

# Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der Hypusin-Modifikation

## Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,  
Fachbereich Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Nora Pällmann**

Hamburg, 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. J. HAUBER  
Weitere Gutachter der Dissertation:  
Frau Priv.-Doz. Dr. S. HOFFMEISTER-ULLERICH  
Herr Prof. Dr. R. WAGNER  
Tag der Disputation: 25. Oktober 2013

Hamburg, den 08. Oktober 2013



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

# Zusammenfassung

Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A) ist ein in Eukaryoten hoch konserviertes Protein und wird mit einer Vielzahl von Erkrankungen wie Krebs, Diabetes und der HIV-Infektion in Verbindung gebracht. eIF-5A existiert in zwei Isoformen, von denen eine, eIF-5A1, ubiquitär exprimiert ist und die andere, eIF-5A2, nur in Gehirn und Testis sowie in Tumoren detektiert werden kann. Beide Isoformen weisen eine einzigartige, ebenfalls hoch konservierte posttranslationale Modifikation auf. Diese Hypusin-Modifikation erfolgt in zwei Schritten, die von den Enzymen Deoxyhypusin-Synthase (DHS) und Deoxyhypusin-Hydroxylase (DOHH) katalysiert werden. Hypusiniertes eIF-5A beeinflusst die Translation sowie den nukleo-zytoplasmatischen Transport spezifischer mRNAs, allerdings ist der genaue Wirkungsmechanismus von eIF-5A bis heute ungeklärt.

Um die Bedeutung der Hypusin-Modifikation für den Säugerorganismus zu untersuchen und eIF-5A als neue innovative Zielstruktur für Therapien zu etablieren, wurden zunächst zwei konditionale *Knockout*-Mauslinien für das erste Hypusinierungsenzym DHS sowie für die Isoform eIF-5A2 generiert und analysiert. Dabei zeigte sich, dass der konstitutive DHS-Verlust zu embryonaler Letalität führt. Im konditionalen Modell verstarben juvenile Tiere durch eine Schädigung von Knochenmarkzellen sowie Blutungen in lebenswichtigen Organen wie der Niere. Beim heterozygoten DHS-Verlust verhindert ein Kompensationsmechanismus mögliche Auswirkungen eines Gen-Dosis-Effektes. Die Analyse des eIF-5A2-Verlustes ergab, dass diese Isoform im Gegensatz zu eIF-5A1 weder für das Überleben noch für die Fertilität essentiell ist. Allerdings war die Zahl männlicher Nachkommen signifikant vermindert. Um die Wirkungsweise von hypusiniertem eIF-5A weiter aufzuklären, wurden in einem zweiten Schritt mit eIF-5A interagierende mRNAs über eine RIP-Chip-Analyse identifiziert und bioinformatisch analysiert. Die größtenteils Hypusin-abhängig stattfindenden eIF-5A-mRNA-Interaktionen zeigen eine Verbindung zwischen eIF-5A und metabolischen Prozessen und können somit die beobachteten Effekte des Hypusin-Verlustes erklären.

Die in der vorliegenden Arbeit etablierten konditionalen *Knockout*-Mauslinien stellen daher ein wertvolles Instrument für weitere Forschungsarbeiten dar und die Ergebnisse der

Interaktionsstudien bieten neue Ansatzpunkte, die molekularen Grundlagen der eIF-5A-Funktionsweise besser zu verstehen. Die Untersuchungen unterstreichen zudem die hohe biologische Relevanz der Hypusine-Modifikation. Daraus ergibt sich, dass die Hypusine-Modifikation von eIF-5A, besonders von seiner vermutlich onkogenen Isoform eIF-5A2, eine aussichtsreiche Zielstruktur für neue Therapiestrategien darstellt.

## Abstract

### **Title: Analyses of the functional relevance of the hypusine modification**

The eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) is a highly conserved protein in eukaryotes and is associated with a variety of human diseases, such as cancer, diabetes, and HIV infection. Two isoforms of eIF-5A exist. eIF-5A1 is ubiquitously expressed, while eIF-5A2 is detectable only in testis, brain and tumors. Both isoforms exhibit a unique, highly conserved posttranslational hypusine modification, which is introduced by two enzymes: deoxyhypusine synthase (DHS) and deoxyhypusine hydroxylase (DOHH). Hypusine-containing eIF-5A affects translation and nucleo-cytoplasmic translocation of specific mRNAs, but so far the exact mode of action remains unknown.

To analyze the relevance of the hypusine modification for mammalian organisms and to establish eIF-5A as an innovative target for therapy, two conditional knockout mouse strains for the first hypusination enzyme DHS and for the isoform eIF-5A2 were generated and analyzed. This demonstrated that constitutive loss of DHS is embryonically lethal. A conditional knockout results in the death of juvenile mice due to a damage of bone marrow cells and bleeding in essential internal organs, such as the kidney. A compensatory mechanism protects against a possible gene dosage effect of heterozygous loss of DHS. Analyzing the loss of eIF-5A2 revealed that this isoform is not essential for survival or fertility in contrast to the eIF-5A1 isoform. However, fewer male than female eIF-5A2 knockout pups were born. To further analyze the mode of action of hypusine-containing eIF-5A, interacting mRNAs were identified by RIP-Chip analysis and analyzed using bioinformatics tools. The hypusine-

dependent mRNA interactions present a link between eIF-5A and metabolic processes and can explain the effects of hypusine loss.

The knockout mouse strains presented in this work provide a valuable tool for further research and the results from the interaction studies offer new starting points for understanding the molecular basics of eIF-5A's mode of action. The analyses underscore the significance of this unique hypusine modification. This implies that the hypusine modification of eIF-5A is a promising target for novel therapies, especially in the non-essential oncogenic isoform eIF-5A2.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Hypusin-Modifikation .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Die Hypusin-Synthese und eIF-5A.....	1
1.1.2	Die Hypusinerungsenzyme.....	3
1.1.3	Evolutionäre Konservierung und essentielle Bedeutung der Hypusin-Modifikation.....	4
1.1.4	Funktionen von eIF-5A1.....	5
1.1.5	Zusammenhang der Hypusin-Modifikation mit Erkrankungen .....	7
<b>1.2</b>	<b>Werkzeuge zur Untersuchung .....</b>	<b>8</b>
1.2.1	Mausmodelle für Gen-Funktionsuntersuchungen .....	8
1.2.2	Methoden zur Identifizierung von RNA-Protein-Interaktionen.....	9
<b>1.3</b>	<b>Fragestellung .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>12</b>
2.1.1	Mausstämme .....	12
2.1.2	Zellen.....	13
2.1.3	Bakterienstämme.....	13
2.1.4	Medien .....	14
2.1.5	Behandlung von Mäusen, Zellen, Bakterien .....	15

---

2.1.6	Vektoren.....	16
2.1.7	Oligonukleotide.....	17
2.1.8	Antikörper .....	21
2.1.9	Größen- und Molekulargewichtsstandards .....	21
2.1.10	Enzyme .....	22
2.1.11	Reagenzsysteme .....	22
2.1.12	Puffer und Lösungen .....	23
2.1.13	Chemikalien und Reagenzien.....	24
2.1.14	Geräte .....	26
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>28</b>
2.2.1	Zellbiologische Methoden .....	28
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	29
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden .....	34
2.2.4	RIP-Chip.....	37
2.2.5	Rekombinations-basiertes Klonieren.....	38
2.2.6	Herstellung von konditionalen <i>Knockout</i> -Mauslinien .....	40
2.2.7	Tierexperimentelle Arbeiten.....	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>Herstellung einer konditionalen <i>Dhs-Knockout</i>-Mauslinie.....</b>	<b>46</b>
3.1.1	<i>Knockout</i> -Strategie.....	46
3.1.2	Generierung eines <i>Targeting Vectors</i> .....	48
3.1.3	Gezielte Modifikation embryonaler Stammzellen.....	52
3.1.4	Generierung von chimären Mäusen .....	56

