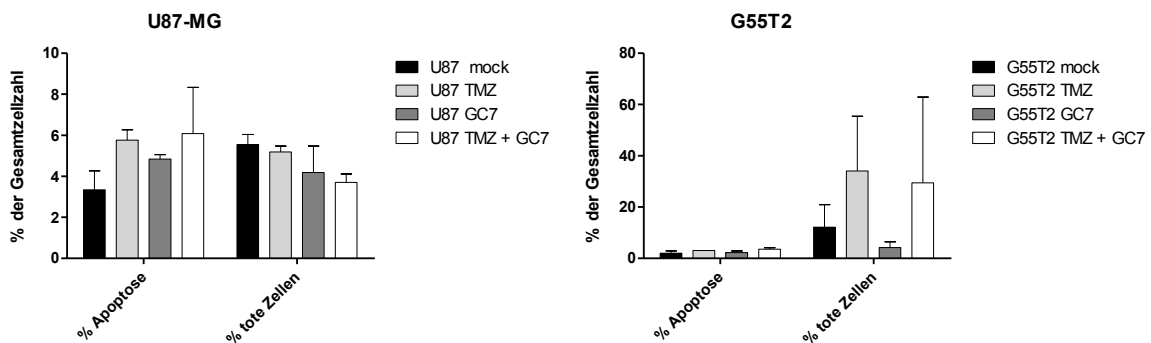


Abb.: 19 Bestimmung viable, apoptotischer und toter GBM-Zellen nach Behandlung mit TMZ und GC7. U87-MG und G55T2-Zellen wurden für 72 Stunden mit TMZ oder GC7 alleine oder in Kombination behandelt. Eine Induktion von Apoptose und Zelltod wurde durch die Anfärbung von Annexin-V auf der Zellaußenseite, bzw. Aufnahme von PI in die Zellen per FACS bestimmt ($n = 2$; keine statistischen Signifikanzen). Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit DMSO behandelt wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit führte die Behandlung der GBM-Zellen zu einem G_2 -M-Arrest mit einem geringen Anstieg der sub- G_1 – Population (letzteres nur bei der Behandlung mit BCNU). Auch eine Akkumulation von hyperploiden Zellen ($>4n$) war zu beobachten (Abb.: 18B). Diese Daten stimmen mit vorherigen Ergebnissen überein^{129,130}. Da die DHS-Inhibition zu einem Anstieg der G_1 -Population und die Behandlung mit TMZ/BCNU zu einem G_2 -M-Arrest und der Akkumulation von hyperploiden Zellen führt, resultierte die Kombinationsbehandlung von GC7 und Alkylantien in einem entsprechend gemischten Phänotyp. Die Kombinationsbehandlung von U87-MG-Zellen führte, wie die Einzelbehandlung mit BCNU, zu einem Anstieg der G_2 -M- und $>4n$ -Population. Nur der Anstieg der sub- G_1 -Population fiel geringer aus. Auch die G_1 -Population war größer, als in der Einzelbehandlung, was den Effekt des GC7 widerspiegelt. Die Behandlung mit TMZ und GC7 erzeugte einen vergleichbaren Effekt auf den Zellzyklus. Allerdings fiel hier die Akkumulation der G_2 -M- und $>4n$ -Populationen deutlich geringer aus, als in der TMZ-Einzelbehandlung.

3.2.7 GC7 und TMZ haben keinen proapoptotischen Effekt in den verwendeten Zellmodellen

Obwohl GC7 alleine nicht in der Lage war, Apoptose in den verwendeten GBM-Zellen zu induzieren, kann eine mögliche proapoptotische Wirkung unter Stressbedingungen, wie der Behandlung mit Alkylantien, nicht ausgeschlossen werden. Mittels Annexin-V/PI-Färbung lassen sich apoptotische, bereits tote und viable Zellen voneinander unterscheiden. In den p53^{wt} U87-MG-Zellen führte sowohl die Behandlung mit TMZ, als auch GC7, sowie die Kombination zu einem geringen, nicht signifikanten ($P > 0,05$) Anstieg der Apoptoserate von 3% auf 5 – 6% (Abb.: 19A). Der Anteil PI⁺-Zellen blieb unverändert, außer in der Kombination. Hier sank er von 6% auf 4,9% (nicht signifikant; $P > 0,05$). Bei den p53^{-/-}-negativen G55T2-Zellen zeigte sich keine Veränderung der Apoptoserate (Abb.: 19B). Sie lag in allen Fällen bei ca. 2 - 3%. Der Anteil toter Zellen stieg interessanterweise durch Behandlung mit TMZ (unabhängig von GC7) von durchschnittlich 12% auf 30% (aufgrund der Streuung allerdings nicht statistisch signifikant). Durch die alleinige Behandlung mit GC7 verringerte sich der Anteil toter Zellen auf durchschnittlich 4,25% ($P > 0,05$). Eine signifikante Apoptoseinduktion durch GC7, TMZ oder eine Kombination beider Substanzen konnte somit nicht bestätigt werden.

3.2.8 Der Effekt von GC7 in einem *in vivo* Xenograft Mausmodell

Zur Untersuchung des Effektes von GC7 auf Glioblastomzellen *in vivo* sollte zunächst in einem subkutanen Xenograftmodell eine Abschätzung der verträglichen GC7-Dosis und die Wirkung auf Tumorzellen und Organismus vorgenommen werden für eine Übersicht siehe Abb.: 20A). G55T2-Zellen wurden dorsal, subkutan in 13 immunkompromitierte NSG-Mäuse injiziert. Das Körpergewicht und der Allgemeinzustand der Tiere wurden alle zwei Tage überprüft. Das Auftreten von soliden Tumoren wurde durch Abtasten ebenfalls beobachtet. Nach 6 Tagen konnte bei 12 Tieren (92%) ein Tumorwachstum festgestellt werden. Drei der Tiere wiesen, verglichen mit den restlichen Tieren, Tumore mit einer höheren Wachstumsrate auf. Nach 9 Tagen hatten die Tumore in diesen Tieren bereits einen Durchmesser von > 2 mm und die Behandlung mit GC7 (0,1 mg/Tier) wurde begonnen. Die Behandlung der restlichen 9 Tiere wurde 10 Tage post-Injektion gestartet (PBS, 0,15 mg und 0,2 mg), da die Tumore dann ebenfalls eine ausreichende Größe erreicht hatten. Die Behandlung mit GC7 wurde täglich über einen Zeitraum von 7 Tagen durchgeführt. Das Körpergewicht der Tiere veränderte sich im Laufe des gesamten Versuchs nur unwesentlich (Abb.: 20B). Die Kontrolltiere (Injektion mit PBS) wiesen im Schnitt ein etwas geringeres Gewicht auf (1 – 1,5 g), allerdings auch bereits zu Beginn des Versuchs, vor einer Verabreichung von GC7. Äußerlich waren keine negativen Auswirkungen der GC7-

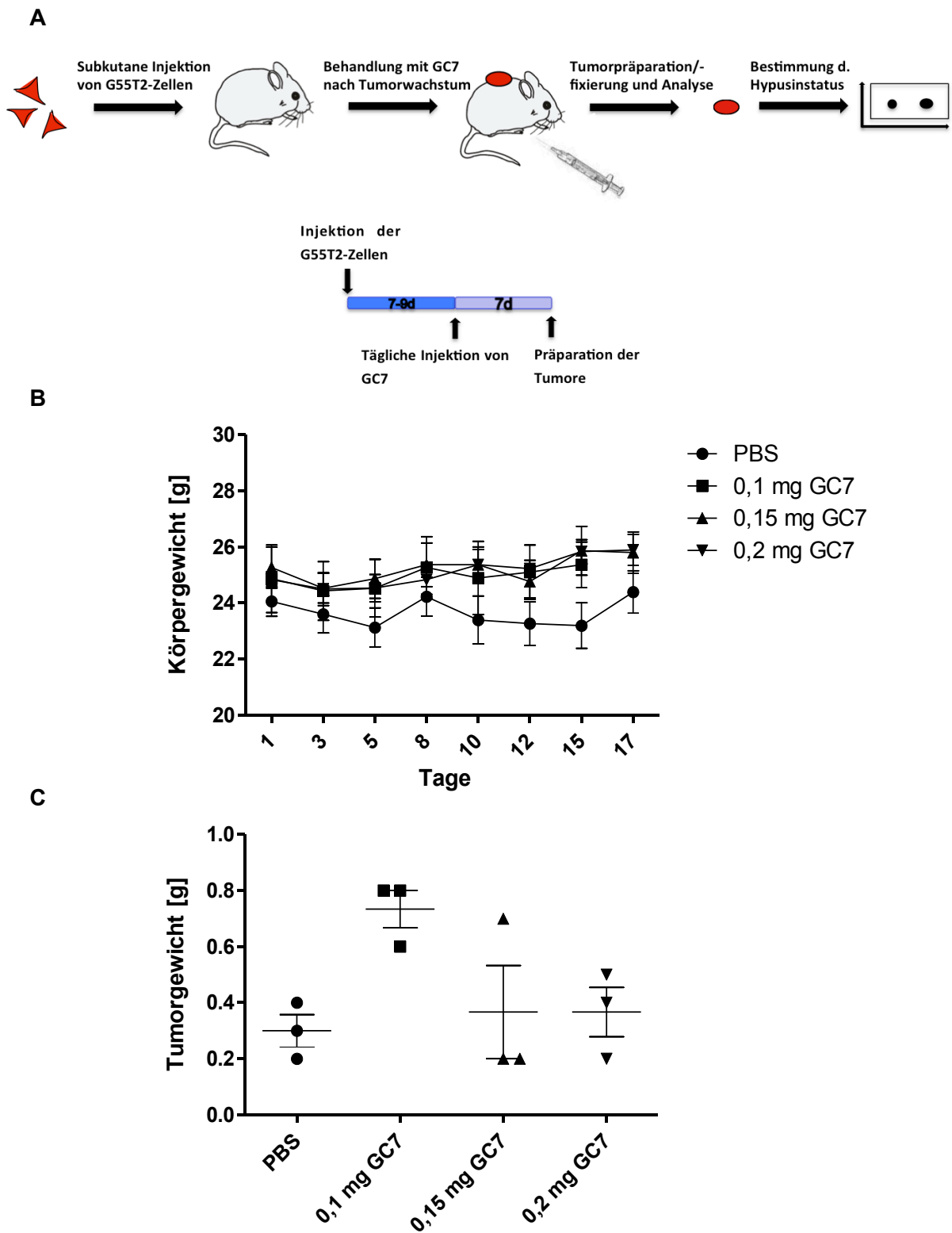


Abb.: 20 Versuchsablauf der *in vivo* Xenograft-Experimente und der Effekt von GC7 in einem *in vivo* G55T2-Xenograftmodell auf das Gewicht der Tiere und Tumormasse. (A) Versuchsablauf der *in vivo* Xenograft-Experimente mit G55T2-Zellen. G55T2-Zellen wurden subkutan dorsal in NSG-Mäuse injiziert. Nach erfolgreichem Anwachsen und Tumorbildung wurde täglich GC7 i.p. verabreicht. Nach sieben-tägiger Behandlung wurden die Tumore präpariert, gewogen, vermessen und für Proteinextraktionen/immunohistochemische Färbungen konserviert. Der Hypusinstatus (und damit die Wirkung von GC7) wurde mittels 2D-Western-Blot bestimmt (B) Verlauf des Körpergewichtes von NSG-Mäusen nach subkutaner Injektion von G55T2-Zellen und täglicher Behandlung mit 0,1 mg, 0,15 mg, 0,2 mg GC7, bzw. PBS als Lösemittelkontrolle (Mittelwert \pm SEM). (C) Tumorgewicht nach 7 Tagen GC7-Behandlung. (Gewicht der einzelnen Tumore und Mittelwert/Kohorte \pm SEM).

Behandlung zu bemerken (struppiges Fell, auffällige Stellen). Auch wies keines der Tiere eine Abweichung vom normalen Verhalten auf. Nach 7 Tagen GC7-Behandlung wurden die Tiere geopfert, die Tumore präpariert und gewogen. Hierbei zeigte sich kein signifikanter

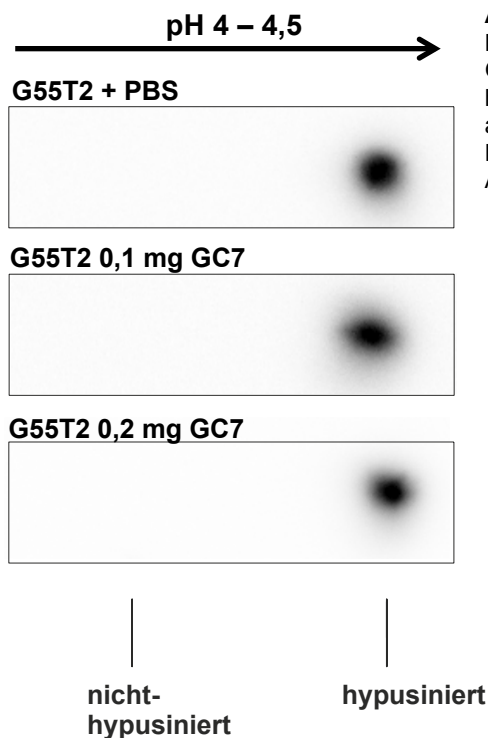


Abb.: 21 Hypusinstatus der G55T2-Zellen aus GC7-behandelten NSG-Mäusen. Subkutane Tumore wurde aus den Kontrolltieren und GC7-behandelten Exemplaren präpariert und Proteinlysate hergestellt. 25 µg Proteinlysate wurden in einer 2D-SDS-Page aufgetrennt (erste Dimension pH 4 – 7, zweite Dimension 15% SDS-Page) und eIF-5A, nach einem Western-Blot, mit einem spezifischen Antikörper markiert.

Unterschied zwischen Tumoren aus den Kontrolltieren (Mittelwert 0,3 g) und den Tieren, die mit 0,15 mg (0,367 g), bzw. 2 mg (0,37 g) GC7 behandelt wurden. Die Tumore aus der Kohorte, die mit 0,1 mg GC7 behandelt wurden, behielten ihre höhere Wachstumsrate im Vergleich zu den restlichen Tieren mit Tumoren bei, was sich in einer größeren Tumormasse (Mittelwert 0,73 g) äußerte (Abb.: 20B). Um herauszufinden, ob der ausbleibende Effekt von GC7 auf das Wachstum der G55T2-Zellen *in vivo* trotz DHS-Inhibition zustande kommt, oder GC7 mit dem verwendeten Protokoll keine ausreichende DHS-Inhibition erreicht, wurde der Hypusinstatus von eIF-5A in den Tumorzellen untersucht. Hier für wurde ein 2D-Western-Blot mit Lysaten der präparierten Tumore (Tumor aus Tieren, die mit PBS, 0,1 mg und 0,2 mg GC7 behandelt wurden) durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass der Hypusinstatus von eIF-5A sich in GC7 behandelten Tumoren nicht von unbehandelten unterschied. Es konnte also keine Akkumulation von unhypusiniertem eIF-5A beobachtet werden (Abb.: 21).

3.3 Erstellung einer *eIF5a2*-„Knockout“-Maus

3.3.1 Herstellung des *eIF5a2*-Zielkonstruktes

Auf Grundlage der Sequenzinformation des *eIF5a2*-Gens (Bezeichnung des murinen Homologs zum humanen *eIF-5A*-Gen) wurde eine Klonierungsstrategie und der zu deletierende Sequenzbereich gewählt. Dieser Bereich umfasst die Exons 1 – 3 und schließt

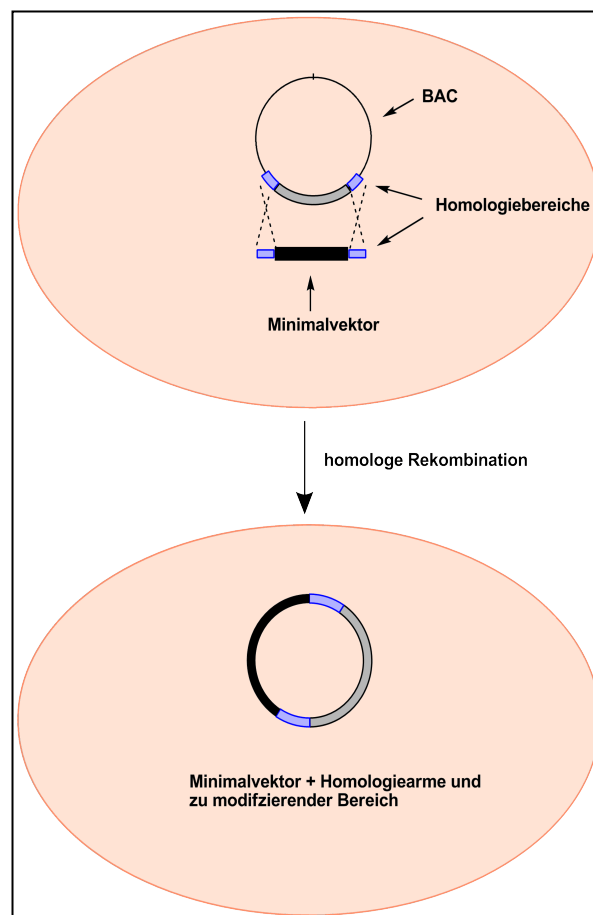


Abb.: 22 Schematische Darstellung der Subklonierung durch homologe Rekombination. Ein linearer Minimalvektor (schwarz) mit homologen Bereichen (blau) zum BAC wird in einen *E.coli*-Klon elektroporiert, der ein BAC mit dem zu modifizierenden DNA-Abschnitt (grau) trägt.

damit den Translationstart und das Lysin⁵⁰ in Exon 2, welches die kritische Hypusinmodifikation trägt, mit ein. Wie in Kapitel 1.2.7 beschrieben, dient das BAC RP23-361F2 als Ausgangspunkt für die Klonierung des Vektorkonstruktes. Hierbei wurde die Methode des „Recombineering“ (Klonierung mittels homologer Rekombination) verwendet (exemplarisch dargestellt in Abb.: 22). Die Integrität des *eIF5a2*-Gens in dem BAC wurde zunächst durch Sequenzierungen bestätigt. Dann wurde der Minimalvektor pStartK durch eine PCR amplifiziert und, mittels der Primer, Homologiearme, die 5' und 3' des *eIF5A2*-Gens liegen, angefügt. Das PCR-Produkt wurde durch eine Agarosegelelektrophorese

überprüft (Abb.: 23A) und aufgereinigt. Die Klonierung von *eIF5a2* und der angrenzenden Bereiche in pStartK erfolgte durch eine RedET-vermittelte homologe Rekombination. Der

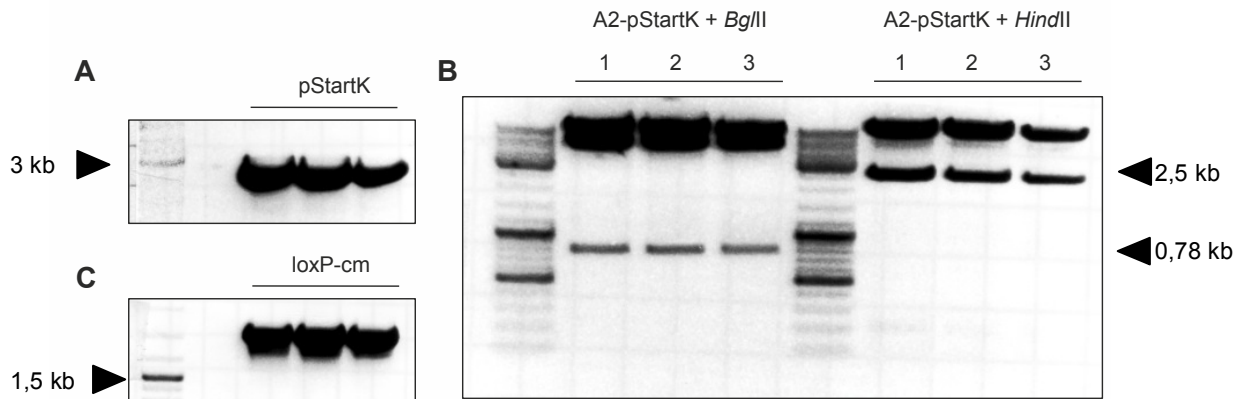


Abb.: 23 Klonierung eines Teilbereichs von *eIF5a2* und angrenzender chromosomaler Bereiche in den Minimalvektor pStartK und weitere Modifikation. (A) PCR-Produkt des pStartK-Minimalvektors mit angefügten Homologiearmen. (B) Nachweis der erfolgreichen Rekombination des gewünschten *eIF5a2*-Abschnitts in den Minimalvektor pStartK, durch Restriktionsverdau mit *Bgl*II, bzw. *Hind*III. (C) loxP-cm-loxP-Kassette nach Amplifikation durch PCR (1,7 kb groß).