3.1.5	Etablierung der konditionalen <i>Dhs-Knockout</i> -Mauslinie.....	58
<b>3.2</b>	<b>Analyse des <i>Dhs-Knockouts</i>.....</b>	<b>62</b>
3.2.1	Der heterozygote <i>Dhs-Knockout</i> zeigt keinen auffälligen Phänotyp.....	62
3.2.2	Der konstitutive <i>Dhs-Knockout</i> verursacht embryonale Letalität .....	63
3.2.3	Ein Kompensationsmechanismus erklärt die Unauffälligkeit des heterozygoten <i>Dhs-Knockouts</i> .....	64
3.2.4	Generierung eines <i>in vitro</i> Modells für den induzierten <i>Dhs-Knockout</i> .....	68
3.2.5	Der induzierte <i>Dhs-Knockout</i> ist in juvenilen Tieren frühzeitig letal .....	71
3.2.6	Die <i>Dhs</i> -Expression korreliert mit der <i>Wdr83</i> -Expression .....	75
<b>3.3</b>	<b>Etablierung und Analyse einer konditionalen <i>Eif-5a2-Knockout</i>-Mauslinie .....</b>	<b>78</b>
3.3.1	Vorarbeiten .....	78
3.3.2	Etablierung der konditionalen <i>Eif-5a2-Knockout</i> -Mauslinie .....	80
3.3.3	Der heterozygote <i>Eif-5a2-Knockout</i> führt zu einer reduzierten Bockanzahl und einer gesteigerten Gewichtszunahme bei Weibchen.....	84
3.3.4	Der homozygote <i>Eif-5a2-Knockout</i> ist lebensfähig.....	87
<b>3.4</b>	<b>Identifizierung potentieller mRNA-Interaktionspartner von eIF-5A.....</b>	<b>90</b>
3.4.1	Etablierung der Ribonukleoprotein-Immunopräzipitation.....	90
3.4.2	Wie viel RNA kopräzipitiert ist Hypusin-abhängig .....	93
3.4.3	Identifizierung potentieller mRNA-Interaktionspartner.....	94
3.4.4	Validierung potentieller mRNA-Interaktionspartner.....	101
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>104</b>
<b>4.1</b>	<b>Das DHS-Enzym ist essentiell für die Viabilität von Säugern .....</b>	<b>105</b>

4.1.1	Der konstitutive <i>Dhs-Knockout</i> führt zu embryonaler Letalität .....	105
4.1.2	Das DHS-Enzym ist auch nach der Embryonalentwicklung essentiell .....	107
4.1.3	Der DHS-Verlust hat stärkere Auswirkungen als der DOHH-Verlust .....	110
4.1.4	Der DHS-Verlust löst einen Kompensationsmechanismus aus.....	113
4.1.5	Auch die Expression des <i>Wdr83</i> -Gens ist vom <i>Dhs-Knockout</i> betroffen.....	115
<b>4.2</b>	<b>Das <i>Eif-5a2</i>-Gen ist nicht grundsätzlich essentiell.....</b>	<b>117</b>
4.2.1	Der <i>Eif-5a2-Knockout</i> ist viabel, aber möglicherweise semi-letal bei Böcken	117
4.2.2	Die <i>Eif-5a2-Knockout</i> -Mäuse sind fertil .....	119
4.2.3	Das <i>Eif-5a2</i> -Gen muss einen Vorteil bringen .....	120
<b>4.3</b>	<b>Die mRNA-Interaktionspartner von eIF-5A tragen zum Verständnis seiner Funktion bei .....</b>	<b>123</b>
4.3.1	Mit der RIP-Chip-Analyse wurden mögliche mRNA-Interaktionspartner identifiziert.....	123
4.3.2	Die eIF-5A-mRNA-Interaktionen sind größtenteils Hypusin-abhängig.....	124
4.3.3	Die Bindung der mRNA-Interaktionspartner erfolgt vermutlich Struktur-abhängig.....	126
4.3.4	Die mRNA-Interaktionspartner weisen auf eine Funktion von eIF-5A in metabolischen Prozessen hin .....	127
4.3.5	Die eIF-5A2-spezifischen mRNA-Interaktionspartner liefern eine Verbindung zu seiner tumorigenen Wirkung.....	129
<b>4.4</b>	<b>Fazit: Die Hypusin-Modifikation hat eine extrem hohe biologische Relevanz.....</b>	<b>131</b>
<b>4.5</b>	<b>Konsequenz: Die Inhibierung der Hypusin-Modifikation hat ein großes therapeutisches Potential .....</b>	<b>132</b>

---

<b>5</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>135</b>
<b>5.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>135</b>
<b>5.2</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>138</b>
<b>5.3</b>	<b>Per RIP-Chip identifizierte Transkripte (Auszug).....</b>	<b>148</b>
5.3.1	RIP-Chip-Daten für eIF-5A1.....	148
5.3.2	RIP-Chip-Daten für eIF-5A2.....	150
5.3.3	RIP-Chip-Daten für eIF-5A1-K50R .....	152
5.3.4	RIP-Chip-Daten für eIF-5A2-K50R .....	155
5.3.5	RIP-Chip-Daten für N-terminales eIF-5A1.....	157
<b>5.4</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>160</b>
<b>5.5</b>	<b>Während dieser Arbeit entstandene Publikationen .....</b>	<b>161</b>
<b>5.6</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>162</b>

# 1 Einleitung

Proteine erfüllen verschiedenste Aufgaben in der Zelle. Dafür ist nicht nur ihre im Genom kodierte Primärsequenz entscheidend, sondern auch das Vorhandensein posttranslationaler Modifikationen (PTMs). Diese beeinflussen die Tertiär- und Quartärstruktur eines Proteins und steuern seine Aktivität, Lokalisation und Interaktionen (zusammengefasst in<sup>1</sup>). Die zum Teil reversiblen PTMs stellen daher zusätzlich zur transkriptionalen und posttranskriptionalen Regulation eine weitere noch dynamischere Regulationsmöglichkeit der zellulären Aktivität dar. PTMs spielen eine große Rolle in Signaltransduktionsketten und erlauben in Kombination mit Proteinen, die PTM-Erkennungsdomänen besitzen, eine schnelle Antwort auf interne und externe Stimuli<sup>2</sup>. Durch die Kombinationsmöglichkeiten und Reversibilität von PTMs sind zudem Wechselwirkungen zwischen verschiedenen konvergenten Signaltransduktionswegen möglich<sup>3</sup>. Schätzungsweise 5% des Säuger-Proteoms bestehen aus Enzymen, die über 200 verschiedene Typen von PTMs in Proteine einführen. Neben häufig auftretenden PTMs wie Phosphorylierungen oder Acetylierungen gibt es wenige einzigartige Modifikationen, die wie die Hypusin-Modifikation in einem einzigen Protein vorkommen<sup>4</sup>.

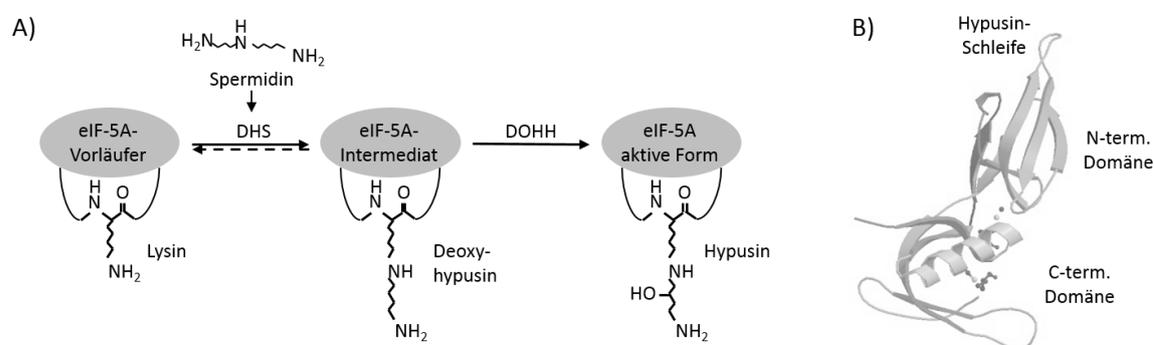
## 1.1 Die Hypusin-Modifikation

### 1.1.1 Die Hypusin-Synthese und eIF-5A

Hypusin wurde 1971 bei der Suche nach neuen Aminosäuren in Rinderhirnhomogenaten entdeckt<sup>5</sup> und einige Jahre danach wurde das zugehörige Hypusin-modifizierte Protein eIF-5A identifiziert<sup>6,7</sup>.