Erfolg der validiert (Abb.: 23B). Anschließend wurde die loxP-cm-loxP-Kassette mittels PCR amplifiziert (Abb.: 23C). In diesem Schritt wurden Homologiearme angefügt, die einem Bereich vor Exon 1 von *eIF5a2* entsprechen. Nach Aufreinigung der ca. 1,7 kb großen Kassette, wurde sie in einen pRedET positiven (also Rekombinationskompetenten) Klon

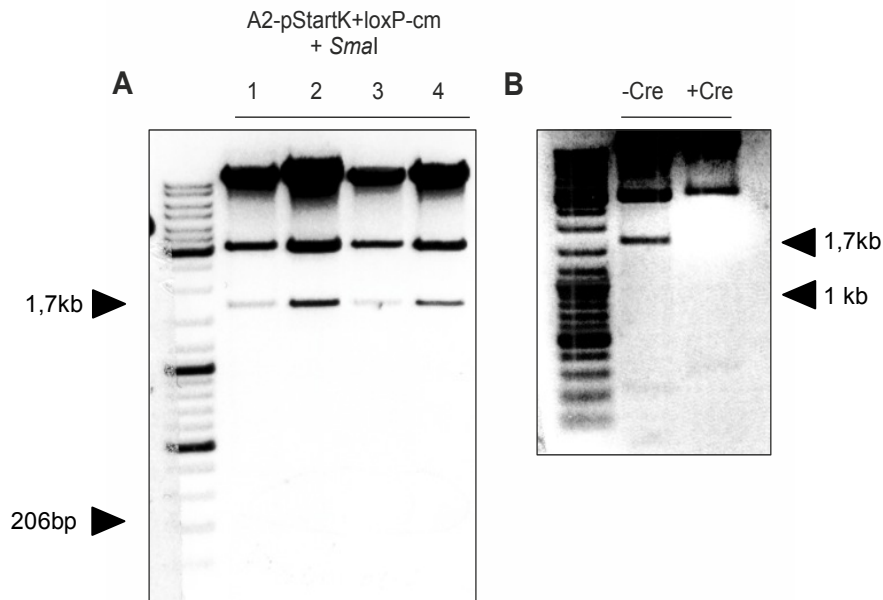


Abb.: 24 Nachweis der loxP-cm-loxPKassette und Validierung der Cre-vermittelten Excision der Resistenzkassette. (A) Die erfolgreiche Insertion der loxP-cm-loxP-Kassette wurde in 4 Klonen durch Restriktionskartierung mit *Sma*I überprüft. Die unterste Bande entspricht der Kassette (B) Das Herausschneiden der Kassette durch die Cre-Rekombinase wurde ebenfalls durch einen *Sma*I-Verdau bestätigt. Die Abwesenheit der 1,7 kb-Bande bestätigt die erfolgreiche Entfernung der Kassette.

elektroporiert, der bereits das eIF5a2-pStartK Konstrukt trug. Durch die anschließende Rekombination wurde die Kasette in das eIF5a2-Gen eingefügt. Durch die somit erworbene

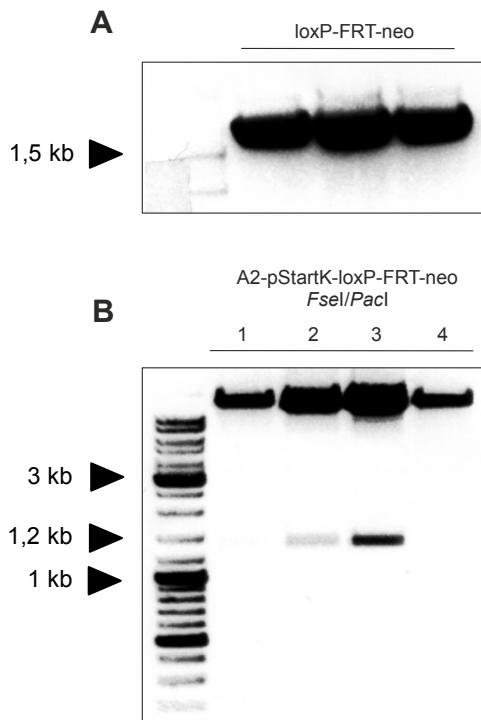


Abb.: 25 Amplifikation der loxP-cm-neo-FRT-Kasette und Nachweis der erfolgreichen Integration in den A2-pStartK-Vektor. (A) Nachweis der spezifischen Amplifikation der loxP-FRT-cm-neo-FRT-Kasette mit angefügten Homologierarmen. (B) Nachweis der Integration der Kasette in vier gepickten Klonen durch Restriktionsverdau mit *FseI/PacI*. Bei vorhandener Kasette zeigt sich eine Bande bei ca. 1,2 kb (siehe Klon 2 und 3).

Cm-Resistenz, konnte eine entsprechende Antibiotikaselektion durchgeführt werden. Vier Cm-resistente Klone wurden gepickt und die Integration der Kasette durch Restriktionsanalyse mit *SmaI* überprüft. *SmaI* schneidet 5' und 3' der Kasette, daher lässt sich ihre Anwesenheit durch eine spezifische 1,7 kb-Bande bestätigen (Abb.: 24A). Hierbei stellte sich heraus, dass alle 4 Klone auch eine sehr schwache Bande bei 206 bp aufweisen. Dies bedeutet, dass die Klone einen kleinen Anteil an Vektoren enthalten, welche die Kasette nicht integriert haben, aber trotzdem propagiert werden, da die Vektoren mit Kasette eine ausreichende Cm-Resistenz vermitteln. Um diese loxP-cm-loxP-negativen Vektoren zu entfernen, wurde die Plasmid-DNA von Klon 2 und 4 präpariert. Die Vektoren wurden mit dem einmal schneidenden *NruI* („single-cutter“) verdaut, um die ineinander verwundenen Moleküle zu trennen und anschließend religiert und in *DH5α* transformiert. Durch eine anschließende Restriktionsanalyse mit *SmaI*

wurde bestätigt, dass keine loxP-cm-loxP-negativen Plasmide mehr vorhanden waren (Abwesenheit der 206 bp Bande, die nur bei loxP-cm-loxP-negativen Plasmide, nicht aber in den Plasmiden mit Resistenzkasette auftritt).

Im nächsten Schritt wurde die loxP-cm-loxP-Kasette durch eine Cre-vermittelte Rekombination wieder herausgeschnitten, so dass nur eine einzelne loxP-Stelle zurückblieb. Die erfolgreiche Entfernung der Kasette wurde durch eine Restriktionsanalyse mit *SmaI* bestätigt (Abb.: 24B). Die 1,7 kb große Kasette ist nach der Rekombination nicht mehr nachweisbar. Durch eine Sequenzierung wurde die Anwesenheit der loxP-Stelle bestätigt. Die Insertion der zweiten loxP-Stelle erfolgte analog zur Ersten. Die zweite Resistenzkasette (loxP-FRT-cm-neo-FRT) trägt neben einer loxP-Stelle auch zwei Flp-Stellen, die von der Flp-Rekombinase erkannt werden. Die Kasette wurde mittels PCR amplifiziert und die Homologearme zur Integration zwischen Exon 3 und 4 von eIF5a2 im

selben Schritt mit angefügt (Abb.: 25A). Nach der RedET-vermittelten Rekombination wurde der erfolgreiche Einbau der loxP-FRT-cm-neo-FRT-Kassette durch einen Restriktionsverdau bestätigt, wie an der spezifischen 1,2 kb-Bande zu erkennen ist (Abb.: 25B).

Anschließend wurde der modifizierte *eIF5a2*-Genomabschnitt mit der integrierten loxP-Stelle und loxP-FRT-Kassette in den Vektor pWS-TK6 kloniert. Dieser Vektor enthält eine Kassetten, die eine Negativselektion der transfizierten ES-Zellen ermöglicht (wenn z.B. die G418-Selektion nicht effektiv genug abläuft). Zudem enthält der Vektor eine einzigartige Restriktionsschnittstelle zur Linearisierung. Das modifizierte *eIF5a2*-Fragment wurde mittels einer einfachen „Gateway“-Rekombination vom pStartK-Vektor in den pWS-TK6-Vektor übertragen. Die notwendigen Homologiebereiche waren bereits in die Vektoren kloniert¹²⁸.

Nach der Rekombination wurde ein Klon gepickt und der entstandene Vektor (A2-pWS-TK6 benannt) durch Restriktionskartierung mit *NcoI*, bzw. *FseI* überprüft. Der Restriktionsverdau

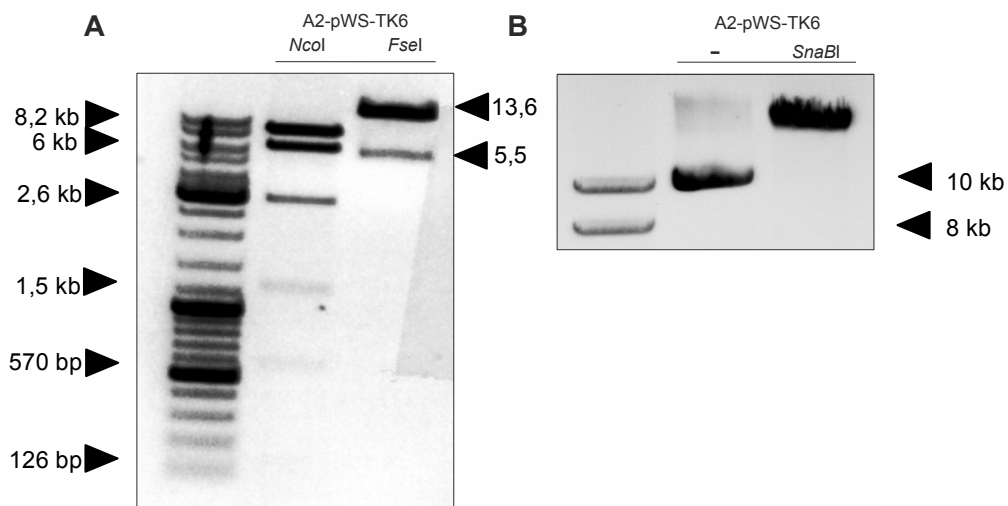


Abb.: 26 Klonierung des modifizierten *eIF5a2*-Abschnittes in den pWS-TK6-Vektor und Linearisierung. (A) Restriktionsverdau von A2-pWS-TK6 mit *NcoI*, bzw. *FseI*, um die korrekte Klonierung in den pWS-TK6-Vektor zu bestätigen. (B) Linearisierung des A2-pWS-TK6-Vektors für die Elektroporation/Rekombination in murinen ES-Zellen. Der linearisierte Vektor hat, aufgrund seiner offenen Form, eine geringere elektrophoretische Mobilität, als der unverdaute Vektor.

mit *NcoI* sollte Fragmente der Größe 8,2 kb, 6 kb, 2,6 kb, 1,5 kb, 570 bp und 126 bp ergeben. Dieses Muster konnte bestätigt werden (Abb.: 26A), allerdings ist die 126 bp Bande nur sehr schlecht zu erkennen. Die erwarteten Fragmentgrößen nach einem Verdau mit *FseI* betragen 13,6 kb und 5,5 kb. Auch dieses Bandenmuster konnte bestätigt werden. Die Homologiearme an den Enden des *eIF5a2*-Abschnittes, die erste loxP-Stelle und die eingefügte Resistenzkassette wurden jeweils sequenziert, um den endgültigen Zielvektor zu validieren. Um den Vektor für die Elektroporation in die murinen ES-Zellen vorzubereiten, wurde er mit *SnaBI* linearisiert und dies mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (Abb.: 26B). A2-pWS-TK6 wurde nach der Linearisierung durch eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion aufgereinigt und mit Ethanol präzipitiert. Der so aufgereinigte Zielvektor wurde dann für die Elektroporation in murine ES-Zellen verwendet.

3.3.2 Verifizierung positiver Klone nach Elektroporation des A2-pWS-TK6-Vektors in murine ES-Zellen

Um die korrekte Integration des modifizierten *eIF5a2*-Abschnitts an die richtige Stelle des Mausgenoms zu überprüfen, wurde ein Southern-Blot verwendet (durchgeführt von PD Dr. Hermans-Borgmeyer). Die Durchführung wurde zuerst mit muriner genomischer Wildtyp-DNA (gDNA) getestet. Der Verdau der gDNA erfolgte mit zwei verschiedenen Chargen des Restriktionsenzymes *Hind*III (Abb.: 27A). Anschließend wurde die DNA geblottet und mit der

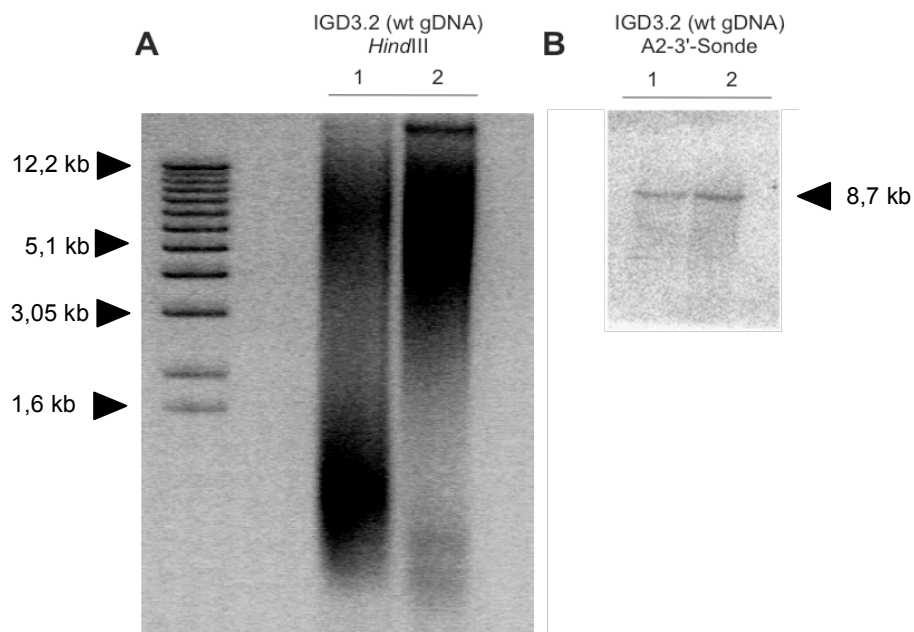


Abb.: 27 Test der *eIF5a2*-Sonde mit muriner gDNA. (A) Genomische wt-DNA wurde mit zwei verschiedenen Chargen *Hind*III verdaut (1 und 2), elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. (B) Southern-Blot der verdauten DNA, inkubiert mit der radioaktiv markierten *eIF5a2*-Sonde.

markierten Sonde inkubiert. In beiden Kontrollansätzen konnte die erwartete Bande von 8,7 kb detektiert werden (Abb.: 27B).

Nach der Elektroporation des A2-pWS-TK6-Vektors, Expansion und G418-Selektion der ES-Zellen, wurden 300 Klone gepickt, die gDNA extrahiert, mit *Hind*III verdaut und für den Southern-Blot eingesetzt. Allerdings konnte hierbei kein positiver Klon identifiziert werden. Eine Integration des „geflochten“ *eIF5A2*-Gens in eine der selektierten ES-Zellen konnte mit dieser Methode nicht gezeigt werden.

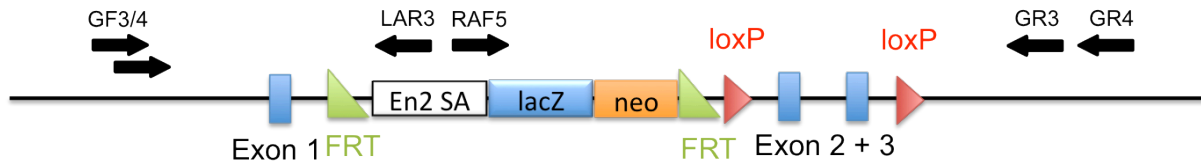


Abb.: 29 Schematische Darstellung des modifizierten *eIF5a2*-Abschnitts in den IKMC-*eIF5a2*-ES-Zellen. Dargestellt sind die Positionen der Neo-lacZ-Kassette, der FRT- und loxP-Stellen und die Bindestellen der Primer, die für die LR-PCR eingesetzt wurden. GF3 und 4 sind genspezifisch und liegen 5' vom 5'-Homologiearm. GR3 und 4 sind ebenfalls genspezifisch, liegen aber 3' vom modifizierten Bereich. LAR3 und RAF5 sind, für die Resistenzkassette, spezifische Primer.

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Identifikation eines ES-Klons mit integriertem *eIF5a2*-pWS-TK6-Konstrukt, wurde zusätzlich ein ES-Klon des internationalen Knockout-Maus Konsortiums (IKMC) verwendet. Dieser beinhaltet bereits das „gefloxt“ *eIF5a2*-Gen, eine Neomycin-Resistenzkassette und weitere Modifikationen (siehe 1.2.8). Die Integration des modifizierten *eIF5a2* an der richtigen genomischen Position wurde mittels LR-PCRs bestätigt. Die dafür verwendeten Primer lagen zum einen außerhalb des 5'-, bzw. 3'-Homologiearms (genspezifischer Primer; Abb.: 29) und zum anderen in der Resistenzkassette des Konstruktes (konstante kassettenpezifische Primer). Die erwartete Produktgröße lag für das Primerpaar GR3/RAF5 bei 8,5 kb und für GR4/RAF5 bei 9,1 kb.

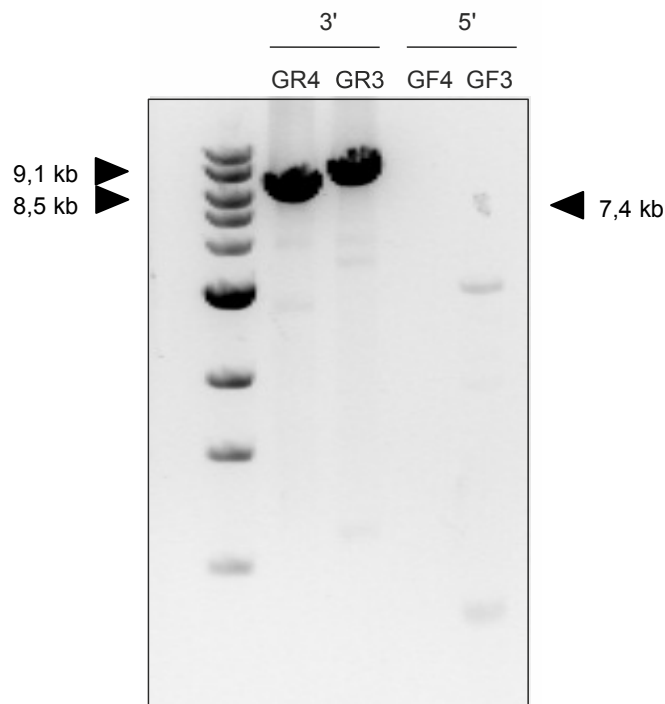


Abb.: 28 Nachweis der korrekten Integration des „gefloxt“ *eIF5a2* in das Genom von IKMC-ES-Zellen mittels LR-PCR. Mit den genspezifischen 3'-Primern konnten die erwarteten PCR-Produkte amplifiziert werden (8,5 kb und 9,1 kb). Für die 5'-Seite konnte kein spezifisches Produkt amplifiziert werden.

Beide Produkte konnte durch die LR-PCR amplifiziert werden. Für die 5'-Seite des modifizierten Bereichs lagen die erwarteten Produktgrößen für die Primerpaare GF3 und GF4 mit LAR3 bei jeweils ca. 7,4 kb (Abb.: 28). Für diese Seite des modifizierten Genabschnitts gelang allerdings keine Amplifikation. Ein Vergleich des entsprechenden Vektorbereichs, des BACs und verfügbaren Sequenz in der Datenbank des „National Center

for Biotechnology Information“ (NCBI; Mus musculus strain C57BL/6J chromosome 3, GRCm38 C57BL/6J) ergab Abweichungen in der Sequenz BAC/Vektor und Datenbanksequenz. Die vom IKMC gewählten Primer GF3 und 4 liegen in einem Bereich, der in der BAC-Ursprungssequenz (und damit auch im Zielvektor) nicht vorhanden ist. Entsprechend können die Primer dort nicht binden.

Unabhängig davon wurden die IKMC-ES-Zellen für die Blastozysteninjektion eingesetzt. Aus dieser Injektion ging ein einzelner chimärer Bock hervor (55% Chimärenanteil). Eine zweite Injektion erbrachte fünf chimäre Böcke mit Chimärenanteilen zwischen 40% und 70%. Im Alter von 8 Wochen wurden die chimären Böcke (Chimärenanteil > 50%) mit je zwei C57BL/6J-Weibchen verpaart.

3.3.3 Nachweis des heterozygot „gefloxten“ *eIF5a2*

Aus diesen Verpaarungen gingen 12 Nachkommen hervor, die mittels PCR genotypisiert wurden, um eine Keimbahntransmission des „gefloxten“ *eIF5a2* und damit eine Weitergabe der Genmodifikation an die Nachkommen nachzuweisen. Hierfür wurden zwei Primerpaare verwendet. Das erste Paar (*eIF5a2*-5'-arm und *eIF5a2*-3'-arm) überspannt die neo-Resistenzkassette. Daher ergibt sich ein PCR-Produkt von 403 bp im Wildtyp (+/+) und 7472 bp für das „gefloxte“ Allel (+/loxP-Kan-neo) welches bei dem verwendeten PCR-Protokoll nicht amplifiziert wird, da hierfür die Extensionszeit nicht ausreichend ist. Da die genotypisierten Nachkommen nur heterozygot für das „gefloxte“ *eIF5a2* sein können, ist das 403 bp-Produkt in jedem Falle detektierbar und dient daher als Positivkontrolle für die PCR.

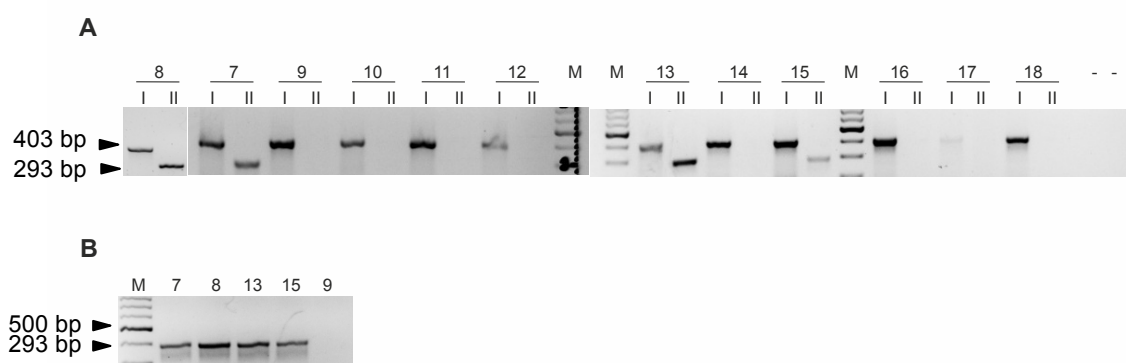


Abb.: 30 Genotypisierung der Nachkommen von *eIF5a2*-Chimären und C57BL/6J-Tieren. (A) Die Anwesenheit der FRT-Kan-neo-FRT-loxP-Kassette wurde mit kassetten- und genspezifischen Primern nachgewiesen. In vier der 12 Tieren konnte das entsprechende Produkt amplifiziert werden (Ansatz II; Bande bei 293 bp). Als Positivkontrolle für die PCR-Reaktion diente jeweils Ansatz I (Bande bei 403 bp). (B) Bestätigung der ersten Genotypisierungs-PCR. Die vier positiven Klone aus (A) zeigen ebenfalls ein kassettenspezifisches Produkt. Als Negativkontrolle wurde die gDNA eines Tieres genommen, dass in der ersten PCR bereits negativ war (Tier Nr.9).

Das zweite Primerpaar (eIF5a2-5'-arm und LAR3) ergibt kein Produkt im +/+ Genotyp und ein 293 bp-Produkt beim +/loxP-Kan-neo Genotyp. Die PCR war für alle Tiere erfolgreich (bei Tier Nr. 17 ist allerdings nur wenig Produkt zu sehen), in allen Ansätzen ist das 403 bp-Produkt zu erkennen (Abb.: 30A). Vier der Tiere weisen das 293 bp-Produkt auf, sind also heterozygot-positiv für das „gefloxt“ *eIF5a2*. Die Genotypisierung wurde mit einem weiteren Primerpaar bestätigt (eIF5a2-for und loxR-r). Der „forward“-Primer bindet in *eIF5a2* und der reverse Primer in der Resistenzkassette. Entsprechend gibt es kein PCR-Produkt im Wildtyp (Tier Nr. 9) und ein 385 bp-Produkt bei Anwesenheit der Kassette im Falle der vier positiven Tiere (Nr. 7, 8, 13 und 15; Abb.: 30B).

Die positiven Tiere, die das modifizierte *eIF5a2* und die Resistenzkassette beinhalten, können nun für die weiteren Schritte verwendet werden. Dazu gehört die Verpaarung mit einer FLP-Deleter-Maus, um die evtl. störende Resistenzkassette zu exzisieren. Weiterhin müssen die daraus resultierenden Nachkommen miteinander verpaart werden, um homozygot „gefloxt“ Tiere zu erhalten. Diese können dann mit entsprechenden Cre-Deleter-Mäusen verpaart werden, um *eIF5a2* im gesamten Organismus auszuschalten, oder einen gewebs-, bzw. zeitspezifischen „Knockout“ durchzuführen. Aus Zeitgründen konnten diese weiterführenden Schritte im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht durchgeführt werden.

4 Diskussion

Hypusin ist eine ungewöhnliche Aminosäure, die nur als Konsequenz einer einzigartigen, posttranslationalen Modifikation vorkommt. Ziele dieser Modifikation sind, zumindest in Menschen und Mäusen, die Proteine eIF-5A und eIF-5A2, die in einer Vielzahl zellulärer Prozesse eine Rolle spielen. Zudem werden sie, wie auch die hypusinbildenden Enzyme DHS und DOHH, mit einer Reihe von Erkrankungen in Verbindung gebracht. Dazu gehören AIDS, *Diabetes mellitus* und Krebserkrankungen (vergl. Abschnitt 1.2.3 und 1.2.4). Die Bedeutung von eIF-5A oder -A2 in malignen Erkrankungen, insbesondere in Ovarial- und hepatozellulären Karzinomen, sowie der chronischen-myeloischen Leukämie, wurde bereits eingehend untersucht. Die pro-proliferativen und evtl. sogar tumorinitiierenden Eigenschaften von hypusiniertem eIF-5A und die extrem hohe Spezifität der Hypusinierung machen die hypusinbildenden Enzyme zu einem interessanten Ziel für die Behandlung dieser Erkrankungen. Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine mögliche Rolle der Hypusinmodifikation in Glioblastomen zu untersuchen. Da Glioblastompatienten, trotz der Weiterentwicklung chirurgischer, radiotherapeutischer und pharmakologischer Ansätze, weiterhin eine geringe Überlebenserwartung haben, bietet sich diese Erkrankung für die Entwicklung neuer und experimenteller Behandlungswege an.

eIF5-A2 ist die zweite Isoform, die in *Homo sapiens* und *Mus musculus* hypusiniert wird. Es ist eine Isoform von eIF-5A1 und weist eine starke Homologie zu diesem auf. Allerdings ist seine Expression auf wenige Gewebe bzw. Entwicklungsstufen beschränkt (vergl. Abschnitt 1.2.1). Dies legt nahe, dass beide Proteine trotz starker Sequenzähnlichkeit unterschiedliche Funktionen haben, auch wenn sich die beiden Proteine in Hefen komplementieren können. Zudem wurde insbesondere eIF-5A2 mit neoplastischen Erkrankungen in Verbindung gebracht (eIF-5A hingegen seltener), was die Hypothese der differentiellen Funktionen unterstreicht. Aus diesem Grund war ein Ziel dieser Arbeit die Herstellung einer konditionalen eIF5-A2 KO-Maus. Da Mäuse, analog zum Menschen, zwei Isoformen besitzen, könnte ein solches KO-Modell genutzt werden die grundlegenden Funktionen von eIF-5A2 besser zu verstehen, aber auch Hinweise darauf geben, mit welchen Auswirkungen auf den Organismus im Falle einer pharmakologischen Inhibierung der Hypusinsynthese zu rechnen ist.

4.1 Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A und die Hypusinmodifikation in Glioblastomen

4.1.1 eIF5A und die hypusinbildenden Enzyme weisen in Glioblastomen ein erhöhtes Expressionsniveau auf

Die pro-proliferativen Eigenschaften von eIF-5A und die anti-proliferativen Eigenschaften einer verminderten Hypusinbildung wurden bereits vielfach beschrieben (erstmalig von Park *et al.*¹³¹). Um eine mögliche Rolle von eIF-5A und den hypusinbildenden Enzymen in Gliomen zu evaluieren, wurden zunächst Tumorgewebeproben von 173 Gliompatienten untersucht. Hierbei konnte eine generelle Überexpression von eIF-5A in Tumorzellen und eine Hochregulation von DHS und DOHH in Abhängigkeit vom Tumorgrad festgestellt werden. Diese Resultate deuten darauf hin, dass hypusiniertes eIF-5A in der Bildung oder Progression von Gliomen, insbesondere Glioblastomen, eine Rolle spielt. Diese Hypothese wurde dadurch unterstützt, dass eine Expression von eIF-5A, -A2 und DHS in Proben von zwei nicht-Gliompatienten fast ausschließlich in Neuronen, im Ependym und weiteren neuronalen Zelltypen, aber kaum in Astrozyten nachgewiesen werden konnte. Dies ist in Übereinstimmung mit Daten, die durch den „Human Proteome Atlas“ bereitgestellt werden (<http://www.proteinatlas.org>). Auch dort werden gliale Teile des ZNS (inklusive Astrozyten) als negativ für eIF-5A befunden, während Neuronen eine schwache bis moderate Expression aufweisen (insb. im zerebralen Kortex). Die DHS- und DOHH-Expression wurde im „Human Proteome Atlas“ als moderat in Gliazellen und stärker in Neuronen beschrieben. Die immunhistochemischen Daten, die eine relativ geringe Expression in Astrozyten und anderen Gliazellen beschreiben, unterstützen die Hypothese einer möglichen Rolle von hypusiniertem eIF-5A in der Transformation oder Proliferation der Tumorzellen, da Glioblastome wahrscheinlich aus Vorläuferzellen entlang der neuronalen Stammzellen-Astrozyten-Achse oder dedifferenzierten Astrozyten hervorgehen¹³². Des Weiteren kann anhand der Daten einer kürzlich durchgeführten Genexpressionsstudie (REMBRANDT-Datenbank; www.caintegrator.nci.nih.gov/rembrandt; National Cancer Institute) gezeigt werden, dass Gliompatienten mit einer hohen eIF-5A-Expression eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit haben, verglichen mit Patienten, die eine mittlere Expression ausweisen ($P = 0,043$; Mittelwert aller Reporter; siehe Anhang). In einem weiteren Expressionsdatensatz (verfügbar durch das „Cancer Genome Atlas Research Network“), wurde eine Überexpression von zwei eIF-5A-Transkripten in GBMs festgestellt⁹¹ ($P = 0,344$ und $P = 0,000181$). Das primäre Transkript von DHS ist ebenfalls hochreguliert ($P = 0,0408$). Im Gegensatz dazu ist die Expression der DOHH nicht verändert. Interessanterweise sind

jedoch zwei miRNAs, deren putatives Ziel die DOHH-mRNA ist, in GBM-Tumoren stark herunterreguliert (für beide $P < 0,0001$). Dies unterstreicht eine biologische Signifikanz der Hypusinmodifikation in Glioblastomen. Eine Überexpression, bzw. verminderter mRNA-Abbau sind die einzigen veränderten Mechanismen von eIF-5A und der Hypusinbildenden Enzyme. Bisher konnten keinerlei Mutationen für eIF-5A1/2, DHS und DOHH in GBMs gefunden werden¹³³.

4.1.2 Die DHS-Inhibition hat einen antiproliferativen Effekt auf GBM-Zellen und induziert p53-abhängige Seneszenz

Um aktives eIF-5A als ein mögliches therapeutisches Ziel in Glioblastomen zu evaluieren, wurden entsprechende Tumorzelllinien mit GC7, einem etablierten Inhibitor der DHS, behandelt und der antiproliferative Effekt ermittelt. Als Modell für nicht-maligne Zellen wurden primäre Astrozyten verwendet. GC7 reduzierte hierbei deutlich die Proliferation der GBM-Zellen und löste zudem morphologische Veränderungen aus, während ein solcher Effekt in primären Astrozyten nicht auftrat. Der Effekt von GC7 in den verwendeten Zellmodellen war allerdings zytostatisch und nicht zytotoxisch, wie in einigen anderen (nicht von Gliomen

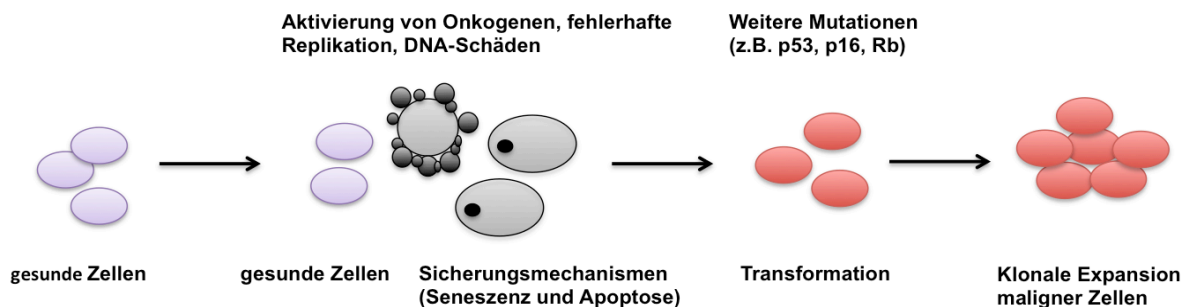


Abb.: 31 Transformation von gesunden zu malignen Zellen und die Rolle von Seneszenz und Apoptose bei diesem Prozess. Seneszenz und Apoptose bilden eine wichtige Barriere gegen die Auswirkung von Onkogenen, DNA-Schäden und Replikationsfehlern. Der Verlust von Tumorsuppressoren (z.B. p53, p14^{ARF}, p16 und Rb) ist notwendig, um diese Sicherungsmechanismen zu umgehen. Seneszenz/Apoptose erhöhen damit die Anzahl der nötigen Mutationen, die eine Zelle akquirieren muss, bevor sie eine maligne Transformation durchläuft und damit zur Tumorzelle wird.

abgeleiteten) Krebs- und Zellmodellen^{32,134,135}. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zelluläre Seneszenz als ein Grund für den GC7-induzierten Proliferationsarrest unter GC7-Behandlung festgestellt werden. Dies zeigte sich in den U87-MG-Zellen, die unter Behandlung positiv für die seneszenzassoziierte β -Galactosidase (SA β -Galactosidase) sind. Dabei handelt es sich um einen spezifischen Standardmarker für die Seneszenz. Unter Seneszenz versteht man ein zelluläres Programm, bei dem Zellen, beispielsweise durch die Aktivierung von Onkogenen wie RAS/BRAF und exzessiven mitogenen Signalen, durch die Akkumulation von DNA-Schäden oder dysfunktionale Telomere^{136–138}, in einen stabilen

Zellzyklusarrest gehen (erstmalig beschrieben von Hayflick¹³⁹). Dieser Zustand stellt eine wichtige Barriere gegen die Entwicklung von Tumoren *in vivo* dar^{136,140} (vergl. Abb.: 31). Der Prozess der Seneszenz ist komplex und hängt sowohl vom zellulären Kontext als auch vom Stimulus ab^{136,141,142}. Die Induktion von Seneszenz ist hierbei in Signalwege verwoben, die ebenfalls bei Formen des programmierten Zelltodes (z.B. Apoptose, Nekrose, lysosomaler Membranpermeabilisation (LMP), Autophagie und mitotische Katastrophe) eine wichtige Rolle spielen¹⁴³. Im Gegensatz zu den verschiedenen Formen des Zelltodes bleiben die Zellen hierbei viabel und weisen einen aktiven Stoffwechsel auf. Die teilweise Überlappung der Signalwege bei Seneszenz und bei den verschiedenen Formen des programmierten Zelltodes untereinander verdeutlicht, dass diese Mechanismen teilweise untereinander als „*backup*“-Sicherungssysteme gegen eine Transformation der Zellen dienen. Wenn bei einem Ausfall eines Faktors (z.B. durch Mutationen) die Komponenten eines anderen Sicherungssystems noch funktionell sind, kann dies weiterhin zum Zelltod oder Wachstumsstopp der betroffenen Zelle führen. Die Induktion der Apoptose und Nekrose hängen von einem Proteinkomplex („Riptosom“) und Caspasen (insb. Caspase 8 und 3) ab. Dies führt u.A. zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die im Zellkern DNA-Schäden verursachen und darauf reagierende Prozesse aktivieren. Zudem aktiviert das Riptosom die JUN N-terminale Kinase (JNK), was über eine Reihe von Signalwegen zur Induktion von Autophagie und LMP führt. Die Seneszenz wiederum kann sowohl durch die ROS-vermittelten DNA-Schäden, als auch durch die JNK-Aktivität induziert werden¹⁴⁴, ist also in beide Signalwege des „klassischen“ und des „alternativen“ Zelltodes eingebunden und spielt daher eine entsprechend wichtige Rolle bei der Reaktion von Zellen auch verschiedenste Stressfaktoren.