Hypusin wird posttranslational in einem zweistufigen Prozess aus Lysin gebildet. Im ersten Schritt katalysiert die Deoxyhypusin-Synthase (DHS) NAD<sup>+</sup>-abhängig die Spaltung von Spermidin und den Transfer einer 4-Aminobutylgruppe auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines spezifischen Lysin-Restes. Im zweiten Schritt wird das Deoxyhypusin-Intermediat von der

Deoxyhypusin-Hydroxylase (DOHH) hydroxyliert, so dass Hypusin (N<sup>ε</sup>-[4-Amino-2-hydroxybutyl-]lysin) entsteht (Abbildung 1-1). Während der erste Schritt reversibel erfolgt, ist der zweite Schritt irreversibel und fixiert die Modifikation<sup>8</sup>.



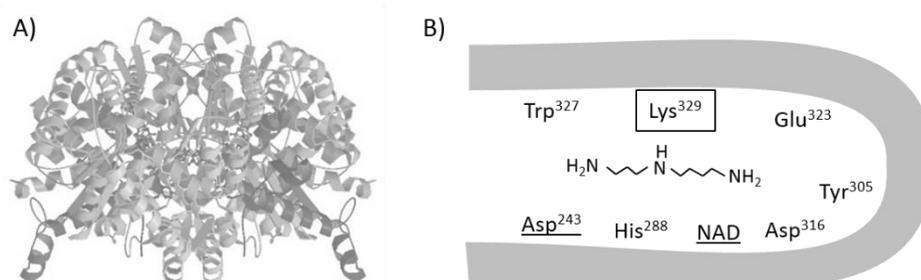
**Abbildung 1-1: Aktivierung von eIF-5A durch Hypusin-Modifikation.** A) In einem zweistufigen Prozess wird ein spezifischer Lysin-Rest des eIF-5A-Vorläufers zu Hypusin umgewandelt. Dieser Prozess wird von den Enzymen DHS und DOHH katalysiert. B) Die Röntgenstrukturanalyse des eIF-5A-Proteins von *Leishmania mexicana* zeigt die beiden Domänen des eIF-5A-Proteins sowie die besonders stark konservierte Hypusin-Schleife. Abbildung modifiziert nach<sup>9</sup>.

Die Hypusin-Modifikation findet einzig an einem spezifischen Lysin-Rest (Lys<sup>50</sup>) des eukaryotischen Initiationsfaktors 5A (eIF-5A) statt. eIF-5A ist ein 17 kDa kleines, hochkonserviertes Protein, das in zwei Isoformen vorkommt. Während eIF-5A1 in Säugern ubiquitär und stark exprimiert wird, kann nur in Testis und Gehirn auch eIF-5A2 nachgewiesen werden. eIF-5A besteht aus zwei Domänen. Die saure C-terminale Domäne ähnelt einer prokaryotischen Oligonukleotid-Bindungsdomäne, die N-terminale Domäne beinhaltet eine flexible Schleife, die den spezifische Lysin-Rest (Lys<sup>50</sup>) für die Hypusin-Modifikation enthält. Die Hypusin-Modifikation beeinflusst die Bindungseigenschaften von eIF-5A und führt zu seiner Aktivierung (zusammengefasst in<sup>10</sup>). Das meiste in der Zelle vorliegende eIF-5A ist vollständig hypusiniert und eine Inhibierung der Hypusinierungsenzyme DHS oder DOHH wirkt in Säugerzellen antiproliferativ<sup>11,12</sup>. Auch Acetylierungen beeinflussen die eIF-5A-Aktivität. Eine Acetylierung des Hypusin-Restes führt zur Inaktivierung von eIF-5A<sup>13</sup>. Die Hypusin-Modifikation und eine Acetylierung an Lys<sup>47</sup> schließen sich dagegen gegenseitig aus<sup>14</sup>.

## 1.1.2 Die Hypusininierungsenzyme

Die beiden Hypusininierungsenzyme konnten erst knapp 15 bzw. 25 Jahre nach der Entdeckung von Hypusin aufgereinigt werden<sup>15,16</sup>. Während das erste Enzym 1986 identifiziert wurde, gelang die Identifikation des zweiten Gens erst 2006<sup>17</sup>.

Die Deoxyhypusin-Synthase (DHS) katalysiert den ersten Schritt der Hypusin-Modifikation und benötigt neben den Substraten Spermidin und eIF-5A den Kofaktor NAD. DHS ist ein tetrameres Enzym, das aus vier identischen Untereinheiten zu je 41 kDa besteht, und als ein Dimer bestehend aus zwei Dimeren angesehen werden kann (Abbildung 1-2). Dabei bilden jeweils zwei Dimere an ihrer Berührungsfläche zwei antiparallele aktive Zentren, die in einem Tunnel liegen. Diese Unzugänglichkeit, kombiniert mit vielen negativ geladenen Aminosäureresten an den Tunnelwänden und am Eingang, verleiht dem Enzym eine hohe Spezifität gegenüber seinen Substraten<sup>18</sup>. Eine wichtige Rolle spielt ein hoch konservierter Lysin-Rest (Lys<sup>329</sup>) im aktiven Zentrum, der mit der 4-Aminobutylgruppe von Spermidin ein Enzym-lmin-Intermediat bildet<sup>19</sup>. Der Kofaktor NAD bindet an eine Rossmann-Falte, die im Zentrum jedes Monomers enthalten ist, und interagiert mit einer Schleife eines anderen Monomers, die auch am aktiven Zentrum beteiligt ist<sup>18</sup>. Die an der Bindung von Spermidin und vom Kofaktor NAD beteiligten Aminosäuren sind stark konserviert<sup>20</sup>. Da neben eIF-5A(Lys) auch eIF-5A(Deoxyhypusin) als Substrat dienen kann, ist die DHS-katalysierte Reaktion reversibel<sup>21</sup>. Eine Inhibierung der DHS-Aktivität ist über Spermidin-Analoga wie GC7 möglich, die das aktive Zentrum besetzen<sup>18</sup>.



**Abbildung 1-2: Struktur des DHS-Tetramers und der Spermidin-Bindungsstelle.** A) Das DHS-Enzym wird aus vier identischen Untereinheiten gebildet, die sich als Dimer eines Dimers zusammenlagern und an den Dimer-Berührungsflächen je zwei aktive Zentren bilden. B) An der Spermidin-Bindung sind neben Lys<sup>329</sup> weitere Aminosäuren beteiligt, die z. T. wie Asp<sup>243</sup> und NAD vom anderen Dimer stammen. Abbildungen modifiziert übernommen aus <sup>18,22</sup>.

Der zweite Schritt der Hypusin-Modifikation wird von der Deoxyhypusin-Hydroxylase (DOHH) katalysiert, einer untypischen Hydroxylase, die acht HEAT-Wiederholungsmotive, antiparallele Alpha-helices von je etwa 50 Aminosäuren, enthält. Das aktive Zentrum besteht aus zwei Eisenatomen, die von vier His-Glu-Motiven koordiniert werden, so dass die DOHH-Aktivität durch Eisen-Chelatbildner wie Mimosin oder Ciclopirox gehemmt werden kann<sup>12,23</sup>.

### 1.1.3 Evolutionäre Konservierung und essentielle Bedeutung der Hypusin-Modifikation

eIF-5A ist hoch konserviert und weist strukturelle<sup>24</sup> und funktionelle<sup>25</sup> Ähnlichkeiten zu seinem bakteriellen Homolog EF-P auf. Während EF-P nicht hypusiniert, sondern lysyliert wird<sup>26</sup>, kann schon in Archaeen neben einem eIF-5A- auch ein DHS-Homolog, aber kein DOHH-Homolog gefunden werden<sup>8</sup>. Alle Eukaryoten besitzen zusätzlich ein DOHH-Homolog und alle drei Proteine sind sehr stark konserviert, bei eIF-5A zeigt sich dies insbesondere in der Hypusin-Schleife<sup>20</sup>.