Neben der Expression der SA β -Galactosidase nach DHS-Inhibition in dem hier verwendeten *in vitro* GBM-Modell wurde die beobachtete Seneszenz von einer Hochregulation des p53-abhängigen Effektor p21^{Waf1/Cip1} (ein Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor und Zellzyklusregulator) begleitet. Dieser Faktor spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Induktion der zellulären Seneszenz (siehe Abb.: 32). Die Expression von p21^{Waf1/Cip1} kann in Abhängigkeit von p53 reguliert werden¹⁴⁵. Weiterhin konnte p21^{Waf1/Cip1} als einer der entscheidenden p53-abhängigen Faktoren für die seneszenspezifische, transkriptionelle Genregulation ermittelt werden¹⁴⁶. Es ist damit einer der wichtigsten Faktoren für die Etablierung des Seneszenzphänotyps. Da U87-MG-Zellen Deletionen für die Proteine p16 und p14ARF aufweisen⁸⁸, welche ebenfalls wichtige Regulatoren der Seneszenz sind, kann angenommen werden, dass der beobachtete Seneszenzphänotyp auf p21^{Waf1/Cip1} als hauptsächlichen Regulator angewiesen ist. Diese Hypothese wird dadurch bekräftigt, dass eine reduzierte Phosphorylierung von AKT in GC7-behandelten U87-MG-Zellen zu beobachten war. Phosphoryliertes AKT wurde als ein Inhibitor von p21^{Waf1/Cip1} beschrieben

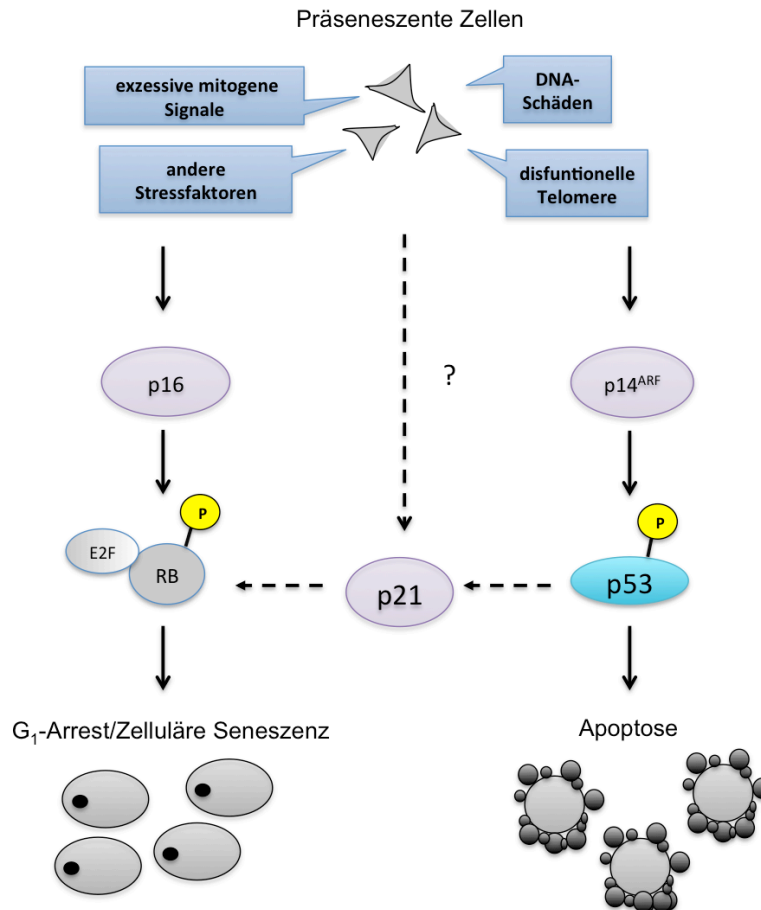


Abb.: 32 Schematische Darstellung der Signalwege zur Induktion von Seneszenz. Der Seneszenzphänotyp kann durch verschiedene Stressoren ausgelöst werden. Zu diesen Stressoren gehören z.B. dysfunktionale Telomere, DNA-Schäden oder exzessive mitogene Signale, beispielsweise durch die Aktivierung von Onkogenen. Zudem gibt es weitere, weniger gut untersuchte Auslöser, wie Störungen in der Chromatinstruktur oder andere, nicht-genotoxische Stressfaktoren¹⁶. Viele dieser Faktoren können insbesondere über den p14^{ARF}/p53-Weg Apoptose auslösen. Seneszenz kann ebenfalls über diesen Weg und p21^{Waf1/Cip1} oder einen p16/RB-abhängigen Signalweg Seneszenz induzieren. Zudem existieren p14^{ARF}- und p16-unabhängige Signalkaskaden, die zu einer Seneszenz führen. Dies ist beispielsweise in den U87-MG-Zellen zu beobachten, in denen die Gene für diese Proteine deletiert sind, aber trotzdem Seneszenz induziert werden kann. Allerdings sind diese zusätzlichen Signalwege nur wenig verstanden.

und seine reduzierte Aktivität trägt zur p21^{Waf1/Cip1}-vermittelten Seneszenz bei¹⁴⁷. Solche p16- und p14^{ARF}-unabhängigen Signalwege, die zur Induktion von Seneszenz führen wurden bereits beschrieben. Zhou *et al.* konnten nachweisen, dass Mausfibroblasten aus Mäusen mit deletiertem *Ink4a/Arf*-Locus (enthält das Doppelgen, dass für p16 und p14^{ARF} kodiert), selbst bei inaktiviertem p53 seneszent werden können¹⁴⁸. Sie konnten zeigen, dass diese Seneszenz hauptsächlich von der cyclinabhängigen Kinase 4 (Cdk4) und ebenfalls p21^{Waf1/Cip1} abhängt. Im Gegensatz zu den beschriebenen Beobachtungen zeigten G55T2-Zellen, die ebenfalls auf die GC7-Behandlung ansprechen, keine Anzeichen einer zellulären Seneszenz. Da diese Zellen eine *Loss-of-function*-Punktmutation in p53 aufweisen, findet die entsprechende Signalweiterleitung, die sonst zu einer p21^{Waf1/Cip1}-Expression führt, nicht statt. Zudem weisen diesen Zellen Deletionen von p16 und p14^{ARF} auf⁸⁸. Die Abwesenheit dieser beiden Schlüsselregulatoren und von aktivem p53 führt dazu, dass sie nicht in der Lage sind, eine Seneszenz zu induzieren. Die Bedeutung der regulatorischen p53/

p21^{Waf1/Cip1}-Achse für die GC7-induzierte Seneszenz wird noch ersichtlicher, wenn Wildtyp-p53 wieder in G55T2-Zellen exprimiert wird. Diese transduzierten Zellen zeigen einen Seneszenzphänotyp, sobald sie mit GC7 behandelt werden, jedoch nicht solche Zellen, die mit einem Kontrollvektor transduziert wurden. Diese Ergebnisse werfen ein wenig mehr Licht auf Verbindung zwischen eIF-5A und p53, die zuerst von Li *et al.* und Rahman-Roblick *et al.* beschrieben wurde^{37,149}. Rahman-Roblick und Kollegen beschrieben eine Hochregulation von eIF-5A nach der Induktion der p53-abhängigen Apoptose. Li *et al.* konnten eine Erhöhung des p53-Levels und eine vermehrte Expression einiger Zielproteine, wie p21^{Waf1/Cip1} und Mdm2 nach einer exogenen Überexpression von eIF-5A nachweisen. Allerdings wurde in der Arbeit von Li *et al.* der Hypusinstatus von eIF-5A nicht überprüft. Dieses könnte, im Falle einer exogenen Überexpression und ohne eine entsprechende komplementierende Überexpression der DHS, unter Umständen nicht ausreichend hypusiniert werden¹¹. Es verbleibt damit im inaktiven Zustand, dessen (u.U.) proapoptotische Funktionen dann zum Tragen kommen und entsprechend p53-Signalwege aktivieren^{5,6}. Daher bleibt es unklar, ob die Überexpression oder die Akkumulation von unhyposiniertem eIF-5A eine Rolle bei der p53-Aktivierung spielt. Allerdings deuten die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurden, darauf hin, dass letzteres der Fall ist, da GC7-behandelte Zellen schnell unhyposiniertes eIF-5A anreichern. Weiterhin unterstreichen die Ergebnisse die Rolle von p53 in eIF-5A-abhängigen, regulatorischen Mechanismen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine klare Verbindung zwischen der DHS-Inhibition, Akkumulation von unhyposiniertem eIF-5A, Zellzyklusarrest und der Induktion einer p53-abhängigen, zellulären Seneszenz hergestellt werden konnte. Die Inhibition der DHS führte allerdings auch zu einer verminderten Proliferation in G55T2-Zellen, die nur über ein inaktiviertes p53 verfügen. Dies unterstreicht, dass funktionelles eIF-5A ebenfalls an der Regulation von p53-unabhängigen Prozessen beteiligt ist und deren Beeinflussung ebenfalls zu vermindertem Wachstum führt. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass eine beträchtliche Anzahl von Glioblastomen einen deaktivierten p53 Tumorsuppressor aufweisen. Da die genaue biologische Funktion von eIF-5A noch unbekannt ist, lässt sich allerdings nicht sagen, worauf diese p53-unabhängigen Effekte beruhen oder wie nachhaltig sie wirken. Eine mögliche Hypothese wäre, dass ohne aktives eIF-5A der mRNA-Transport und/oder die Translation von zellzyklusspezifischen (und notwendigen) Faktoren ausbleibt, was zu einem (zumindest temporären) G₁-Arrest, auch in p53-negativen Zellen führt.

Da es sich bei GC7 um ein Polyaminanalogon handelt, könnte es unter Umständen (z.B. ab einer gewissen Konzentration) andere polyaminabhängige Prozesse beeinflussen. Die Verwendung von nicht-spermidinähnlichen DHS-Inhibitoren (z.B. CNI-1493) könnte helfen, diese möglichen unspezifischen Effekte zu umgehen¹⁵⁰. Um solche Nebenwirkungen als hauptsächlichen Wirkmechanismus von GC7 in GBM-Zellen auszuschließen, wurde die DHS

durch die stabile Expression eines shRNA-Pools, der gegen die DHS-mRNA gerichtet war, herunterreguliert. Dies führte zu einer signifikant reduzierten Proliferation und zu einem Phänotyp, ähnlich dem von GC7-behandelten Zellen. Die Herunterregulation von eIF-5A durch einen shRNA-Pool führte hingegen nur zu einer moderaten Reduktion des Zellwachstums. Für diesen Gegensatz zu Zellen mit reduzierter DHS-Aktivität könnte es zwei mögliche Erklärungen geben. (i) eIF-5A wird in den verwendeten GBM-Zellen sehr stark exprimiert und die transduzierten shRNAs sind nicht in der Lage, eine ausreichende Herunterregulation zu gewährleisten, bzw. die verbleibende Menge an eIF-5A ist weiterhin ausreichend, um die entsprechenden Funktionen in der Zelle aufrecht zu erhalten. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit kein Wachstumsunterschied zwischen Zellen mit einer mittleren (ca. 50%) und einer sehr starken Herunterregulation (ca. 90%) von eIF-5A beobachtet werden. (ii) Unmodifiziertes eIF-5A ist weiterhin in der Zelle vorhanden, wenn die DHS inhibiert und herunterreguliert wird, nicht jedoch bei einem „Knockdown“ von eIF-5A selbst. Diese Form hat proapoptotische Eigenschaften, die zu einem antiproliferativen Effekt nach DHS-Inhibition beitragen können. Zwar konnte keine Apoptose in den verwendeten Zellen festgestellt werden, aber andere, noch unbekannte antiproliferative Effekte von unhyposiniertem eIF-5A können nicht ausgeschlossen werden.

4.1.3 GC7 und alkylierende Substanzen haben einen additiven, antiproliferativen Effekt auf GBM-Zellen *in vitro*

Die Behandlung von Glioblastompatienten mit DNA-schädigenden Wirkstoffen, wie z.B. BCNU oder TMZ, ist der derzeitige Standard bei der adjuvanten Therapie nach chirurgischer Entfernung des Tumors. Daher war es eine interessante Fragestellung, ob eine DHS-Inhibition das Potential hat, durch TMZ/BCNU ausgelöste, antiproliferative Effekte zu unterstützen. Der G₂/M-Arrest (resultierend in zellulärer Seneszenz und/oder Apoptose) der durch TMZ induziert wird, wurde bereits beschrieben^{129,151}. Die hier präsentierten Ergebnisse legen einen additiven Effekt bei kombinierter Behandlung von Zellen mit TMZ/BCNU und GC7 nahe, was sich in einer verbesserten Reduktion der Zellproliferation äußert. Dies spiegelt sich auch im Zellzyklus der behandelten Zellen wieder. Sie zeigen eine Mischung aus GC7-induzierten G₁- und TMZ/BCNU-charakteristischen G₂/M-Arrest, begleitet von einer Ansammlung von polyploiden Zellen. Daher lässt sich vermuten, dass der verbesserte antiproliferative Effekt der Kombinationstherapie durch eine gleichzeitige Inhibition des Zellzyklus an G₁/S- und G₂/M-Kontrollpunkten zustande kommt. Da TMZ und BCNU keinen Effekt auf den Hypusinstatus von eIF-5A haben (vergl. Abschnitt 3.2.6), würde die Kombination von alkylierenden Substanzen und DHS-Inhibitoren einen zweigleisigen Ansatz zur Bekämpfung von GBM-Zellen bieten. Leider konnte kein pro-apoptotischer Effekt durch

eine DHS-Inhibition in GBM-Zellen beobachtet werden. Auch in Zellen, die bereits einem Stress durch Alkylantien ausgesetzt waren, konnte ein solcher Effekt nach veränderter Hypusinierung nicht induziert werden. Dies bedeutet, dass eIF-5A und die Hypusinmodifikation in GBM-Zellen eine Rolle bei der Kontrolle von Proliferation und Zellwachstum spielen, jedoch (vermutlich aufgrund von genetischen Veränderungen) nicht in der Lage sind, regulatorisch auf apoptotische Prozesse zu wirken. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass die Induzierung der Apoptose oder anderen Formen des Zelltodes als der „heilige Gral“ in der pharmakologischen Krebstherapie gilt. Sie verringert die Tumormasse und führt zu einer Reduktion der Krebszellen im Organismus. Die therapeutischen Möglichkeiten der zellulären Seneszenz hingegen sind noch weitestgehend unbekannt. Es bleibt zu bedenken, dass seneszente Zellen durch die Ausschüttung verschiedenster Zytokine und Wachstumsfaktoren mit ihrer Umgebung kommunizieren, was sowohl pro-, als auch anti-tumorigene Effekte haben kann^{152–155}. Daher war der therapeutische Nutzen einer Seneszenzinduzierung fraglich. Allerdings konnte kürzlich gezeigt werden, dass seneszente Zellen, zumindest in der Leber, vom Immunsystem erkannt und beseitigt werden. Hier konnten Kang et al. nachweisen, dass seneszente Zellen durch die Ausschüttung von Zytokinen (insb. IFN- γ) eine CD4⁺-T-Zell-Antwort auslösen und so weitere Immunzellen rekrutieren, welche die prä-malignen Zellen beseitigen¹⁵⁶. Ein Ausbleiben dieses Mechanismus konnte in immundefizienten Mäusen (Entwicklung von hepatozellulären Tumoren) und bei immunkompromitierten Menschen (Akkumulation von seneszenten Zellen, z.B. bei HIV-Patienten und immunsuprimierten Organempfängern) beobachtet werden. Da p53, wie oben beschrieben, einer der zentralen Faktoren für die Induktion einer Seneszenz ist, könnte dies auch erklären, warum GBM-Tumore schnell und häufig p53-Mutationen akquirieren und so der Immunüberwachung des Organismus entgehen. Dies bedeutet allerdings auch, dass eine DHS-Inhibition in GBMs wahrscheinlich einen starken Selektionsdruck ausübt und p53-negative Zellen selektiert. Auch TMZ zeigte *in vitro* eine Abhängigkeit von p53, um einen dauerhaften Zellzyklusarrest auszulösen¹⁵¹. Allerdings sind p53-negative Zellen durch die Behandlung mit TMZ ebenfalls nicht in der Lage, den Zellzyklus korrekt zu durchlaufen, und werden dadurch polyploid, was in dieser Arbeit ebenfalls beobachtet werden konnte. Dadurch werden die Zellen in einen apoptoseunabhängigen Zelltod, die mitotische Katastrophe, getrieben. Hier stellt sich die Frage, ob die DHS-Inhibition diesen Prozess positiv unterstützen könnte, oder eher einen hinderlichen Effekt hat, da weniger Zellen in die G₂-M-Phase des Zellzyklus gehen. Prinzipiell kann unhyposiniertes eIF-5A auch eine p53-unabhängige Apoptose auslösen. Sun *et al.* konnten zeigen, dass die Expression einer hypusindefizienten eIF-5A-Mutante in HeLa S3-Zellen, einer humanen Zervixadenokarzinomlinie, einen Caspase 3, 8 und 9-abhängigen Zelltod auslöst¹³⁵. Diese Zellen sind allerdings p53-negativ. Die Autoren stellen die

Hypothese auf, dass die Apoptose daher durch p73, ein Protein mit hoher Homologie zu p53, induziert wird. Da allerdings eine Induktion der Apoptose in GBM-Zellen nicht beobachtet werden konnte, ist davon auszugehen, dass hierbei weitere Faktoren eine Rolle spielen. Diese können z.B. vom zellulären Hintergrund oder weiteren Mutationen abhängen und beeinflussen, in welchen Phänotyp sich eine DHS-Inhibition und die Akkumulation von unhyposinertem eIF-5A äußert. Andererseits sind eIF-5A und die Hypusinsynthese hochkonserviert, und es ist bisher keine Resistenz gegen die Inhibierung dieses Systems bekannt. Dies könnte die Wahrscheinlichkeit reduzieren, dass Tumorzellen die Inhibition der Hypusinsynthese einfach durch redundante Mechanismen, wie es beispielsweise von Signaltransduktionswegen bekannt ist, umgehen können.

Ein weiterer Aspekt bei der Inhibition der Hypusinsynthese wurde vor kurzem von Scuoppo *et al.* beschrieben. Sie konnten in einem *in vivo* B-Zell-Lymphommodell zeigen, dass eIF5A, DHS und Enzyme des Polyaminsyntheseweges (die durch die Bereitstellung von Spermidin indirekt an der Hypusinsynthese beteiligt sind) unabhängig vom p53-Status als Tumorsupressor fungieren können¹⁵⁷. Sie konnten zudem nachweisen, dass eine Co-Deletion von *eIF5A* und *AMD1* (beteiligt an der Polyaminsynthese) in humanen B-Zell-Lymphomen gehäuft vorkommt. Die Autoren vermuten, dass hierbei jeweils eine heterozygote Deletion pro Gen vorliegt (insgesamt also zwei onkogene „Treffer“), da ein starker *Knockdown* eines der beiden Gene *in vivo* zu wenig viablen Zellen führt. Eine solche Tumorsupressorfunktion von eIF-5A wurde vorher noch nicht beschrieben, was wiederum die zellkontextabhängige Rolle von eIF-5A widerspiegeln könnte. Daher müsste diese Tumorsupressorfunktion im Rahmen einer systemischen Inhibierung der Hypusinsynthese bedacht werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier präsentierten Daten eine wichtige Rolle von eIF-5A und den hypusinsynthetisierenden Enzymen für die Proliferation von Glioblastomzellen etablierten. Es konnte zudem eine grundsätzliche Durchführbarkeit der DHS-Inhibition zur Wachstumsreduktion von GBM-Zellen gezeigt werden. Zudem wurde erarbeitet, dass nicht-maligne, primäre Astrozyten durch die GC7-Behandlung nicht in ihrer Proliferation beeinträchtigt werden. Da eIF-5A, DHS und DOHH in den malignen Zellen überexprimiert werden, könnte sich damit ein therapeutisches Fenster für eine pharmakologische DHS-Inhibition bieten.

4.2 Etablierung einer *eIF-5A2* Knock-out Mauslinie

Über die Funktionen von *eIF-5A2* *in vivo* ist bisher wenig bekannt. Die hohe Sequenzähnlichkeit von 84% zu *eIF-5A*⁶ spricht einerseits für grundsätzlich ähnliche Funktionen, das räumlich und zeitlich sehr unterschiedliche Expressionsmuster andererseits

spricht jedoch dafür, dass die beiden Proteine unterschiedliche Funktionen erfüllen. In Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden bisher die meisten Analysen zur Aufklärung der Funktionen von eIF-5A und –A2 durchgeführt. Hier gibt es ebenfalls zwei Formen (Hyp1p und Hyp2p), wobei die Deaktivierung jeweils eines der beiden Proteine keine Auswirkung zu haben scheint¹⁵⁸, die Deaktivierung beider Formen ist jedoch letal. Beide Formen können durch eIF-5A und –A2 aus anderen eukaryotischen Spezies supplementiert werden. Dies spricht dafür, dass die grundlegenden Funktionen der beiden Formen in *S. cerevisiae*, zumindest weitestgehend, übereinstimmen. Möglicherweise haben sich differenziertere Eigenschaften der beiden eIF-5A-Proteine erst im weiteren entwicklungsgeschichtlichen Verlauf herausgebildet. Daher wurde als Modellsystem für höhere Eukaryoten die Maus (*Mus musculus*) gewählt. Hier ist der Prozess des Gen-Knock-outs gut etabliert und da *Mus musculus*, wie *Homo sapiens*, über zwei eIF-5A-Formen verfügt, scheint eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen wahrscheinlich. Eine embryonale Letalität durch den eIF-5A2 Knock-out kann nicht ausgeschlossen werden da die Funktion von eIF-5A2 weitestgehend unbekannt ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass zumindest eine transgene Überexpression *in vivo* zu einer verringerten Aktivität von p19 führt. Dies wiederum hat eine Destabilisierung von p53 zu Folge. Dies führt letztlich zu genomischer Instabilität⁴⁷. Da eine Manipulation von *eIF5a2* somit durchaus weitreichende Folgen haben könnte, wurde eine konditionale KO-Strategie gewählt. Dies ermöglicht eine gezielte, gewebs- oder zeitspezifische Deaktivierung des Zielgens und ist auch vor dem Hintergrund der eIF-5A2-Expression in nur relativ wenigen Geweben interessant.

4.2.1 Die Herstellung von murinen ESCs mittels eines konstruierten Zielvektors ergab keine nachweisbar positiven Klone

Für die Herstellung des Zielvektors wurde die Methode der homologen Rekombination mittels RedET-Klonierung gewählt¹⁵⁹. Die Methode wurde etabliert, um Selektionsmarker und Erkennungssequenzen für Rekombinationsenzyme in subklonierte Fragmente der Zielgene zu inserieren. Diese Methode, welche die *in vivo* Rekombination zwischen homologen DNA-Fragmenten in Bakterien ermöglicht, beruht auf der Verwendung von zwei viralen Rekombinationsenzymen, die über ein Plasmid in *E. coli* eingeschleust werden. PCR-Produkte, die jeweils eine Selektionskassette und Erkennungssequenzen für die Cre-, bzw. Flp-Rekombinase enthielten, wurden amplifiziert und im selben Schritt Sequenzen über die Primer angefügt, die zum gewünschten Integrationsort homolog sind. Hierbei stellte sich heraus, dass nicht immer eine freie Wahl des Integrationsortes möglich war. Da die Primer aufgrund ihrer Länge dazu neigen, mit sich selbst oder dem zweiten Primer Dimere zu bilden, ist die Wahl des Integrationsortes u.U. durch die Nukleotidsequenz

und -zusammensetzung eingeschränkt. Auch die Anwesenheit von hochrepetitiven Sequenzen schränkte die Wahl möglicher Integrationsstellen ein. Solche Sequenzen wurden durch den Suchalgorithmus von Repeatmasker¹⁶⁰ detektiert und als Zielsequenzen für die Rekombination ausgeschlossen. Als weiteres Problem dieser Methode stellte sich heraus, dass nach einer Rekombination gelegentlich modifizierte und nicht-modifizierte Plasmide zusammen in den *E.coli*-Zellen vorkamen. Diese ließen sich auch durch eine starke Verdünnung der Plasmide nicht voneinander trennen, vermutlich da die verschiedenen Plasmide ineinander verwunden sind. Dieses Problem konnte durch enzymatisches Schneiden der Plasmide und Religation gelöst werden. Insgesamt stellt die RedET-Klonierung eine durchaus schnelle und reproduzierbare Methode zur Generierung von KO-Zielvektoren dar, ohne jedoch so unkompliziert und zeitsparend zu sein, wie es zunächst den Anschein erweckt. Zumindest nicht, wenn sie neu etabliert werden muss oder der zu modifizierende Bereich in einer eventuell problematische Sequenz liegt.

Für die Elektroporation des Zielvektors wurden C57BL/6N-embryonale Stammzellen (ESCs) aus der JM8.F6-Linie verwendet¹⁶¹. Diese Zellen erst vor relativ kurzer Zeit entwickelt und der wissenschaftlichen Gemeinschaft zugänglich gemacht worden und haben gegenüber den herkömmlichen 129/X1 × 129/S1 ESCs den Vorteil, dass sie aus C57BL/6N-Mäusen gewonnen wurden und daher nahezu den gleichen genetischen Hintergrund haben, wie die in der Serviceeinheit Transgene Tiere verwendeten C57BL/6J-Mäuse. Daher entfällt die sonst sehr zeitaufwändige Rückkreuzung nach der Keimbahntransmission, da sich die C57BL/6N- und C57BL/6J-Linien genetisch nur äußerst geringfügig unterscheiden¹⁶¹. Zudem verfügen diese Zellen über ein wiederhergestelltes Agouti-Gen (codiert die Fellfarbe), so dass die daraus hervorgehenden Tiere über eine braune Fellfarbe verfügen. Dies ermöglicht den Nachweis einer erfolgreichen Blastozysteninjektion, da sich C57BL/6N-Anteile (braun) und C57BL/6J-Anteile (schwarz) in den Chimären so abschätzen lassen. C57BL/6J-Inzuchtmäuse werden am häufigsten für KO-Experimente genutzt. Die meisten Deleter- und anderen Linien sind auf diesen genetischen Hintergrund gekreuzt. Daher ist auch der Phänotyp der C57BL/6J sehr gut charakterisiert. Tiere der 129-Linie, aus der bisher meist die ESC für die Elektroporation des Zielvektors stammten, hingegen zeigen öfter schlechtere Zuchtergebnisse und unerwünschte/unerwartete Phänotypen⁵².

Nach der Elektroporation des Zielvektors in die ES-Zellen konnten zwar mehrere hundert G418-resistente Klone herangezogen werden, allerdings konnte kein positiver Klon mittels Southern-Blot ermittelt werden. Hierfür gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Zum einen kann die Anwesenheit von hochrepetitiven Sequenzen in den Homologiearmen des Zielvektors zu einer Rekombination mit den entsprechenden repetitiven Sequenz im Genom kommen und so zu einer unspezifischen Integration führen. Die daraus resultierenden ESC-Klone wären ebenfalls resistent gegen G418, da sie die Resistenzkassette tragen, allerdings

nicht am richtigen genomischen *Locus*. Bei der Planung des Zielkonstruktes wurde die *eIF5a2*-Sequenz und die der angrenzenden Homologiearme mit RepeatMasker auf repetitive Sequenzen untersucht, um diesen Fall auszuschließen. Allerdings befinden sich auch repetitive Sequenzen innerhalb des *eIF5a2-Locus* (alle repetitiven Elemente zusammen machen 29,85 % der *eIF5a2*-Sequenz aus; siehe Anhang), so dass eine vollständige Abwesenheit von repetitiven Sequenzen nicht erreicht werden konnte. Eine weitere Möglichkeit ist, dass der Genort von *eIF5a2* in den ESCs transkriptionell inaktiv und daher die Chromosomenstruktur stark kondensiert ist. Die geschlossene Konformationen der DNA, wie sie im Heterochromatin vorliegen, verringern möglicherweise die Wahrscheinlichkeit einer homologer Rekombination^{162,163}. Sequenzunterschiede zwischen dem Zielkonstrukt und dem Genom der ESCs können ebenfalls die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Rekombination verringern. Allerdings wurde der Zielvektor sequenziert, um solche Mutationen auszuschließen. Die Länge der Homologiearme ist ebenfalls ausschlaggebend. Eine Gesamtlänge des Homologiebereiches von 8 – 15 kb und eine Länge von >1 kb pro Arm hat sich als effizient herausgestellt^{164,165}. Diese Parameter wurden beim Design des Zielvektors berücksichtigt. Zudem sind die Homologiearme bereits so lang, dass eine Verlängerung eine effektive Southern-Blot-Strategie unmöglich gemacht hätte. Anstelle des bisher verwendeten Konstrukts, das aus einem subklonierten modifizierten Genfragment in einem Klonierungsvektor besteht, könnte man auch ein modifiziertes BAC zur Elektroporation benutzen. Dieser enthält aufgrund seiner Größe einen sehr großen homologen Bereich und kann dadurch sehr effizient rekombinieren¹⁶⁶. Allerdings ist die Handhabung von BACs nicht unproblematisch, da sie aufgrund ihrer Größe dazu neigen, durch Scherkräfte (z.B. während der Präparation) in kleinere Stücke zu zerreißen. Zudem kann der Nachweis der homologen Rekombination hierbei nicht mit Southern-Blot Analysen erfolgen, sondern wird mit der FISH-Methode durchgeführt. Eine weitere Möglichkeit, um die Zahl Klone mit unspezifischer Integration des Konstrukts zu vermindern, wäre eine negative Selektion. Dabei werden Gene zur Expression der Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase (HSV-TK), oder des Diphtherie-Toxins an ein Ende des Konstrukts angefügt. Bei homologer Rekombination in ES-Zellen werden diese Kassetten nicht ins Genom integriert, bei zufälliger Integration hingegen wird das gesamte Konstrukt mit den Kassetten zur negativen Selektion integriert, was zum Absterben der Zellen führt. Die große Zahl an G418-resistenten Klonen, die in dieser Arbeit generiert wurden, könnte auch dafür sprechen, dass die Rekombination funktioniert und nur der Nachweis der positiven Klone das Problem darstellt. Um die Wahrscheinlichkeit dieses Problems einzugrenzen, wurden verschiedene Sonden für den Southern-Blot gewählt. Zudem wurden Sonden verwendet, die sowohl 5', als auch 3' des *eIF5a2-Locus* binden. Mit der 5'-bindenden Sonde konnte auch mit der murinen wt-gDNA, kein zufriedenstellendes Signal erreicht werden. Die 3'-bindende Sonde zeigte zwar ein

Signal in einem Kontrollversuch mit wt-gDNA, aber mit DNA, die aus den G418-resistenten Klonen extrahiert wurde, waren die Signal nicht zufriedenstellend (kein positives Signal oder unspezifische Signale). Dies spricht eher dafür, dass das Problem nicht an den Sonden liegt.

4.2.2 Mittels des IKMC-eIF5a2-Klons wurden Mäuse mit „gefloxtem“ *eIF5a2* generiert

In der Zeit, in der diese Arbeit angefertigt wurde, begann das Internationale Knockout-Maus Konsortium („International Knockout Mouse Consortium“; IKMC) damit systematisch Zielvektoren und ESCs mit „gefloxten“ Genen anzufertigen und sie der wissenschaftlichen Gemeinde zur Verfügung zu stellen. Die modifizierte Variante von *eIF5a2* wurde erst gegen Ende dieser Arbeit verfügbar. Da keine positiven Klone mit dem selbstklonierten Vektor hergestellt werden konnten, wurden Klone des IKMC (bzw. des europäischen Ablegers EuMMCR; Helmholtz Zentrum München Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH)) verwendet. Zum Zeitpunkt der Bestellung waren zwei Klone verfügbar, wobei einer der Klone die Qualitätskontrolle nicht bestand und als negativer Klon aussortiert wurde (A. Hörlein, EuMMCR, persönliche Kommunikation). Der verbliebene Klon, der für einen konditionalen KO genutzt werden kann, wurde für die weiterführenden Versuche verwendet. Interessanterweise kam es bei der Herstellung der KO-ESCs durch das IKMC zu Komplikationen, was letztendlich dazu führte, dass nur dieser einzelner Klon zur Verfügung stand (A. Hörlein, EuMMCR, persönliche Kommunikation). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es in der Tat chromosomale oder sequenzspezifische Eigenschaften im *eIF5a2-Locus* gibt, welche Rekombinationsprozesse und damit die Herstellung einer *eIF5a2*-KO-Maus erschweren.

Der verfügbare IKMC-Klon konnte durch eine LR-PCR 3'-seitig bestätigt werden. Die LR-PCR mit einem 5' vom modifizierten *eIF5a2*-Abschnitt bindenden Primer war nicht erfolgreich. Die interne Qualitätskontrolle des IKMC stieß auf dieselben Probleme, eine 5'-LR-PCR war dort ebenfalls nicht erfolgreich (<http://www.knockoutmouse.org/martsearch/project/72200>). Eine Sequenzierung des 5'-gelegenen genomischen Abschnitts ergab, dass es zwischen der Sequenz und der NCBI-Datenbank Unterschiede gibt. Eine Sequenzierung der gDNA von positiven Klonen die per LR-PCR analysiert wurden, ergab, dass es bestimmte, 5'-gelegene DNA-Bereiche nicht gibt, obwohl sie in der NCBI-Sequenz hinterlegt sind. Dazu gehört auch der Abschnitt, in dem der 5'-Primer für die LR-PCR liegt. Diese Unterschiede könnten genetische Variationen zwischen der Referenzsequenz (C57BL6/J) und dem Mausstamm, aus dem die ES-Zellen gewonnen wurden (C57BL6/N), darstellen. Auch Sequenzunterschiede zwischen den Ursprungszellen

und den einzelnen Subklonen, die während der Etablierung der C57BL6/N-ES-Zellen gewonnen wurden, könnte diese Varianz erklären. Aufgrund dieser Sequenzunterschiede zwischen Referenzsequenz und IKMC-eIF5a2-Klons kann eine PCR mit den IKMC-Primern kein PCR-Produkt ergeben. Die Primersequenzen für die LR-PCR wurden vom IKMC zur Verfügung gestellt und vermutlich anhand der NCBI-Sequenz designed. Eine mögliche Erklärung für die gescheiterte Genotypisierung anhand der 3'-gelegenen Primer könnte damit gefunden sein. Eine weitere 5'-LR-PCR-Strategie konnte im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen allerdings nicht mehr entwickelt werden. Der IKMC-eIF5a2-Klon wurde für zwei Blastozystentransfers eingesetzt. Die daraus resultierenden Nachkommen wiesen einen Anteil von 40 – 70% mit braunem Fell auf, d.h. der Transfer der modifizierten ESCs in die Blastozysten war erfolgreich. Tiere mit > 50% Chimärenanteil wurden weiter verpaart und die entsprechenden Nachkommen auf das Vorhandensein des modifizierten eIF5a2-Allels überprüft. Hierbei stellten sich vier der zwölf Tiere (33%) als positiv heraus, was leicht über der erwarteten Quote von 25% liegt. Zur Sicherheit wurden die vier Tiere mit einer weiteren PCR validiert, so dass die Anwesenheit der Resistenzkassette mit FRT- und loxP-Stellen eindeutig verifiziert wurde. Die weiteren Schritte zur Erstellung der KO-Maus konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter durchgeführt werden. Eine weitere Bearbeitung findet aber in der in Arbeitsgruppe Balabanov statt. Somit wird in den nächsten Monaten eine Maus mit gefloxtem eIF5a2 zur Verfügung stehen, die dann der wissenschaftlichen Gemeinde zur Verfügung steht und für KO-Studien genutzt werden kann.