**Tabelle 1-1: Evolution von eIF-5A und der Hypusin-Modifikation.** Während in Bakterien lysinyliertes EF-P eine wichtige Rolle spielt, konnte schon in Archaeen ein DHS-Homolog gefunden werden. In allen Eukaryoten kommt zusätzlich ein DOHH-Homolog vor. Die essentielle Bedeutung der entsprechenden Gene nimmt im Lauf der Evolution zu. Essentielle Gene sind unterstrichen, vermutlich essentielle Gene gepunktet unterstrichen dargestellt.

	Bakterien	Archaeen	Eukaryoten		
			<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. elegans</i>	<i>M. musculus</i>
<i>If-5a</i> -Homolog	<i>ef-p</i>	<u><i>aIF-5A</i></u>	<u><i>TIF51A/B</i></u>	<i>iff</i>	<u><i>Eif-5a</i></u>
<i>Dhs</i> -Homolog	-	<u><i>dys</i></u>	<u><i>DYS1</i></u>	<u><i>y17q7b.4</i></u>	<u><i>Dhs</i></u>
<i>Dohh</i> -Homolog	-	?	<i>LIA1</i>	<u><i>tag-242</i></u>	<u><i>Dohh</i></u>
Modifikation	z. T. β-Lysyl-Lysin	Deoxyhypusin od. Hypusin	Hypusin	Hypusin	Hypusin

In ähnlicher Weise nimmt auch die essentielle Bedeutung der Hypusin-Modifikation in der evolutionären Entwicklung zu (Tabelle 1-1). Schon in Archaeen führt die DHS-Inhibition zum Zellzyklus-Arrest<sup>27</sup>. In einzelligen Eukaryoten wie *S. cerevisiae* ist sowohl die Deletion der

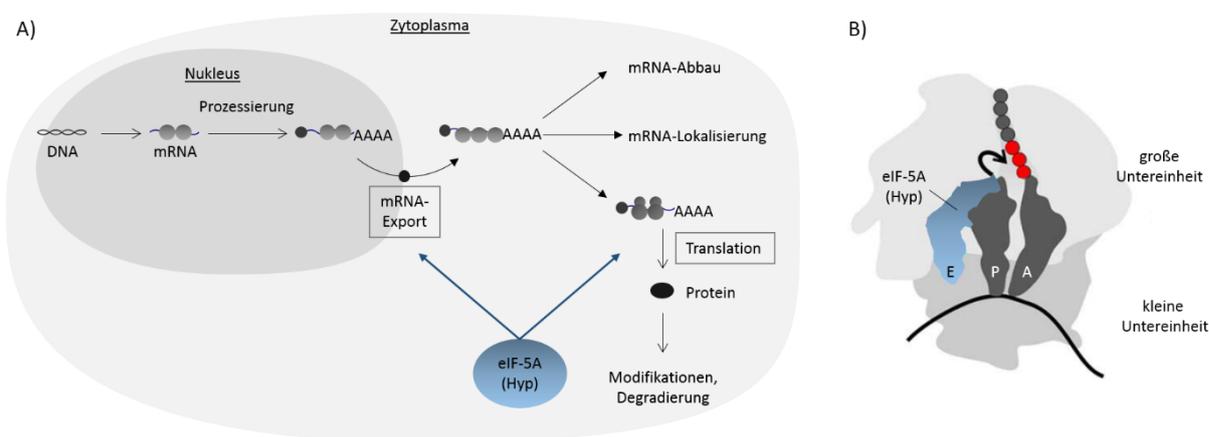
*Eif-5a*-Gene<sup>28</sup> als auch des *Dhs*-Gens<sup>29,30</sup> letal, während die Inaktivierung des *Dohh*-Gens vital ist und nur eine leichte Wachstums-Reduktion verursacht<sup>17,31</sup>. In multizellulären Eukaryoten wie *C. elegans*<sup>32,33</sup> und *D. melanogaster*<sup>34,35</sup> ist dagegen auch der Verlust des *Dohh*-Gens letal. In einzelligen Eukaryoten scheint das Deoxyhypusin-haltige eIF-5A-Intermediat also alle essentiellen Funktionen von eIF-5A erfüllen zu können, während in höheren Eukaryoten vollständig hypusiniertes eIF-5A benötigt wird. Daten über eine Gen-Inaktivierung in Säugern lagen zu Beginn dieser Arbeit nicht vor. Insbesondere ist nicht bekannt, ob die vermutete essentielle Bedeutung nur auf einer Rolle von Hypusin-haltigem eIF-5A während der Embryonalentwicklung<sup>36</sup> beruht oder ob Hypusin-haltiges eIF-5A auch postnatal eine essentielle Funktion erfüllt.

Die meisten Eukaryoten besitzen zwei oder mehr *Eif-5a*-Gene, deren Expressionsmuster sich sehr zwischen verschiedenen Eukaryoten unterscheiden. Die beiden *Eif-5a*-Gene in *S. cerevisiae* sind funktionell identisch und werden abhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit reziprok exprimiert<sup>37,38</sup>. In Fischen, Amphibien und Hühnern werden dagegen beide *Eif-5a*-Gene partiell oder vollständig koexprimiert, während in Säugern die Isoform eIF-5A1 ubiquitär und die Isoform eIF-5A2 nur in spezifischen Geweben wie dem Testis und Gehirn exprimiert wird<sup>39,40</sup>. Die beiden humanen Isoformen weisen eine Aminosäure-Identität von 84% auf, Unterschiede liegen vor allem im C-terminalen Bereich. Bislang ist unklar, ob beide Isoformen in Säugern funktionell identisch sind. Zumindest in *S. cerevisiae* können beide humanen Isoformen das Wachstum von eIF-5A-defizienten Zellen komplementieren<sup>40</sup>. Es ist nicht bekannt, ob auch eIF-5A2 essentiell ist, ebenso wenig konnte bislang eine Isoform-spezifische Funktion identifiziert werden.

#### 1.1.4 Funktionen von eIF-5A1

Obwohl eIF-5A1 ursprünglich als Initiationsfaktor entdeckt und benannt wurde<sup>41</sup>, zeigen neuere Untersuchungen eine Beteiligung von eIF-5A1 an der Translations-Elongation<sup>42,43</sup>. Dabei scheint eIF-5A1 kein globaler Translations-Elongationsfaktor zu sein, sondern fördert wie sein bakterielles Homolog EF-P beispielsweise spezifisch die Peptidbindung zwischen konsekutiven Prolin-Resten<sup>25</sup>. Aufgrund der großen Bedeutung von eIF-5A1 wird auch bei weiteren Aminosäuremotiven eine Translations-fördernde Wirkung von eIF-5A1 vermutet.

eIF-5A1 ähnelt der Form einer tRNA<sup>44</sup>, könnte über die E-Stelle ins Ribosom eintreten und möglicherweise durch Insertion der Hypusin-Seitenkette ins Peptidyl-Transferase-Zentrum der großen ribosomalen Untereinheit die richtige Konformation des Peptidyl-Transferase-Zentrums oder der einzubauenden Prolin-Aminosäure stabilisieren oder das Abfallen der Peptidyl-tRNA vom stockenden Ribosom verhindern<sup>45</sup> (Abbildung 1-3).



**Abbildung 1-3: Funktion von eIF-5A.** A) eIF-5A greift vermutlich an zwei Stellen in den mRNA-Lebenszyklus ein, indem es den nukleären Export und die Translation spezifischer mRNAs fördert. B) Nach dem Abfallen der Aminoacyl-tRNA von der E-Stelle eines stockenden Ribosoms könnte eIF-5A an das Ribosom binden und möglicherweise die richtige Konformation des Peptidyl-Transferase Zentrums stabilisieren. Abbildung modifiziert nach <sup>45</sup>.

Es gibt Hinweise, dass eIF-5A1 nicht nur als spezifischer Translationselongationsfaktor wirkt, sondern auch beim nukleo-zytoplasmatischen Transport eine Rolle spielt. eIF-5A1 akkumuliert an nukleären Poren und interagiert mit den nukleären Exportrezeptoren CRM1<sup>46</sup> und Exportin 4<sup>47</sup>. In HIV-1-infizierten Zellen ist eIF-5A1 als zellulärer Kofaktor des retroviralen Proteins Rev am Export ungespleißter oder partiell gespleißter viraler mRNAs ins Zytoplasma beteiligt<sup>48,49</sup>. In Inselzellen des Pankreas fördert eIF-5A1 den Export der *Nos2*-mRNA und trägt so zur Zytokin-vermittelten Dysfunktion der  $\beta$ -Zellen bei<sup>50</sup>. Auch in anderen Modellen hat eIF-5A1 einen Einfluss auf die Expression von Zytokinen<sup>51,52</sup>.

Die Funktion als spezifischer Translationselongationsfaktor oder spezifischer Exportfaktor könnte alle weiteren beobachteten Effekte von eIF-5A1 als indirekte Effekte erklären. So könnte die Rolle von eIF-5A1 bei der zellulären Proliferation und Zellzyklusprogression<sup>12,53</sup>, Aktin-Polarisierung<sup>54,55</sup> und Differenzierung<sup>36,56</sup> durch selektiven nukleären Export und/oder Translation entsprechender mRNAs gedeutet werden. Auch die mögliche Rolle im mRNA-Abbau<sup>57,58</sup> ist vermutlich nur ein sekundärer Effekt der Translationsfunktion. Die Beteiligung

von eIF-5A1 an Stressantworten<sup>59,60</sup> könnte ebenfalls darauf hindeuten, dass eIF-5A1 auf spezifische Gruppen von Transkripten einwirkt.

Woraus diese spezifische Gruppe von Transkripten, neben den für Prolin-reiche Proteine kodierenden Transkripten, besteht, ist bislang unbekannt. Worüber die Wirkungsweise von eIF-5A1 zustande kommt, ist demnach bisher nicht geklärt. Während die zuvor beschriebenen Funktionen von eIF-5A1 Hypusin-abhängig sind, ist auch unklar, welche Rolle die anderen eIF-5A1-Modifikationsformen sowie eIF-5A2 spielen. Für die unhypusinierte eIF-5A1-Form wurde beispielsweise eine pro-apoptotische Rolle beobachtet bzw. postuliert<sup>61-63</sup>.

### 1.1.5 Zusammenhang der Hypusin-Modifikation mit Erkrankungen

Wie zuvor erwähnt, ist eIF-5A1 über seine vermutete Funktion als nukleärer Exportfaktor in die Entstehung von Diabetes sowie den Lebenszyklus von HIV-1 involviert (siehe 1.1.4). Des Weiteren spielt eIF-5A1 auch bei der Tumorentstehung und –progression eine Rolle. So konnte in Lungen-Adenokarzinomen<sup>64</sup>, bei chronisch myeloischer Leukämie<sup>65</sup>, in kolorektalen Adenomen<sup>66</sup> und Karzinomen<sup>67</sup> eine verstärkte Expression von eIF-5A1 gefunden werden. Auch die Hypusinierungsenzyme DHS und DOHH sind in Glioblastomen<sup>68</sup> und in hepatozellulären Karzinomen<sup>69</sup> überexprimiert. Vor allem aber wird die Isoform eIF-5A2 mit Tumorerkrankungen in Zusammenhang gebracht. eIF-5A2 wird in einer Vielzahl von Tumoren wie Ovarialkarzinomen<sup>70-72</sup>, kolorektalen Karzinomen<sup>73</sup>, urothelialen Karzinomen<sup>74,75</sup>, hepatozellulären Karzinomen<sup>69,76</sup> und nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen<sup>77</sup> exprimiert und spielt eine Rolle bei der Metastasierung<sup>73,76,78,79</sup>. Da eine eIF-5A2-Überexpression in Verbindung mit anderen genetischen Veränderungen auch *in vitro* zu Anker-unabhängigem Wachstum führt und eine Tumorbildung in Nacktmäusen auslösen kann<sup>71,80</sup>, wurde eIF-5A2 als Onkogen postuliert.

eIF-5A und seine Hypusin-Modifikation stellen also eine potentielle Zielstruktur für neue Therapien dar. In Zellkultur- bzw. Mausexperimenten konnte bereits die vorteilhafte Wirkung von Hypusinierungs-Inhibitoren bzw. gegen eIF-5A oder die Hypusinierungsenzyme gerichtete Antisense-RNA bei Melanomen<sup>81</sup>, Glioblastomen<sup>68</sup>, Ovarialkarzinomen<sup>71</sup> und hepatozellulären Karzinomen<sup>69</sup> beobachtet werden.

Der Zusammenhang von eIF-5A und Hypusin mit der Tumorentstehung und –progression lässt sich vermutlich über seine Transport-Funktion oder Translations-fördernde Wirkung auf spezifische, bisher noch nicht identifizierte, mRNA-Gruppen erklären. Worauf die stark onkogene Wirkung der Isoform eIF-5A2 basiert, ist bisher vor dem Hintergrund der großen Ähnlichkeit beider eIF-5A-Isoformen unklar.

## 1.2 Werkzeuge zur Untersuchung

### 1.2.1 Mausmodelle für Gen-Funktionsuntersuchungen

Um die Funktion von Genen *in vivo* zu untersuchen, werden häufig genetisch veränderte Mauslinien eingesetzt. Mäuse sind durch ihre relativ geringe Größe, kurze Generationszeit und beschleunigte Lebensspanne ein gut geeigneter Modellorganismus und weisen in Anatomie, Physiologie und Genetik große Ähnlichkeiten zum Menschen auf. 99% der murinen Gene haben ein Homolog im humanen Genom<sup>82</sup>. Außerdem sind verschiedenste Techniken etabliert, mit denen das Mausgenom manipuliert werden kann.

Insbesondere ist die gezielte Veränderung eines definierten Locus durch homologe Rekombination in der Maus mittlerweile ein Standardverfahren, das auch die konditionale Inaktivierung eines bestimmten Gens ermöglicht. Zu diesem Zweck wird das Gen in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) durch Einbringen eines *Targeting Vectors* mutiert<sup>83</sup>. Werden die so veränderten ES-Zellen in Blastozysten injiziert, können chimäre Mäuse entstehen, aus denen im Fall einer Keimbahntransmission eine *Knockout* (KO)-Mauslinie generiert werden kann. KO-Mausmodelle erlauben die Inaktivierung eines Gens, so dass aus dem Phänotyp der KO-Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Tieren auf die Funktion des korrespondierenden Proteins im Säugerorganismus geschlossen werden kann.

In 25% der Fälle führt eine Geninaktivierung allerdings zu einem embryonal letalen Phänotyp. Mit einer konditionalen *Knockout*-Strategie kann embryonale Letalität umgangen und die spatio-temporale Funktion des Gens untersucht werden. Ermöglicht werden konditionale KO-Strategien durch Sequenz-spezifische Rekombinasen wie Cre und Flp, die die Rekombination zwischen entsprechenden spezifischen Erkennungssequenzen, wie den loxP- oder FRT-

Elementen, katalysieren. Diese Erkennungssequenzen werden so in die Intronbereiche des zu deletierenden Gens eingeführt, dass kritische Genbereiche von diesen flankiert werden. Erst nach Verpaarung mit einer Rekombinase-exprimierenden Mauslinie kommt es je nach verwendetem Promotor zu einer Zelltyp-spezifischen oder induzierbaren Gen-Deletion (zusammengefasst in<sup>84</sup>). Ein induzierbarer KO kann durch transkriptionale oder posttranskriptionale Kontrolle der Rekombinaseaktivität erfolgen. Dabei kann beispielsweise die Cre-Expression im sogenannten Tet-System über Doxycyclin-Gabe reguliert werden<sup>85</sup> oder das Cre-Protein durch Fusion mit einer modifizierten Steroidantagonisten-bindenden Domäne des Östrogenrezeptors durch Bindung an Chaperonproteine wie Hsp90 im Zytoplasma zurückgehalten werden und erst nach 4-Hydroxytamoxifen-Gabe an seinen Wirkort gelangen<sup>86,87</sup>.