4.3 Ausblick

Die Rolle der eIF-5A-Proteine und der beiden Hypusinierungsenzyme DHS und DOHH bei verschiedenen Erkrankungen, wie Neoplasien, HIV oder *Diabetis mellitus* wurde in einer Reihe von Studien untermauert. Dies lässt die Entwicklung und Verwendung von Hypusinierungsinhibitoren oder anderen Wegen, welche die Funktion von eIF5A beeinflussen, für Therapiezwecke sinnvoll erscheinen. Die erfolgreiche Anwendung von Nanopartikeln („SNS01-T“) in einer klinischen Studie zur Behandlung von multiplen Myelomen, die eine eIF5A-siRNA in Kombination mit einem Expressionsplasmid für eine hypusineffiziente, proapoptotische eIF5A-Mutante enthalten (vergl. Abschnitt 1.2.3), verdeutlicht, dass eIF-5A und der Hypusinsyntheseweg ein realistisches Ziel für gezielte Therapien darstellen kann. Allerdings ist hierfür beispielsweise die Entwicklung von DHS-Inhibitoren notwendig, die besser für die *in vivo*-Anwendung geeignet sind als GC7 oder andere, bisher verfügbare Moleküle. SNS01-T beispielsweise ist nur auf die Anwendung in multiplen Myelomen zugeschnitten. Mittels eines spezifischen Promotors wird die hypusineffiziente eIF-5A-Mutante nur in B-Zellen, von denen die Myelomzellen abgeleitet sind, exprimiert. Ein systemischer Einsatz von Hypusinierungsinhibitoren könnte sich als problematisch herausstellen, wenn man bedenkt, dass eIF-5A in nahezu allen Geweben exprimiert wird und daher eine generelle Bedeutung für den Organismus wahrscheinlich ist, daher wären klinische Studien diesbezüglich von besonderer Bedeutung, sobald entsprechende Inhibitoren zur Verfügung stehen. Die Verwendung gezielt wirkender Substanzen oder Therapieansätze, wie im Falle von SNS01-T, bietet sich daher sicher als eine vielversprechende Alternative an. Auch eine weitere Analyse der Wirkungsweise von Hypusinierungsinhibitoren in p53-negativen Tumorzellen wäre notwendig, um herauszufinden, ob eine Anwendung in solchen Tumoren grundsätzlich möglich und sinnvoll wäre. Zwar ist einer Verwendung (sofern sich die *in vitro* Daten *in vivo* bestätigen lassen) auch bei p53-negativen Neoplasien denkbar, da auch in diesen Fällen mit einer antiproliferativen Wirkung durch eine verminderte Hypusinierung zu rechnen ist. Allerdings sind pro-apoptotische oder, wie in dieser Arbeit gezeigt, seneszenzinduzierende Effekte anscheinend auf funktionelles p53 angewiesen. Es wurde allerdings auch eine p53-unabhängige, apoptoseinduzierende Wirkung von unhypusiniertem eIF-5A beschrieben (vergl. 4.1.3). Die Berichte über unterschiedliche Effekte von unhypusiniertem eIF-5A in Zellen verschiedener Herkunft deuten jedoch darauf hin, dass die entsprechenden regulatorischen Mechanismen und deren Abhängigkeit vom zellulären Hintergrund noch nicht ausreichend verstanden sind. Hierbei könnte die weitere Aufklärung und ein besseres Verständnis der grundlegenden Funktionen von eIF-5A, -A2 und der hypusinsynbildenden

Enzyme helfen.

Die in dieser Arbeit und mit Hilfe der IKMC-ES-Zellen erstellte *eIF5a2^{flox}*-Maus kann, dank ihres genetischen Hintergrundes, fast ohne Rückkreuzung weiter verwendet werden. Nach der Entfernung der neo-Kassette durch Verpaarung mit einer Flp-exprimierenden Maus, kann diese Mauslinie für die Kreuzung mit verschiedensten „Deleter“-Mäusen eingesetzt werden, um *eIF5a2* in unterschiedlichen Geweben oder Entwicklungsstadien zu deaktivieren und so Einsichten in seine grundlegenden biologischen Funktionen zu erlangen. Angesichts der hohen Expression von *eIF5a2* in Teilen des Gehirns wären „Deleter“, die eine Cre-Rekombinase in den entsprechenden Hirnbereichen exprimieren, nützlich um die Funktion von *eIF5a2* in neuronalen Strukturen des zentralen Nervensystems zu untersuchen. So können beispielsweise „Deleter“-Mäuse wie Nestin-Cre (KO im gesamten Hirn), D6-Cre (spezifisch für das Vorderhirn)¹⁶⁷ oder für die Cre-Expression in bestimmten Unterbereichen (z.B. der CA-1-Bereich des Hippokampus)¹⁶⁸ verwendet werden, um die neuronale Bedeutung von *eIF5a2* fein abgestimmt zu beleuchten. Auch für die Analyse der tumorigenen Funktion von *eIF5a2* in verschiedenen Organen, wie Kolon, Ovar oder Leber (siehe Abschnitt 1.2.3) könnte ein entsprechender KO nützlich sein, um bereits vorhandene klinische Daten bzw. *in vitro* Erkenntnisse zu ergänzen. Dies könnte dazu beitragen, die bisher äußerst begrenzten Daten über die Rolle von *eIF5a2 in vivo* zu vervollständigen und *eIF5a2* und die hypusinbildenden Enzyme als mögliche Ziele für die Behandlung von Krebserkrankungen weiter zu etablieren.

5 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Dr. Stefan Balabanov bedanke. Zum einen für die Möglichkeit an einem spannenden Thema zu arbeiten, dabei viel zu lernen, sowie für die Unterstützung und Betreuung während meiner Dissertation. Zum anderen aber auch für eine tolle Zeit innerhalb und außerhalb des Labors. Ich danke Prof. Joachim Hauber und PD Sabine Hoffmeister-Ullerich für die Betreuung der Doktorarbeit. Weiterhin danke ich Melanie Balabanov für sehr produktive und sehr unterhaltsame Gespräche, die viele Unterstützung und eine tolle Freundschaft. Ein weiterer Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe Balabanov und an die vielen Freunde am onkologischen Zentrum des UKEs, die ich währen meiner Dissertation kennen lernen durfte. Besonders möchte ich Henning Sievert, Nora Pällmann, Tine Baret, Jasmin Wellbrock und Tina Rohlfing für diese schöne Zeit danken. Ich vermisse die geselligen Mittagsrunden mit euch!

Für eine erfolgreiche Kooperation bedanke ich mich bei Prof. Christian Hagel, sowie bei den Mitgliedern der AG „Hans Dietrich Hermann Labor für Hirntumorbiologie“, ins. Prof. Katrin Lamszus und Dr. Alexander Schulte.

Für die aufopferungsvolle Unterstützung bei der Herstellung der *knock-out* Maus danke ich Sara Homann und Dr. Irm Hermans-Borgmeyer. Ihr gilt auch ein besonderer Dank für Ihren Einsatz bei der Durchführung des Aufbaustudiums Molekularbiologie.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und besonders Julia für ihre unerschöpfliche Unterstützung. Ich danke Euch allen!

6 Während dieser Arbeit entstandene Publikationen und Posterpräsentationen

Expression of Eukaryotic Initiation Factor 5A and Hypusine Forming Enzymes in Glioblastoma Patient Samples: Implications for New Targeted Therapies.

Michael Preukschas, Christian Hagel, Alexander Schulte, Kristoffer Weber, Katrin Lamszus, Henning Sievert, Nora Pällmann, Carsten Bokemeyer, Joachim Hauber, Melanie Braig, Stefan Balabanov; PLoS ONE 2012 7(8): e43468. doi:10.1371/journal.pone.0043468).

Proteomic profiling of germ cell cancer cells treated with aaptamine, a marine alkaloid with antiproliferative activity.

Dyshlovoy SA, Naeth I, Venz S, **Preukschas M**, Sievert H, Jacobsen C, Shubina LK, Gesell Salazar M, Scharf C, Walther R, Krepstakies M, Priyadarshini P, Hauber J, Fedorov SN, Bokemeyer C, Stonik VA, Balabanov S, Honecker F.J Proteome Res. 2012 Apr 6;11(4):2316-30.).

Protein-Protein-Interaction Network Organization of the Hypusine Modification System.

Sievert H, Venz S, Platas-Barradas O, Vishnu D, Schaletzky M, Nagel CH, Braig M, **Preukschas M**, Bokemeyer C, Brümmendorf T, Pörtner R, Walther R, Duncan K, Hauber J, Balabanov S; Molecular & Cellular Proteomics 2012 doi: 10.1074/mcp.M112.019059 mcp.M112.019059).

Heterozygous disruption of the deoxyhypusine hydroxylase gene is essential for embryonic development and adult organismal viability.

Sievert H, Pällmann N, Hermans-Borgmeyer I, Schweizer M, Fehr S, **Preukschas M**, Bokemeyer C, Braig M, Balabanov S: *In Vorbereitung*

Therapeutic potential of inhibited hypusine formation for treatment of glioblastoma multiforme

Michael Preukschas, Christian Hagel, Alexander Schulte, Kristoffer Weber, Katrin Lamszus, Henning Sievert, Nora Pällmann, Carsten Bokemeyer, Melanie Braig, Stefan Balabanov
European Multidisciplinary Cancer Congress 2011

Posterpräsentation

Comprehensive protein interaction network of the cancer related hypusine modification.

Sievert H, Venz S, Platas Barradas O, Schaletzky M, **Preukschas M**, Bokemeyer C, Pörtner R, Walther R, Balabanov S (2011): *EMBO Conference Cancer Proteomics 2011*

Posterpräsentation

A telomere-associated secretory phenotype (TASP) cooperates with BCR-ABL to drive malignant proliferation of murine hematopoietic stem cells

Melanie Braig, Nora Pällmann, **Michael Preukschas**, Doris Steinemann, Anne Gompf, Karl L. Rudolph, Andreas Schuppert, Stefan Balabanov and Tim H. Brümmendorf

Posterpräsentation in Vorbereitung

7 Literatur

1. Shiba, T., Mizote, H., Kaneko, T., Nakajima, T. & Kakimoto, Y. Hypusine, a new amino acid occurring in bovine brain. Isolation and structural determination. *Biochim. Biophys. Acta* **244**, 523–531 (1971).
2. Cooper, H.L., Park, M.H. & Folk, J.E. Posttranslational formation of hypusine in a single major protein occurs generally in growing cells and is associated with activation of lymphocyte growth. *Cell* **29**, 791–797 (1982).
3. Abbruzzese, A., Park, M.H. & Folk, J.E. Deoxyhypusine hydroxylase from rat testis. Partial purification and characterization. *J. Biol. Chem* **261**, 3085–3089 (1986).
4. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 2869–2873 (1981).
5. 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**, 101–109 (2001).
6. Clement, P.M.J. *et al.* Identification and characterization of eukaryotic initiation factor 5A-2. *Eur J Biochem* **270**, 4254–63 (2003).
7. 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**, 217–222 (2004).
8. 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 J* **273**, 1102–14 (2006).
9. Joe, Y.A., Wolff, E.C. & Park, M.H. Cloning and Expression of Human Deoxyhypusine Synthase cDNA. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 22386–22392 (1995).
10. Umland, T.C., Wolff, E.C., Park, M.H. & Davies, D.R. A new crystal structure of deoxyhypusine synthase reveals the configuration of the active enzyme and of an enzyme.NAD.inhibitor ternary complex. *J. Biol. Chem.* **279**, 28697–28705 (2004).
11. Park, M.H. The Post-Translational Synthesis of a Polyamine-Derived Amino Acid, Hypusine, in the Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A). *J Biochem* **139**, 161–169 (2006).

12. 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. *J. Biol. Chem* **268**, 13151–13159 (1993).
13. Park, J.-H., Wolff, E.C., Folk, J.E. & Park, M.H. Reversal of the deoxyhypusine synthesis reaction. Generation of spermidine or homospermidine from deoxyhypusine by deoxyhypusine synthase. *J. Biol. Chem.* **278**, 32683–32691 (2003).
14. 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 –56 (2006).
15. Kaiser, A., Khomutov, A.R., Simonian, A. & Agostinelli, E. A rapid and robust assay for the determination of the amino acid hypusine as a possible biomarker for a high-throughput screening of antimalarials and for the diagnosis and therapy of different diseases. *Amino Acids* (2011).doi:10.1007/s00726-011-0859-5
16. Valentini, S.R., Casolari, J.M., Oliveira, C.C., Silver, P.A. & McBride, A.E. Genetic Interactions of Yeast Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A) Reveal Connections to Poly(A)-Binding Protein and Protein Kinase C Signaling. *Genetics* **160**, 393–405 (2002).
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**, 785–790 (2009).
18. Saini, P., Eyler, D.E., Green, R. & Dever, T.E. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature* **459**, 118–121 (2009).
19. Kang, H.A. & Hershey, J.W. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem* **269**, 3934–3940 (1994).
20. Smit-McBride, Z., Schnier, J., Kaufman, R.J. & Hershey, J.W. Protein synthesis initiation factor eIF-4D. Functional comparison of native and unhyposinated forms of the protein. *J. Biol. Chem.* **264**, 18527–18530 (1989).
21. Park, M.H., Wolff, E.C., Smit-McBride, Z., Hershey, J.W. & Folk, J.E. Comparison of the activities of variant forms of eIF-4D. The requirement for hypusine or deoxyhypusine. *J. Biol. Chem.* **266**, 7988–7994 (1991).

22. 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. *J Cell Biochem* **97**, 583–98 (2006).
23. Kemper, W.M., Berry, K.W. & Merrick, W.C. Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors M2Balpha and M2Bbeta. *J. Biol. Chem.* **251**, 5551–5557 (1976).
24. Benne, R. & Hershey, J.W. The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.* **253**, 3078–3087 (1978).
25. 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*. *Mol. Cell. Biol* **11**, 3105–3114 (1991).
26. 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* (2011).doi:10.1007/s00726-011-0986-z
27. Templin, A.T., Maier, B., Nishiki, Y., Tersey, S.A. & Mirmira, R.G. Deoxyhypusine synthase haploinsufficiency attenuates acute cytokine signaling. *Cell Cycle* **10**, (2011).
28. 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. *J. Cell Biol.* **185**, 1181–1194 (2009).
29. Benne, R., Brown-Luedi, M.L. & Hershey, J.W. Purification and characterization of protein synthesis initiation factors eIF-1, eIF-4C, eIF-4D, and eIF-5 from rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.* **253**, 3070–3077 (1978).
30. Zuk, D. & Jacobson, A. A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. *EMBO J* **17**, 2914–2925 (1998).
31. 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. *Biochem J* **328 (Pt 3)**, 847–54 (1997).
32. Taylor, C.A. *et al.* Eukaryotic translation initiation factor 5A induces apoptosis in colon cancer cells and associates with the nucleus in response to tumour necrosis factor alpha signalling. *Exp. Cell Res* **313**, 437–449 (2007).
33. Lipowsky, G. *et al.* Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *EMBO J.* **19**, 4362–4371 (2000).

34. Zender, L. *et al.* An oncogenomics-based in vivo RNAi screen identifies tumor suppressors in liver cancer. *Cell* **135**, 852–64 (2008).
35. Rosorius, O. *et al.* Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J Cell Sci* **112**, 2369–2380 (1999).
36. Taylor, C.A. *et al.* Role of eIF5A in TNF- α -Mediated Apoptosis of Lamina Cribrosa Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 3568–3576 (2004).
37. Li, A.-L. *et al.* A Novel eIF5A Complex Functions As a Regulator of p53 and p53-dependent Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 49251–49258 (2004).
38. Rahman-Roblick, R. *et al.* p53 targets identified by protein expression profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 5401–5406 (2007).
39. Lee, Y., Kim, H.-K., Park, H.-E., Park, M.H. & Joe, Y.A. Effect of N1-guanyl-1,7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on endothelial cell growth, differentiation and apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* **237**, 69–76 (2002).
40. Hanauske-Abel, H.M. *et al.* Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1221**, 115–124 (1994).
41. Shi, X.P. *et al.* Effects of N1-guanyl-1,7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on the growth of tumorigenic cell lines in culture. *Biochim. Biophys. Acta* **1310**, 119–126 (1996).
42. Jin, B.-F. *et al.* [The effect of eIF-5A on the G1-S in cell cycle regulation]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **11**, 325–328 (2003).
43. Sugiura, M., Shafman, T., Mitchell, T., Griffin, J. & Kufe, D. Involvement of spermidine in proliferation and differentiation of human promyelocytic leukemia cells. *Blood* **63**, 1153–1158 (1984).
44. Tavladoraki, P. *et al.* Polyamine catabolism: target for antiproliferative therapies in animals and stress tolerance strategies in plants. *Amino Acids* (2011).doi:10.1007/s00726-011-1012-1
45. Minois, N., Carmona-Gutierrez, D. & Madeo, F. Polyamines in aging and disease. *Aging (Albany NY)* **3**, 716–732 (2011).
46. Chattopadhyay, M.K., Park, M.H. & Tabor, H. Hypusine modification for growth is the major function of spermidine in *Saccharomyces cerevisiae* polyamine auxotrophs grown in limiting spermidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 6554–6559 (2008).

47. Chen, M. *et al.* Overexpression of eIF-5A2 in mice causes accelerated organismal aging by increasing chromosome instability. *BMC Cancer* **11**, 199 (2011).
48. Thomas, K.R. & Capecchi, M.R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**, 503–512 (1987).
49. Alemdehy, M.F. & Erkeland, S.J. Stop the dicing in hematopoiesis: What have we learned? *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **11**, (2012).
50. Guan, C., Ye, C., Yang, X. & Gao, J. A review of current large-scale mouse knockout efforts. *Genesis* **48**, 73–85 (2010).
51. Brown, S.D.M., Hardisty-Hughes, R.E. & Mburu, P. Quiet as a mouse: dissecting the molecular and genetic basis of hearing. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 277–290 (2008).
52. McVicar, D.W. *et al.* Aberrant DAP12 signaling in the 129 strain of mice: implications for the analysis of gene-targeted mice. *J. Immunol.* **169**, 1721–1728 (2002).
53. Abate-Shen, C. & Shen, M.M. Mouse models of prostate carcinogenesis. *Trends Genet.* **18**, S1–5 (2002).
54. Sternberg, N. & Hamilton, D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J. Mol. Biol.* **150**, 467–486 (1981).
55. Cox, M.M. The FLP protein of the yeast 2-microns plasmid: expression of a eukaryotic genetic recombination system in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 4223–4227 (1983).
56. Capecchi, M.R. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 507–512 (2005).
57. Gossen, M. & Bujard, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 5547–5551 (1992).
58. Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M. & Rajewsky, K. Inducible gene targeting in mice. *Science* **269**, 1427–1429 (1995).
59. Metzger, D. & Chambon, P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* **24**, 71–80 (2001).
60. 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).
61. F Lam, F. *et al.* Identification of distinctive protein expression patterns in

colorectal adenoma. *Proteomics Clin Appl* **4**, 60–70 (2010).