### 1.2.2 Methoden zur Identifizierung von RNA-Protein-Interaktionen

RNA-bindende Proteine spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation der Genexpression. Alle Schritte im Lebenszyklus einer RNA von der Prozessierung bis zur Degradation werden von RNA-bindenden Proteinen koordiniert<sup>88,89</sup>.

Je nachdem, ob von einem bekannten Protein oder einer bekannten RNA ausgegangen wird, werden unterschiedliche Methoden eingesetzt, um Interaktionspartner zu identifizieren. Ist der Ausgangspunkt eine RNA können seine Protein-Interaktionspartner über eine RNA-Affinitätsmarkierung oder eine Peptid-Nukleinsäure-vermittelten Identifizierung von RNA-bindenden Proteinen (PAIR) aufgespürt werden. Bei der RNA-Affinitätsmarkierung<sup>90</sup> werden chemisch veränderte Nukleotide oder eine Sequenz, die zur Bindung an ein bekanntes Element führt, in die RNA eingebaut, während bei der PAIR-Methode<sup>91</sup> eine komplementäre Peptid-Nukleinsäure gekoppelt an ein Photo-aktivierbares Aminosäure-Addukt, das zur Quervernetzung mit den gebundenen Proteinen führt, zur Aufreinigung der Protein-Interaktionspartner eingesetzt wird.

Ist der Ausgangspunkt ein Protein, können über eine Ribonukleoprotein-Immunopräzipitation gefolgt von einer *Microarray*-Analyse (RIP-Chip), über eine genomische systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (gSELEX) oder über eine

Quervernetzung und Immunopräzipitation verstärkt durch ein Photo-aktivierbares Ribonukleosid (PAR-CLIP) interagierende mRNAs bestimmt werden.

Bei der gSELEX-Methode<sup>92</sup> wird eine genomische Bibliothek in RNA umgeschrieben und die an das gewünschte Protein bindenden RNAs mehrfach angereichert. Vorteilhaft ist, dass auch nicht-exprimierte RNAs getestet werden können und nur direkte Protein-Interaktionen identifiziert werden. Allerdings handelt es sich bei den RNA-Sequenzen nicht um natürlich vorkommende RNAs, sondern um RNA-Fragmente, die zu Artefakten führen können. Durch die mehrfache reverse Transkription gehen zudem bevorzugt hoch-strukturierte RNAs verloren. Bei der RIP-Chip-Methode<sup>93</sup> werden dagegen über die Kopräzipitation von RNAs mit ihren RNA-bindenden Proteinen und die Identifizierung mittels *Microarray* physiologisch relevante Interaktionen untersucht, allerdings können direkte und indirekte Interaktionen nicht unterschieden werden. Dagegen kommt es bei der PAR-CLIP<sup>94</sup>, bei der ein Photo-reaktives Ribonukleosid-Analog in die RNA eingebaut wird, durch die Quervernetzung zu einer Transition, so dass durch Sequenzierung die Protein-Bindungsstellen innerhalb der RNAs identifiziert werden können.

Sind bereits Protein- oder RNA-Kandidaten bekannt, kann die RNA-Protein-Interaktion mit weiteren Methoden wie beispielsweise dem *RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay* (REMSA)<sup>95</sup> detaillierter untersucht werden.

## 1.3 Fragestellung

Bei der Hypusin-Modifikation handelt es sich um eine posttranslationale Modifikation, die nur in dem Protein eIF-5A auftritt. Trotz ihrer essentiellen Bedeutung für zelluläre Proliferation ist ihre Funktion bisher nicht umfassend geklärt. Da sowohl das modifizierte Protein eIF-5A als auch die dafür notwendigen Enzyme DHS und DOHH in verschiedenen Tumorentitäten dereguliert vorliegen und bei der HIV-Infektion sowie bei Diabetes eine funktionelle Rolle spielen, stellt die Hypusin-Modifikation eine aussichtsreiche Zielstruktur für neue Therapien dar<sup>50,62,65,96</sup> (vgl. Abschnitt 1.1). Für die Abschätzung des therapeutischen Potenzials wird eine detaillierte Kenntnis über die Bedeutung der Hypusin-Modifikation und die molekularen Grundlagen, auf denen ihre Funktion basiert, benötigt.

Um die Bedeutung der Hypusin-Modifikation in Säugern genauer zu untersuchen, sollte eine konditionale *Dhs-Knockout*-Mauslinie generiert werden. Mit dieser sollte zum einen die Vermutung bestätigt werden, dass das *Dhs*-Gen in Säugern essentiell ist und zu embryonaler Letalität führt. Zum anderen sollte untersucht werden, ob das *Dhs*-Gen auch nach der Embryonalentwicklung eine essentielle Rolle spielt und wie sich sein Verlust im Vergleich zum Verlust des *Dohh*-Gens<sup>97</sup> äußert. Außerdem sollte getestet werden, ob sich in den heterozygoten *Dhs*-Tieren Gendosis-Effekte beobachten lassen.

Auch die Bedeutung der Isoform eIF-5A2 in Säugern sollte mithilfe einer konditionalen KO-Mauslinie<sup>98</sup> untersucht werden, um herauszufinden, ob das *Eif-5a2*-Gen grundsätzlich essentiell ist oder möglicherweise eine Isoform-spezifische Funktion besitzt.

Eine Analyse der mRNA-Interaktionspartner sollte dazu beitragen, die molekularen Grundlagen der eIF-5A-Wirkungsweise zu verstehen. Da die Funktionen von eIF-5A eng mit mRNAs zusammenhängen, bisher aber nur wenige Transkripte mit eIF-5A assoziiert wurden, sollten in einem genomweiten Screening per Ribonukleoprotein-Immunopräzipitation mit anschließender *Microarray*-Analyse zunächst interagierende mRNAs identifiziert werden. Durch eine bioinformatische Analyse der Ergebnisse sollte untersucht werden, ob sich die Bedeutung von eIF-5A über seine mRNA-Interaktionspartner erklären lässt und diese eine molekulare Grundlage für seine Wirkungsweise darstellen. Auch sollte untersucht werden, ob Unterschiede zwischen den interagierenden mRNAs beider eIF-5A-Isoformen ihre unterschiedliche Wirkung erklären oder Hinweise auf ihre jeweilige Funktion liefern.

Insgesamt sollten Grundlagen für eine therapeutische Inhibition der Hypusin-Modifikation dadurch geschaffen werden, dass zum einen vielseitig anwendbare Mausmodelle für die Inhibierung der Hypusin-Modifikation etabliert und zum anderen Interaktionspartner identifiziert werden, die die Wirkungsweise von eIF-5A auf molekularer Ebene verständlich machen könnten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Mausstämme

<u>Mausstamm</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Herkunft</u>
C57BL/6J	Häufig verwendeter Inzuchtstamm zur bio-medizinischen Grundlagenforschung	VTH, UKE
<i>Flp-Deleter</i>	B6;SJL-Tg(ACTFLPe)9205Dym/J  Transgener Mausstamm mit ubiquitärer Expression einer modifizierten Flp-Rekombinase vom humanen $\beta$ -Aktin-Promotor zur Deletion von FRT-flankierten Genabschnitten <sup>99</sup>	VTH, UKE
<i>Cre-Deleter</i>	B6.C-Tg(CMV-cre)1Cgn/J  Transgener Mausstamm mit ubiquitärer Expression einer modifizierten Cre-Rekombinase vom X-Chromosom unter Kontrolle eines CMV-Minimalpromotors zur Deletion von loxP-flankierten Genabschnitten <sup>100</sup>	VTH, UKE
CAG-cre/Esr1	B6.Cg-Tg(CAG-cre/Esr1*) <sup>5Amc/J113</sup>  Transgener Mausstamm mit Expression eines Fusionsproteins aus Cre-Rekombinase und mutiertem Östrogenrezeptor vom CAG-Promotor <sup>101</sup>	Jackson Laboratory (004682)
<i>Dhs</i> <sup>tm2a</sup>	C57BL/6- <i>Dhs</i> <sup>tm2a(EUCOMM)Wtsi</sup>  Transgener Mausstamm mit für den konditionalen <i>Knockout</i> markiertem <i>Dhs</i> -Allel	Eigene Generierung
<i>Eif-5a2</i> <sup>tm1a</sup>	C57BL/6- <i>Eif-5a2</i> <sup>tm1a(EUCOMM)Hmgu</sup>  Transgener Mausstamm mit für den konditionalen <i>Knockout</i> markiertem <i>Eif-5a2</i> -Allel	Eigene Generierung

Alle transgenen Mausstämme haben den genetischen Hintergrund des Stammes C57BL/6.

## 2.1.2 Zellen

<u>Zelltyp</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Herkunft</u>
NIH-3T3	Murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie	KMT, UKE
293T	Humane Nieren-Zelllinie mit stabiler Expression einer SV-40 <i>large T-Antigen</i> -Mutante	ATCC (CRL-11268)
Phoenix eco	Verpackungs-Zelllinie zur Herstellung ecotropher Virusüberstände: Derivat der humanen Nieren-Zelllinie 293T mit stabiler Expression der viralen Gene <i>gag-pol</i> und <i>env</i>	ATCC (CRL-3214)
IDG3.2	Murine Hybrid-ES-Zelllinie, aus einer männlichen (C57BL/6J x 129S6/SvEvTac)-F1-Blastozyste generiert	Dr. Ralf Kühn, Helmholtz Zentrum München
EPD0628_1_B06, EPD0628_1_C06, EPD0628_1_F05	ES-Zellklone, abgeleitet von der murinen ES-Zelllinie JM8A3.N1, die das Allel $Dhs^{tm2a(EUCOMM)Wtsi}$ tragen	EUCOMM
MEF-neo	Murine embryonale Fibroblasten mit Neomycin-Resistenzgen zur Verwendung als <i>Feeder</i> -Zellen	PD Dr. Irm Hermans- Borgmeyer, UKE
$Dhs^{+/+};CAG-$ $cre/Esr1^+$ , $Dhs^{+/p};CAG-$ $cre/Esr1^+$ , $Dhs^{p/p};CAG-$ $cre/Esr1^+$	Aus der Mauslinie $Dhs^{tm2a}$ gewonnene MEFs mit Expression eines Fusionsproteins aus Cre-Rekombinase und einem mutierten Östrogenrezeptor zur Tamoxifen-abhängigen Induktion des <i>Dhs-Knockouts in vitro</i>	Eigene Präparation

## 2.1.3 Bakterienstämme

<u>Stamm</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Hersteller</u>
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>MAX Efficiency DH5<math>\alpha</math> Competent Cells</i> für die Transformation durch Hitzeschock	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>ElectroMAX DH5<math>\alpha</math>-E Competent Cells</i> für die Transformation durch Elektroporation	Invitrogen

## 2.1.4 Medien

### 2.1.4.1 Medien für die Kultivierung eukaryotischer Zellen

<u>Medium</u>	<u>Zusammensetzung</u>
DMEM-Kulturmedium	DMEM-Basalmedium (Gibco) 10% FCS, 50 U Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin
MEF-Medium für <i>Feeder</i> -Zellen	DMEM-Basalmedium (Gibco) 9% FCS, 1x nicht-essentielle Aminosäuren, 50 U Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin
MEF-Medium für <i>Dhs</i> -MEF-Zellen	DMEM-Basalmedium (Gibco) 10% FCS, 50 U Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 4 mM L-Glutamin, 25 µM β-Mercaptoethanol
ES-Zell-Medium für IDG3.2-Zellen	DMEM-Basalmedium, <i>high glucose</i> (Gibco) 15% FCS, 20 mM HEPES, 1 mM Natriumpyruvat, 1x Nicht-essentielle Aminosäuren, 0,1 mM β-Mercaptoethanol, 1500 U/mL <i>Leukaemia inhibiting factor</i>
ES-Zell-Medium für JM8A3.N1-Zellen	<i>Knockout</i> -DMEM-Basalmedium (Gibco) 15% FCS, 2 mM L-Glutamin, 0,1 mM β-Mercaptoethanol, 100 µg/mL G418, 1000 U/mL <i>Leukaemia inhibiting factor</i>
Einfriermedium	90% FCS, 10% DMSO
Einfriermedium für ES- und <i>Feeder</i> -Zellen	50% FCS, 40% Kulturmedium, 10% DMSO

### 2.1.4.2 Medienzusätze

<u>Zusatz</u>	<u>Hersteller</u>
DMSO	Sigma-Aldrich
FCS	Gibco
G418	Clonetech
HEPES	Roth
<i>Leukaemia inhibiting factor</i> (ESGRO)	Millipore
L-Glutamin	Biochrom
Natriumpyruvat	Gibco

Nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco
Penicillin-Streptomycin	Gibco
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

#### 2.1.4.3 Medien für die Anzucht von Bakterien

<u>Medium</u>	<u>Zusammensetzung</u>
LB-Medium (Roth)	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, pH 7,0
SOB-Medium (Roth)	20 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 0,96 g/L MgCl <sub>2</sub> , 0,5 g/L NaCl, 0,186 g/L KCl, pH 7,0
SOC-Medium	SOB-Medium, 20 mM Glukose

#### 2.1.5 Behandlung von Mäusen, Zellen, Bakterien

<u>Agens</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Hersteller</u>
<b>Mäuse</b>		
Tamoxifen-haltiges Mausfutter „LASCRdiet CreActiveTAM400“	400 mg/kg Futter	LASvendi
Narkotikum	12 mg/mL Ketamin, 1,6 mg/mL Xylazin, 0,9% NaCl	aniMedica GmbH / Wirtschaftsgenossenschaft Deutscher Tierärzte
Fixativ	4% PFA (w/v) in PBS, pH 7,4	Eigene Herstellung
<b>Eukaryotische Zellen</b>		
Chloroquin	2,5 µM	Sigma-Aldrich
Polybren	4 µg/mL	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA	0,25%	Gibco
4-Hydroxytamoxifen	10 nM – 1 µM	Sigma-Aldrich
G418	150 – 250 µg/mL	Clontech
GC7	50 µM	Biosearch Technologies
Mitomycin C	10 µg/mL	Sigma-Aldrich
Puromycin	2,5 µg/mL	Sigma-Aldrich

Trypanblau	0,2%	Sigma-Aldrich
------------	------	---------------

**Bakterien**

Ampicillin	100 µg/mL	Sigma-Aldrich
Kanamycin	50 µg/mL	Sigma-Aldrich
Chloramphenicol	30 µg/mL	Sigma-Aldrich
L-Arabinose	0,3 – 0,4% (w/v)	Sigma-Aldrich