62. Lu, Z.J. *et al.* The effect of miR-7 on behavior and global protein expression in glioma cell lines. *Electrophoresis* (2011).doi:10.1002/elps.201100230
63. Guan, X.-Y. *et al.* Oncogenic Role of eIF-5A2 in the Development of Ovarian Cancer. *Cancer Res* **64**, 4197–4200 (2004).
64. Yang, G.-F. *et al.* Expression and amplification of eIF-5A2 in human epithelial ovarian tumors and overexpression of EIF-5A2 is a new independent predictor of outcome in patients with ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* **112**, 314–8 (2009).
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 Epidemiol. Biomarkers Prev* **18**, 400–408 (2009).
66. Ramaswamy, S., Ross, K.N., Lander, E.S. & Golub, T.R. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* **33**, 49–54 (2003).
67. Bevec, D. *et al.* Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. *Science* **271**, 1858–1860 (1996).
68. 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. *J. Cell Biol* **152**, 895–910 (2001).
69. Ruhl, M. *et al.* Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. *J. Cell Biol* **123**, 1309–1320 (1993).
70. Bevec, D. *et al.* Induced gene expression of the hypusine-containing protein eukaryotic initiation factor 5A in activated human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **91**, 10829–10833 (1994).
71. Hauber, I. *et al.* Identification of cellular deoxyhypusine synthase as a novel target for antiretroviral therapy. *J Clin Invest.* **115**, 76–85 (2005).
72. Bianchi, M. *et al.* Suppression of proinflammatory cytokines in monocytes by a tetravalent guanylhydrazone. *J Exp Med* **183**, 927–936 (1996).
73. Cohen, P.S. *et al.* The critical role of p38 MAP kinase in T cell HIV-1 replication. *Mol Med* **3**, 339–346 (1997).
74. 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. *J Biol Chem* (2010).doi:10.1074/jbc.M110.170142
75. Maier, B. *et al.* The unique hypusine modification of eIF5A promotes islet beta

- cell inflammation and dysfunction in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 2156–2170 (2010).
76. Poeck, K. & Hacke, W. *Neurologie*. (Springer: Berlin, 1998).
77. Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**, 74–108 (2005).
78. Parkin, D.M., Pisani, P. & Ferlay, J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **49**, 33–64, 1 (1999).
79. Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M. & Berger, M.S. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro-oncology* **4**, 278–299 (2002).
80. Van Meir, E.G. *et al.* Exciting New Advances in Neuro-Oncology. *CA Cancer J Clin* **60**, 166–193 (2010).
81. Kettenmann, H. & Verkhratsky, A. [Neuroglia--living nerve glue]. *Fortschr Neurol Psychiatr* **79**, 588–597 (2011).
82. Stavrou, D. & Hagel, C. *Immune Biology of Brain Tumours*. **1**, (Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle: München, 2010).
83. Louis, D.N. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **114**, 97–109 (2007).
84. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
85. James, C.D., Carlom, E., Nordenskjold, M., Collins, V.P. & Cavenee, W.K. Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 2858–2862 (1989).
86. Anker, L. *et al.* p53 protein accumulation and gene mutations in human glioma cell lines. *Int. J. Cancer* **55**, 982–987 (1993).
87. Nozaki, M. *et al.* Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression. *Neuro-oncology* **1**, 124–137 (1999).
88. Ishii, N. *et al.* Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* **9**, 469–479 (1999).
89. Chang, S.M. *et al.* Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Invest New Drugs* **23**, 357–361 (2005).
90. Verhaak, R.G.W. *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **17**, 98–110 (2010).
91. TCGA Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma

genes and core pathways. *Nature* **455**, 1061–1068 (2008).

92. Laws, E.R. *et al.* Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. *J. Neurosurg.* **99**, 467–473 (2003).
93. Walker, M.D., Strike, T.A. & Sheline, G.E. An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **5**, 1725–1731 (1979).
94. Li, B. *et al.* Mutant epidermal growth factor receptor displays increased signaling through the phosphatidylinositol-3 kinase/AKT pathway and promotes radioresistance in cells of astrocytic origin. *Oncogene* **23**, 4594–4602 (2004).
95. Stewart, L.A. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* **359**, 1011–1018 (2002).
96. Westphal, M. *et al.* A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-oncology* **5**, 79–88 (2003).
97. Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med* **352**, 987–996 (2005).
98. Hegi, M.E. *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med* **352**, 997–1003 (2005).
99. Broniscer, A. *et al.* Phase I trial of single-dose temozolomide and continuous administration of O6-benzylguanine in children with brain tumors: a pediatric brain tumor consortium report. *Clin. Cancer Res.* **13**, 6712–6718 (2007).
100. Tolcher, A.W. *et al.* Marked inactivation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity with protracted temozolomide schedules. *Br. J. Cancer* **88**, 1004–1011 (2003).
101. Van Meir, E.G.V. *CNS Cancer: Models, Markers, Prognostic Factors, Targets, and Therapeutic Approaches.* (Springer: 2009).
102. Reardon, D.A. *et al.* Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma. *J. Neurooncol* **96**, 219–230 (2010).
103. Wick, W., Weller, M., van den Bent, M. & Stupp, R. Bevacizumab and Recurrent Malignant Gliomas: A European Perspective. *Journal of Clinical Oncology* **28**, e188 –e189 (2010).
104. Galanis, E. *et al.* Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent

- glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J. Clin. Oncol.* **23**, 5294–5304 (2005).
105. Cloughesy, T.F. *et al.* Phase II trial of tipifarnib in patients with recurrent malignant glioma either receiving or not receiving enzyme-inducing antiepileptic drugs: a North American Brain Tumor Consortium Study. *J. Clin. Oncol.* **24**, 3651–3656 (2006).
106. Hadjipanayis, C.G. & Van Meir, E.G. Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy. *J. Mol. Med* **87**, 363–374 (2009).
107. Kieran, M.W. Anti-angiogenic chemotherapy in central nervous system tumors. *Cancer Treat. Res.* **117**, 337–349 (2004).
108. Purow, B. & Fine, H.A. Antiangiogenic therapy for primary and metastatic brain tumors. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **18**, 1161–1181, x (2004).
109. Kaur, B., Tan, C., Brat, D.J., Post, D.E. & Van Meir, E.G. Genetic and hypoxic regulation of angiogenesis in gliomas. *J. Neurooncol.* **70**, 229–243 (2004).
110. Vredenburgh, J.J. *et al.* Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin. Cancer Res.* **13**, 1253–1259 (2007).
111. Ignoffo, R.J. Overview of bevacizumab: a new cancer therapeutic strategy targeting vascular endothelial growth factor. *Am J Health Syst Pharm* **61**, S21–26 (2004).
112. Wick, W., Wick, A., Weiler, M. & Weller, M. Patterns of progression in malignant glioma following anti-VEGF therapy: perceptions and evidence. *Curr Neurol Neurosci Rep* **11**, 305–312 (2011).
113. Marks, P.A., Richon, V.M. & Rifkind, R.A. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1210–1216 (2000).
114. Yoshida, M., Horinouchi, S. & Beppu, T. Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *Bioessays* **17**, 423–430 (1995).
115. Kesari, S., Ramakrishna, N., Sauvageot, C., Stiles, C.D. & Wen, P.Y. Targeted molecular therapy of malignant gliomas. *Curr Oncol Rep* **8**, 58–70 (2006).
116. Yin, D. *et al.* Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM). *Oncogene* **24**, 344–354 (2005).
117. Phuphanich, S. *et al.* Phase 1 clinical trial of bortezomib in adults with recurrent malignant glioma. *J. Neurooncol.* **100**, 95–103 (2010).

118. Hutchinson, L. Targeted therapies: the answer to individualized treatment? *Nat Clin Pract Oncol* **4**, 323 (2007).
119. Robbins, H.I. *et al.* Phase I study of erlotinib and CCI-779 (temsirolimus) for patients with recurrent malignant gliomas (MG) (NABTC 04-02). *Journal of Clinical Oncology ASCO Annual Meeting Proceedings Part I.*, (2007).
120. Szerlip, N.J. *et al.* Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 3041–3046 (2012).
121. Gerlinger, M. *et al.* Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* **366**, 883–892 (2012).
122. Rozen, S. & Skaletsky, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* **132**, 365–386 (2000).
123. Riccardi, C. & Nicoletti, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protocols* **1**, 1458–1461 (2006).
124. Schmitt, C.A. *et al.* A Senescence Program Controlled by p53 and p16INK4a Contributes to the Outcome of Cancer Therapy. *Cell* **109**, 335–346 (2002).
125. Beyer, W.R., Westphal, M., Ostertag, W. & von Laer, D. Oncoretrovirus and Lentivirus Vectors Pseudotyped with Lymphocytic Choriomeningitis Virus Glycoprotein: Generation, Concentration, and Broad Host Range. *J. Virol.* **76**, 1488–1495 (2002).
126. Smith, P.K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**, 76–85 (1985).
127. Wolff, E.C., Lee, S.B. & Park, M.H. Assay of deoxyhypusine synthase activity. *Methods Mol. Biol* **720**, 195–205 (2011).
128. Wu, S., Ying, G., Wu, Q. & Capecchi, M.R. A protocol for constructing gene targeting vectors: generating knockout mice for the cadherin family and beyond. *Nat Protoc* **3**, 1056–1076 (2008).
129. Günther, W., Pawlak, E., Damasceno, R., Arnold, H. & Terzis, A.J. Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids. *Br. J. Cancer* **88**, 463–469 (2003).
130. Xu, G.W., Mymryk, J.S. & Cairncross, J.G. Inactivation of p53 Sensitizes Astrocytic Glioma Cells to BCNU and Temozolomide, but not Cisplatin. *J Neurooncol* **74**, 141–149 (2005).
131. Park, M.H., Wolff, E.C., Lee, Y.B. & Folk, J.E. Antiproliferative effects of

- inhibitors of deoxyhypusine synthase. Inhibition of growth of Chinese hamster ovary cells by guanidyl diamines. *J. Biol. Chem* **269**, 27827–27832 (1994).
132. Bachoo, R.M. *et al.* Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell* **1**, 269–277 (2002).
133. Parsons, D.W. *et al.* An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**, 1807–1812 (2008).
134. Taylor, C.A. *et al.* Modulation of eIF5A Expression Using SNS01 Nanoparticles Inhibits NF- κ B Activity and Tumor Growth in Murine Models of Multiple Myeloma. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* (2012).doi:10.1038/mt.2012.94
135. Sun, Z., Cheng, Z., Taylor, C.A., McConkey, B.J. & Thompson, J.E. Apoptosis induction by eIF5A1 involves activation of the intrinsic mitochondrial pathway. *J. Cell. Physiol* **223**, 798–809 (2010).
136. Braig, M. *et al.* Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436**, 660–665 (2005).
137. Bartkova, J. *et al.* Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633–637 (2006).
138. Micco, R.D. *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**, 638–642 (2006).
139. HAYFLICK, L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp. Cell Res.* **37**, 614–636 (1965).
140. Narita, M. & Lowe, S.W. Senescence comes of age. *Nat Med* **11**, 920–922 (2005).
141. Schmitt, C.A. Senescence, apoptosis and therapy — cutting the lifelines of cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 286–295 (2003).
142. Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 729–740 (2007).
143. Kreuzaler, P. & Watson, C.J. Killing a cancer: what are the alternatives? *Nat. Rev. Cancer* **12**, 411–424 (2012).
144. Lee, J.-J., Lee, J.-H., Ko, Y.-G., Hong, S.I. & Lee, J.-S. Prevention of premature senescence requires JNK regulation of Bcl-2 and reactive oxygen species. *Oncogene* **29**, 561–575 (2010).
145. Brown, J.P., Wei, W. & Sedivy, J.M. Bypass of Senescence After Disruption of

- p21CIP1/WAF1 Gene in Normal Diploid Human Fibroblasts. *Science* **277**, 831–834 (1997).
146. Chang, B.-D. *et al.* Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 389–394 (2002).
147. Zhou, B.P. *et al.* Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat. Cell Biol.* **3**, 245–252 (2001).
148. Zou, X. *et al.* Cdk4 disruption renders primary mouse cells resistant to oncogenic transformation, leading to Arf/p53-independent senescence. *Genes Dev.* **16**, 2923–2934 (2002).
149. Rahman-Roblick, R. *et al.* p53 targets identified by protein expression profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 5401–5406 (2007).
150. Specht, S. *et al.* The guanylylhydrazone CNI-1493: an inhibitor with dual activity against malaria-inhibition of host cell pro-inflammatory cytokine release and parasitic deoxyhypusine synthase. *Parasitol Res* **102**, 1177–84 (2008).
151. Hirose, Y., Berger, M.S. & Pieper, R.O. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res* **61**, 1957–1963 (2001).
152. Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.Y. & Campisi, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 12072–12077 (2001).
153. Xue, W. *et al.* Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**, 656–660 (2007).
154. Acosta, J.C. *et al.* Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* **133**, 1006–1018 (2008).
155. Kuilman, T. *et al.* Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* **133**, 1019–1031 (2008).
156. Kang, T.-W. *et al.* Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature advance online publication*, (2011).
157. Scuoppo, C. *et al.* A tumour suppressor network relying on the polyamine-hypusine axis. *Nature* (2012).doi:10.1038/nature11126
158. Magdolen, V. *et al.* The function of the hypusine-containing proteins of yeast and other eukaryotes is well conserved. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 646–652 (1994).

159. Zhang, Y., Muyrers, J.P., Testa, G. & Stewart, A.F. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **18**, 1314–1317 (2000).
160. Smit, A., Green, P. & Hubley, R. *RepeatMasker Open-3.0*. (1996).at <<http://www.repeatmasker.org>>
161. Pettitt, S.J. *et al.* Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nat Meth* **6**, 493–495 (2009).
162. Peng, J.C. & Karpen, G.H. H3K9 methylation and RNA interference regulate nucleolar organization and repeated DNA stability. *Nat. Cell Biol.* **9**, 25–35 (2007).
163. Peng, J.C. & Karpen, G.H. Epigenetic regulation of heterochromatic DNA stability. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**, 204–211 (2008).
164. Deng, C. & Capecchi, M.R. Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3365–3371 (1992).
165. Hasty, P., Rivera-Pérez, J., Chang, C. & Bradley, A. Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4509–4517 (1991).
166. Yang, Y. & Seed, B. Site-specific gene targeting in mouse embryonic stem cells with intact bacterial artificial chromosomes. *Nat. Biotechnol.* **21**, 447–451 (2003).
167. Irvine, E.E. *et al.* Insulin receptor substrate 2 is a negative regulator of memory formation. *Learn. Mem.* **18**, 375–383 (2011).
168. Huang, Z.J., Yu, W., Lovett, C. & Tonegawa, S. Cre/loxP recombination-activated neuronal markers in mouse neocortex and hippocampus. *Genesis* **32**, 209–217 (2002).

8 Anhang

8.1 Primersequenzen

eF5a2-„Knockout“-Konstruktion:

Name	Sequenz (5'-3')
Sequenzierprimer eIF5A2 in pStartK	
pStartrev-seq1-r	tgacagcagacgtgcactgg
pStart-K Seq fwd	CTC GGG CCC CAA ATA ATG AT
Primer zum Anfügen von Homologiearmen an eIF5A2 bzw. an die Resistenzkassetten	
A2-Primer1	gagccctcctgtacagcctgggtgttggaagggggaatccaagagttACGC GTcgactgaattggttccttaaagc
A2-Primer2	gagacagacgagttaaggagatacaagaggaaagaaggaagatggaggaa gccgcactcgagatatctagacca
eIF5A2-KanNeo-loxP-for	aactgaagatgaggatgcatctcgcccgggaacactgcaagcttcaaacaattaa ccctcactaaagggcg
eIF5A2-KanNeo-loxP-rev	gtgctgcgattagtgacttccggcgtgcagagctgctgcagtgcacttaatacga ctcactatagggtc
eIF5A2-KanNeo-FRT-f	CTAGGGCCGGCCATTAATAattaaccctcactaaag
eIF5A2-KanNeo-FRT-r	CTAGTTAATTAAGCTTGTTAACtaatacgactcactatag
Sondenprimer	
3'-Sonde3-f	cacacattacatgaattataagg
3'-Sonde3-r	ctgtcccagctctaactgc
Weitere Sequenzierprimer	
pWS-TK6-Ori-f	gtgagcgaggaagcggaatatac
A2-TK6-Ori-r	catccgtcagtctagtaattcc
A2-TK6-3'-f	gggaaatgtggattgctgtc
A2-TK6-3'-r	tataaaccgcagtagcgtg

eIF5a2-IKMC-ES-Zellen:

Name	Sequenz (5'-3')
Validierung der Integration in ES-Zellen und Genotypisierung	
5' Universal (LAR3)	CACAACGGGTTCTTCTGTTAGTCC
5' Gene Specific (GF4)	CTGATAGGAGGCTTCAGGTCAGCGGAGGAC
5' Gene Specific (GF3)	GATAGGAGGCTTCAGGTCAGCGGAGGACAG
3' Universal (RAF5)	CACACCTCCCCCTGAACCTGAAAC
3' Gene Specific (GR4)	GATGACTGCTGTGTGGAATAGTATCATCTG
3' Gene Specific (GR3)	GAGGAGGACCATGAGATGGTGAGGACATG

8.2 Lentirale Vektoren**LeGO-iCer2-Puro⁺****LeGO-Cer2-**

Abb.: 33 Schematische Darstellung des lentiviralen Vektors, der zur Expression von humanem p53 genutzt wurde und der Leervektor, dargestellt als integriertes Provirus. Ein PCR-Fragment der p53 cDNA in den Klonierungsbereich des LeGO-iCer2-Puro⁺-Vektors kloniert (*EcoRI*- and *NotI*-Schnittstellen) und durch Sequenzierung verifiziert. Folgende Vektorelemente sind dargestellt (nicht maßstabsgetreu): SIN-LTR, "self inactivating long terminal repeat; Ψ , Verpackungssignal; RRE, rev-gesteuertes Element; cPPT, zentraler Polypurintrakt; SFFV, "Spleen focus-forming virus Enhancer/Promotor; wt p53, cDNA die für das humane p53 kodiert; IRES, interne ribosomale Eintrittsstelle des Encephalomyocarditisvirus; Cerulean, kodiert für das Cyan-fluoreszierende Protein; 2A, selbsspaltendes Peptid des *Porzinen Teschovirus 1* (P2A); PuroR, kodonoptimierte cDNA des Puromycin-N-Azetyltransferase (vermittelt Puromycinresistenz); wPRE, Woodchuck Hepatitisvirus posttranskriptionales regulatorisches Element.

8.3 eIF-5A-Expression in Glioblastomen (REMBRANDT-Datenbank)

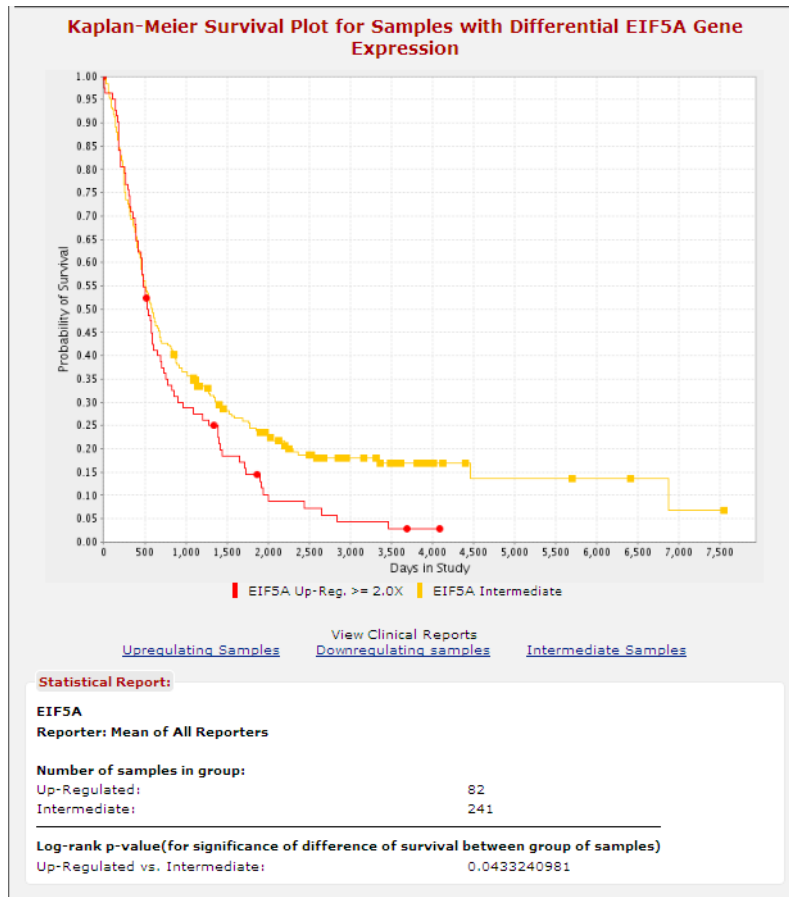


Abb.: 34 Kaplan-Meier Schätzkurven von GBM-Patienten mit unterschiedlicher eIF-5A-Expression. Patienten mit hochreguliertem eIF-5A (rote Linie; $n = 82$) und mittlerer Expression (gelbe Linie; $n = 241$) sind dargestellt. Logrank- P -Werte (hochreguliert vs. mittlere Expression; Mittelwert aller Reporter): $P = 0,0433240981$. Die Daten stammen aus der „National Cancer Institute REMBRANDT database“ (<https://caintegrator.nci.nih.gov/rembrandt>).

Tabelle 11: Rohdaten der immunohistochemisch ermittelten Expression von eIF-5A, -A2, DHS und DOHH in neuronalen Mikrogewebsschnitten. Die Mikrogewebsschnitte wurden mit entsprechenden Antikörpern gegen die vier Zielproteine gefärbt. Die Intensität der Färbung wurde in vier Abstufungen unterteilt: (0: keine, 1: leichte Färbung in bis zu 20% der Zellen, 2: mittlere oder starke Färbung in bis zu 50% der Zellen, 3: mittlere bis starke Färbung in >50% der Zellen. Dabei wurden nur die Tumorzellen berücksichtigt. Die Tumorarten sind: 1 = Astrozytome, 2 = Oligodendrogliome. Grad entspricht dem WHO Gliomgrad. Das Geschlecht ist folgendermaßen aufgeschlüsselt: 1 = weiblich, 2 = männlich. Das Alter ist in Jahren angegeben. Die Lokalisation der jeweiligen Probe ist wie folgt aufgeschlüsselt: 1 = Frontallappen, 2 = Temporallappen, 3 = zentraler Cortex, 4 = Occipitallappen, 5 = Cerebellum, 6 = Rückenmark, 7 = Sehnerv.

Probe	DHS	eIF5A2	eIF5A	DOHH	Tumorart	Grad	Geschlecht	Alter	Lokalisation
A1 1-2	1.00	0.00	3.00	1.00	1.00	1.00	1.00	6.00	
A1 3-4	0.00	0.00	2.50	2.00	1.00	1.00	2.00	30.00	7.00
A1 5-6	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	1.00	2.00	15.00	7.00
A1 7-8	0.00	0.00	2.00	2.00	1.00	1.00	2.00	20.00	5.00
A1 9-10	0.00	0.00	3.00	2.00	1.00	1.00	1.00	25.00	1.00
A2 1-2	0.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	2.00	3.00	5.00
A2 3-4	1.00	0.00	2.00	1.00	1.00	1.00	2.00	14.00	6.00
A2 5-6	0.00	0.00	2.00	2.00	1.00	1.00	2.00	13.00	5.00
A2 7-8	0.00	0.00	2.00	2.00	1.00	1.00	2.00	12.00	
A2 9-10	0.00	0.00	2.00	2.00	1.00	1.00	1.00	12.00	5.00
A3 1-2	0.00	1.00	2.00	2.00	1.00	1.00	1.00	28.00	6.00
A3 3-4	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	15.00	6.00
A3 5-6	1.00	0.00	2.00	3.00	1.00	1.00	2.00	4.00	5.00
A3 7-8	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	1.00	2.00	8.00	7.00
A3 9-10	0.00	0.00	3.00	1.00	1.00	1.00	1.00	16.00	5.00
A4 1-2	1.00	0.00	3.00	2.00	1.00	1.00	1.00	6.00	7.00
A4 3-4	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00	1.00	12.00	5.00
A4 5-6	0.00	0.00	1.00	0.50	1.00	1.00	1.00	16.00	5.00
A4 7-8	0.50	0.00	2.00	1.00	1.00	1.00	1.00	6.00	5.00
A4 9-10	0.50	0.00	0.50	0.00	1.00	1.00	2.00	22.00	5.00
A5 1-2	2.00	0.00	2.00	1.00	1.00	1.00	1.00	15.00	7.00
A5 3-4	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	1.00	1.00	28.00	5.00
A5 5-6	0.00	0.00	2.00	2.00	1.00	1.00	2.00	13.00	5.00
A5 7-8	0.00	0.00	3.00	2.00	1.00	1.00	2.00	14.00	5.00
A5 9-10	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	13.00	5.00
A6 1-2	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	8.00	5.00
A6 3-4	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	1.00	1.00	17.00	5.00
A6 5-6	1.00	0.00	2.00	1.00	1.00	1.00	2.00	33.00	1.00
A6 7-8	0.50	0.00	2.50	1.00	1.00	1.00	1.00	2.00	6.00
A6 9-10	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	1.00	2.00	12.00	5.00
A7 1-2	0.00	0.00	3.00	1.00	1.00	2.00	2.00	31.00	3.00
A7 3-4	0.00	0.00	2.00	2.00	1.00	2.00	1.00	43.00	2.00
A7 5-6	0.00	0.00	2.00	0.00	1.00	2.00	2.00	40.00	2.00
A7 7-8	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	2.00	2.00	40.00	2.00
A7 9-10	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	2.00	2.00	28.00	1.00
A8 1-2	0.00	0.00	3.00	1.00	1.00	2.00	2.00	40.00	2.00
A8 3-4	0.00	0.00	3.00	1.00	1.00	2.00	2.00	15.00	5.00
A8 5-6	1.00	0.00	2.00	1.00	1.00	2.00	2.00	58.00	2.00
A8 7-8	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	2.00	2.00	18.00	1.00
A8 9-10	0.50	0.00	2.00	0.50	1.00	2.00	1.00	46.00	1.00
A9 1-2	1.50	0.00	1.00	0.00	1.00	2.00	2.00	43.00	4.00

A9 3-4	1.00	0.00	2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	33.00	
A9 5-6	0.00	0.00	2.00	2.00	1.00	2.00	1.00	22.00	2.00
A9 7-8	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	24.00	1.00
A9 9-10	0.50	0.00	1.00	0.00	1.00	2.00	1.00	52.00	1.00
A10 1-2	0.00	0.00	3.00	1.00	1.00	2.00	2.00	57.00	1.00
A10 3-4	0.00	0.00	1.00	0.00	1.00	2.00	2.00	52.00	1.00
A10 5-6	0.00	0.00	0.00	2.00	1.00	2.00	2.00	44.00	1.00
A10 7-8	0.00	0.00	2.00	2.00	1.00	2.00	2.00	43.00	
A10 9-10	0.00	0.00	3.00	2.00	1.00	2.00	2.00	33.00	
A11 1-2	1.00	0.00	3.00	1.00	1.00	2.00	1.00	51.00	1.00
A11 3-4	0.00	0.00	22.00	1.00	1.00	2.00	2.00	37.00	2.00
A11 5-6	0.00	0.00	3.00	3.00	1.00	2.00	1.00	78.00	1.00
A11 7-8	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	67.00	2.00
A11 9-10	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	2.00	1.00	56.00	1.00
A12 1-2	1.00	0.00	2.00	1.00	1.00	2.00	2.00	39.00	3.00
A12 3-4	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	2.00	2.00	39.00	
A12 5-6	0.00	0.00	2.00	2.00	1.00	2.00	2.00	38.00	2.00
A12 7-8	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	2.00	2.00	30.00	4.00
A12 9-10	0.00	0.00	1.00	2.00	1.00	2.00	2.00	52.00	2.00
A13 1-2	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	3.00	2.00	46.00	1.00
A13 3-4	0.00	0.00	3.00	2.00	1.00	3.00	2.00	42.00	1.00
A13 5-6	0.00	0.00	3.00	3.00	1.00	3.00	2.00	44.00	2.00
A13 7-8	0.00	0.00	1.00	2.00	1.00	3.00	1.00	40.00	3.00
A13 9-10	0.00	0.00	2.00	2.00	1.00	3.00	2.00	32.00	2.00
A14 1-2	1.50	0.00	2.00	2.00	1.00	3.00	1.00	30.00	1.00
A14 3-4	1.00	0.00	3.00		1.00	3.00	2.00	29.00	3.00
A14 5-6	0.00	0.00	2.00	2.00	1.00	3.00	2.00	26.00	1.00
A14 7-8	0.00	0.00	2.00	2.00	1.00	3.00	2.00	36.00	
A14 9-10	0.00	0.00	1.00	1.00	1.00	3.00	2.00	51.00	1.00
A15 1-2	0.50	0.00	3.00	3.00	1.00	3.00	2.00	54.00	1.00
A15 3-4	0.00	0.00	3.00	2.00	1.00	3.00	2.00	60.00	1.00
A15 5-6	0.00	0.00	1.00	1.00	1.00	3.00	2.00	67.00	
A15 7-8	0.00	0.00	1.00	1.00	1.00	3.00	1.00	68.00	3.00
A15 9-10	0.00	0.00	1.00	1.00	1.00	3.00	2.00	49.00	1.00
A16 1-2	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	3.00	1.00	33.00	1.00
A16 3-4	0.00	0.00	3.00	2.00	1.00	3.00	2.00	55.00	
A16 5-6	0.00	0.00	3.00	1.00	1.00	3.00	1.00	25.00	2.00
A16 7-8	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	3.00	2.00	71.00	1.00
A16 9-10	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	3.00	1.00	50.00	2.00
A17 1-2	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	3.00	2.00	39.00	2.00
A17 3-4	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	3.00	1.00	16.00	3.00
A17 5-6	1.00	0.00		1.00	1.00	3.00	2.00	52.00	1.00
A17 7-8		0.00	2.00	1.00	1.00	3.00	2.00	39.00	2.00
A17 9-10	0.00	0.00	2.00	2.00	1.00	3.00	1.00	43.00	
A18 1-2	0.00	0.00	1.00	2.00	1.00	3.00	2.00	63.00	
A18 3-4	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	3.00	2.00	42.00	1.00
B1 1-2	1.00	0.00	2.00	3.00	1.00	4.00	2.00	74.00	3.00
B1 3-4	0.00	0.00	1.00	3.00	1.00	4.00	2.00	51.00	2.00
B1 5-6	0.50	0.00	2.00	2.00	1.00	4.00	1.00	68.00	1.00

B1 7-8	0.00	0.00	2.00	2.00	1.00	4.00	1.00	66.00	2.00
B1 9-10	1.00	0.00	2.00	2.00	1.00	4.00	2.00	72.00	2.00
B2 1-2	0.00	0.00	2.00	2.00	1.00	4.00	2.00	57.00	4.00
B2 3-4	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	4.00	1.00	48.00	3.00
B2 5-6	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	4.00	1.00	59.00	1.00
B2 7-8	1.00	0.00	2.00	0.00	1.00	4.00	2.00	63.00	1.00
B2 9-10	1.00	0.00	3.00	3.00	1.00	4.00	1.00	62.00	2.00
B3 1-2	2.00	0.00	3.00	3.00	1.00	4.00	1.00	50.00	1.00
B3 3-4	1.00	0.00	2.00	3.00	1.00	4.00	1.00	45.00	2.00
B3 5-6	2.00	0.00	2.00	1.00	1.00	4.00	2.00	55.00	2.00
B3 7-8	2.00	0.00	3.00	3.00	1.00	4.00	1.00	44.00	1.00
B3 9-10	1.00	0.00	2.00	3.00	1.00	4.00	2.00	70.00	4.00
B4 1-2	1.50	0.00	2.00	1.50	1.00	4.00	2.00	70.00	3.00
B4 3-4	1.00	0.00	0.50	0.00	1.00	4.00	2.00	67.00	1.00
B4 5-6	1.00	0.00	2.00	0.00	1.00	4.00	2.00	66.00	1.00
B4 7-8	1.00	0.00	1.50	1.50	1.00	4.00	1.00	64.00	3.00
B4 9-10	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	4.00	2.00	57.00	1.00
B5 1-2	0.50	0.00	0.50	2.00	1.00	4.00	1.00	61.00	3.00
B5 3-4	1.00	0.00	2.00	2.00	1.00	4.00	2.00	71.00	
B5 5-6	0.50	0.00	2.00	2.00	1.00	4.00	1.00	76.00	
B5 7-8	2.00	0.00	1.00	0.00	1.00	4.00	1.00	61.00	2.00
B5 9-10	1.00	0.00	2.00	3.00	1.00	4.00	2.00	72.00	3.00
B6 1-2	1.00	0.00	1.50	0.00	1.00	4.00	2.00	67.00	
B6 3-4	0.50	0.00	2.00	2.00	1.00	4.00	2.00	74.00	1.00
B6 5-6	2.00	0.00	1.50	1.00	1.00	4.00	1.00	57.00	4.00
B6 7-8	2.00	0.00	1.50	3.00	1.00	4.00	1.00	38.00	
B6 9-10	0.00	0.00	2.00	1.00	1.00	4.00	2.00	66.00	
B7 1-2	0.00	0.00	2.00	1.00	2.00	2.00	2.00	40.00	
B7 3-4	0.00	0.00	3.00	3.00	2.00	2.00	1.00	17.00	
B7 5-6	0.00	0.00	2.00	1.00	2.00	2.00	2.00	35.00	
B7 7-8	0.00	0.00	3.00	3.00	2.00	2.00	1.00	38.00	
B7 9-10	0.00	0.00	2.00	1.00	2.00	2.00	1.00	48.00	2.00
B8 1-2	0.00	0.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	33.00	1.00
B8 3-4	0.00	0.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	44.00	4.00
B8 5-6	0.00	0.00	1.50	1.00	2.00	2.00	2.00	56.00	2.00
B8 7-8	0.00	0.00	1.00	1.00	2.00	2.00	1.00	48.00	2.00
B8 9-10	1.00	0.00	2.00	2.00	2.00	2.00	1.00	49.00	1.00
B9 1-2	1.00	0.00	2.00	3.00	2.00	2.00	2.00	33.00	1.00
B9 3-4	1.00	0.00	0.00	0.00	2.00	2.00	1.00	30.00	1.00
B9 5-6	0.00	0.00	2.00	1.00	2.00	2.00	2.00	48.00	1.00
B9 7-8	0.00	0.00	2.00	1.00	2.00	2.00	2.00	59.00	1.00
B9 9-10	0.00	0.00	2.00	1.00	2.00	2.00	1.00	53.00	2.00
B10 1-2	0.00	0.00	2.00	1.00	2.00	2.00	1.00	28.00	1.00
B10 3-4	0.00	0.00	1.00	1.00	2.00	2.00	1.00	44.00	1.00
B10 5-6	0.50	0.00	1.00	1.00	2.00	2.00	1.00	50.00	1.00
B10 7-8	0.00	0.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	41.00	1.00
B10 9-10	0.00	0.00	2.00	1.00	2.00	2.00	1.00	46.00	4.00
B11 1-2	0.00	0.00	1.00	0.00	2.00	2.00	2.00	33.00	3.00
B11 3-4	1.00	0.00	1.00	0.00	2.00	2.00	2.00	32.00	1.00

B11 5-6	0.00	0.00	1.00	1.00	2.00	2.00	1.00	47.00	3.00
B11 7-8	0.00	0.00	1.00	1.00	2.00	2.00	1.00	44.00	1.00
B11 9-10	0.00	0.00	1.50	1.00	2.00	2.00	2.00	48.00	2.00
B12 1-2	1.00	0.00	2.00	1.50	2.00	2.00	2.00	41.00	1.00
B12 3-4	1.50	0.00	1.00	1.00	2.00	2.00	2.00	35.00	
B12 5-6	0.50	0.00	2.00	2.00	2.00	2.00	1.00	36.00	
A13 1-2	0.00	0.00	2.00	2.00	2.00	3.00	2.00	34.00	1.00
B13 3-4	0.00	0.00	2.00	2.50	2.00	3.00	1.00	33.00	1.00
B13 5-6	1.00	0.00	3.00	3.00	2.00	3.00	2.00	34.00	2.00
B13 7-8	1.50	0.00	3.00	2.00	2.00	3.00	1.00	48.00	1.00
B13 9-10	0.50	0.00	3.00	3.00	2.00	3.00	2.00	41.00	1.00
B14 1-2	0.00	0.00	1.00	1.00	2.00	3.00	2.00	37.00	3.00
B14 3-4	1.00	0.00	2.00	2.00	2.00	3.00	2.00	36.00	2.00
A14 5-6	1.00	0.00	2.00	2.00	2.00	3.00	1.00	56.00	1.00
B14 7-8	0.00	0.00	2.00	2.00	2.00	3.00	2.00	47.00	1.00
B14 9-10	1.00	0.00	2.00	3.00	2.00	3.00	1.00	34.00	3.00
B15 1-2	0.50	0.00	2.00	3.00	2.00	3.00	1.00	50.00	1.00
B15 3-4	0.00	0.00	2.00	1.00	2.00	3.00	1.00	46.00	1.00
B15 5-6	1.00	0.00	2.00	1.00	2.00	3.00	2.00	13.00	1.00
B15 7-8	2.00	0.00	3.00	2.00	2.00	3.00	2.00	59.00	2.00
B15 9-10	0.00	0.00	1.00	1.00	2.00	3.00	2.00	57.00	1.00
B16 1-2	0.00	0.00	2.00	0.00	2.00	3.00	1.00	61.00	2.00
B16 3-4	0.00	0.00	2.00	0.00	2.00	3.00	1.00	53.00	1.00
B16 5-6	1.00	0.00	2.00	3.00	2.00	3.00	2.00	49.00	2.00
B16 7-8	1.00	0.00	1.00	0.00	2.00	3.00	2.00	58.00	1.00
B16 9-10	0.00	0.00	1.00	0.00	2.00	3.00	2.00	57.00	2.00
B17 1-2	1.00	0.00	1.00	1.00	2.00	3.00	2.00	30.00	1.00
B17 3-4	1.00	0.00	2.00	1.00	2.00	3.00	2.00	34.00	1.00
B17 5-6	2.00	0.00	2.00	1.50	2.00	3.00	1.00	66.00	1.00
B17 7-8	1.00	0.00	2.00	2.00	2.00	3.00	1.00	60.00	1.00
B17 9-10	1.00	0.00	2.00	1.00	2.00	3.00	1.00	42.00	1.00
B18 1-2	0.00	0.00	2.00	0.00	2.00	3.00	2.00	40.00	
B18 3-4	0.00	0.00	2.00	0.00	2.00	3.00	1.00	50.00	
B18 5-6	0.00	0.00	1.00	0.00	2.00	3.00	1.00	65.00	1.00

Tabelle 12: Mittelwerte der immunhistochemischen Färbungen von DHS und DOHH in neuronalen Mikrogewebsschnitten.

WHO grade	DHS	DHS SEM	DOHH	DOHH SEM
1	0.3167	0.1015	1.25	0.135
2	0.2632	0.07046	1.2069	0.1015
3	0.3909	0.08514	1.4545	0.1241
4	0.9167	0.1269	1.6333	0.1958

8.4 Eidesstattliche Versicherung

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 06.08.2013

(Michael Preukschas)