2.1.6 Vektoren

<u>Vektor</u>	<u>Insert</u>	<u>Herkunft</u>
<b>für Herstellung des <i>Targeting Vectors</i></b>		
BAC RP23-359B23	u. a. <i>Dhs</i>	BACPAC Resources
BAC RP23-172M21	u. a. <i>Eif-5a1</i>	BACPAC Resources
pKD46	λ-Phagen <i>Red</i> -Gene	Dr. Barry Wanner, Universität Purdue <sup>102</sup>
pStart-K	-	Addgene
pWS-TK6	-	Addgene
loxP-gb2-cm-loxP	Chloramphenicol-Resistenzgen, von loxP-Elementen flankiert	Gene Bridges
loxP-FRT-PGK-gb2-neo-FRT	Neomycin-Resistenzgen, von FRT-Elementen flankiert	Gene Bridges
706-Cre	Cre-Rekombinase	Gene Bridges
pJET1.2	-	Fermentas
<b>Expressionsvektoren</b>		
pMSCV-puro	-	Clontech
pMSCV-eGFP-HA-puro	<i>eGFP</i> mit C-terminaler HA-Markierung	Labor Balabanov, UKE
pMSCV-eIF-5A1-HA-puro	murines <i>Eif-5a1</i> mit C-terminaler HA-Markierung	Labor Balabanov, UKE

pMSCV-eIF-5A1-K50R-HA-puro	murines <i>Eif-5a1</i> K50R-Mutation C-terminaler Markierung	mit und HA-	Labor Balabanov, UKE
pMSCV-eIF-5A2-HA-puro	murines <i>Eif-5a2</i> C-terminaler Markierung	mit HA-	Labor Balabanov, UKE
pMSCV-eIF-5A2-K50R-HA-puro	murines <i>Eif-5a2</i> K50R-Mutation C-terminaler Markierung	mit und HA-	Labor Balabanov, UKE
pMSCV-N-terminal-eIF-5A1-HA-puro	N-terminale Domäne von <i>Eif-5a1</i> C-terminaler Markierung	kloniert mit HA-	
pMSCV-C-terminal-eIF-5A1-HA-puro	C-terminale Domäne von <i>Eif-5a1</i> mit C-terminaler HA-Markierung	kloniert	

## 2.1.7 Oligonukleotide

### 2.1.7.1 Oligonukleotide für Klonierungen

<u>Oligonukleotid</u>	<u>Sequenz</u>
<b>Oligonukleotide zur Herstellung des Targeting Vector für Dhs</b>	
upstream oligo (DA1)	ACAATTGCACGTAGGTTTATTTCTTCTACTGCTGTGGGAGAGAGACATCGTTAACC GACTGAATTGGTTCTTTAAAGC
downstream oligo (DA2)	TCTACCTGTACCTGGGTTCTACATCTGCACATCTGACCAACTACACATTTGTTAACG CCGCACTCGAGATATCTAGACCCA
loxP-cm-loxP fwd (DB1)	TGTGGTTTTCTACTCTGCCTCCACATGTAGAACAGAGGGGTCATGTCCAATTAAC CCTCACTAAAGGGCGGCC
loxP-cm-loxP rev (DB2)	AACCCAGTGGCGTCCCTCCCAACCTGTGTAGGCCACTCAATTTCTCTGCTTAATACG ACTCACTATAGGGCTCGA
A-cm-B fwd (DC1)	GCAAGATCCGGATGGACGCACAGCCAGTAAAGGTAGATGGTGGCAGGGCACCTG CAGGATTCTACCGGGTAGGGGAGGGCGCTT
A-cm-B rev (DC2)	AAGACCTCAGTGAGCCCTGGAGCCATGGGCAGCCCACGGACCCTGCACCCCGTAC GCGCGCCGCACACAAAAACCAACACA
A-FRT-B fwd (DD1)	ACTGCCTGCAGGATAGGGCTCGAGGAAGTT
A-FRT-B rev (DD2)	ACTGCGTACGAAGGGCGGCCGCATAACT

**Oligonukleotide für Sequenzierung des *Dhs*-Targeting Vectors**

GCTAGCAACCTGGCTTATCG, TGGGAGCCAGGATTTAGAGA, CAGGGTCCTGCTCTCTATCG, TTTTGTTGTAGCGCTCATGC, GCTTGGTCGGTCTTTATTCG, CAAGGCACCCTAAGGAATGA,	TCAGCACACAAATTGCAACA, AGTTGAGGCTGCCAGGTCTA, CAAGTGACTTCCGGTTTCGT, CACTGCACTCACCATGAGGT, TCGTCCTGCAGTTCATTAG, GCCAACCACTGGAGACTCAC	TGTGGGACTCTGACTTGCTG, CCCCGCCATCACTATCTTAG, TTTCCTGTGCCCTTATGACC, CGTTGGCTACCCGTGATATT, TGACTAGGGGAGGAGTGAA,
--	--	--

**Oligonukleotide für Sondenklonierung für *Dhs***

Dhs-5'-Sonde-Sall fwd	GTCGACAGCCCTGGGACTTCTGTAT
Dhs-5'-Sonde-Sall rev	GTCGACAAGGGACCCTGAACTGGATT
Dhs-3'-Sonde-Ndel fwd	CATATGAGCCAACCTCCTTCCATTCA
Dhs-3'-Sonde-Ndel rev	CATATGATCAAAGGAGCTGGAGGACA

**Oligonukleotide für *Longrange*-PCR für *Dhs***

3' Universal (RAF5)	CACACCTCCCCCTGAACCTGAAAC
3' Gene Specific (GR4)	CAGGTTCTATCGATTCCAGTGTC
3' Gene Specific (GR3)	GTGGCCACGGCTACGAAGTGCTAG

**Oligonukleotide zur Herstellung des *Targeting Vectors* für *Eif-5a1***

upstream oligo (AA1)	AGTGCAATATTAATACTTTGACGTTATCTAAAGATGAGCGATCAGGATGTTAAC CGACTGAATTGGTTCCTTTAAAGC
downstream oligo (AA2)	TTATTTACCCTGGCACTCTAGTTCACGTCTTCCAAACACTCCAAGTGCACGTTAACG CCGCACTCGAGATATCTAGACCCA
loxP-cm-loxP fwd (AB1)	CAATATGTTTGACTCCAGTTTCAAAGCAGGAAATGCAACTTTATTTAGGTAATTAAC CCTCACTAAAGGGCGGCC
loxP-cm-loxP rev (AB2)	ATCCCATTCCTCCCTAAACACTGATCCACTTCCCCTTCATTCATTACCCTAATACGA CTCACTATAGGGCTCGA
A-cm-B fwd (AC1)	GTGGCTTAGAAGAGTGTGTATGTGGGGCGGTGTTGACTGCACCTGTGGCAATT GATTCTACCGGTAGGGGAGGCGCTT
A-cm-B rev (AC2)	AGTGACAGCAACTTCCTTCACTCCACAGCCTTACCAGCTCCCTCTTTCCCGTACGC GCGCCGCACAAAAACCAACACA
A-FRT-B fwd (AD1)	ACTGCAATTGATAGGGCTCGAGGAAGTT
A-FRT-B rev (AD2)	ACTGCGTACGAAGGGCGGCCGATAACT

**Oligonukleotide für Sequenzierung des *Eif-5a1*-Targeting Vectors**

GCTAGCAACCTGGCTTATCG, GCAAGGAGCTCTGGTCTTTTT, CCCTTTGGGGTTGTGATAAA, TCGTCCTGCAGTTCATTAG, GGCTCTCTCCCTGACACATT, AAGCGGTGTGAATAAGCTG,	TGGTTGTAATCCGACCACAC, ATGACTGGCTTGTGTGTGGA, CGTTGGCTACCCGTGATATT, TGACTAGGGGAGGAGTGAA, TGAGTCCGAGAAGCTGGTCT, GCCTTGGCCTCTACGTCATA,	TGCGTACTAAGACCCGTGTG, TGGTTTTGTGGTCTCAAAG, CGCTCAGAAGAACTCGTCAA, AAAATAACCGCTTCCAGGT, ACCTTTCCCTCACCGTAAGC, GTACCAGCAGGGCATAGAGG
---	---	---

**Oligonukleotide für Sondenklonierung für *Eif-5a1***

Eif-5a1-5'-Sonde-Sall fwd	GTCGACAAAAGCCAAATGGTGCAAAG
Eif-5a1-5'-Sonde-Sall rev	GTCGACGGACGTAGGCACAGCTTGAT
Eif-5a1-3'-Sonde-Sall fwd	GTCGACGGAACAGACCAGGGTTCAAA
Eif-5a1-3'-Sonde-Sall rev	GTCGACGGTAAAGGTGCATCCAGGAA

**Oligonukleotide für weitere Klonierungen**

N-terminal-eIF-5A1-HA fwd	CTAGAGATCTGCCACCATGGCAGATGATTTGGACTT
N-terminal-eIF-5A1-HA rev	CTGAGAATTCCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGTTGGGGACATCCATA TTAT
C-terminal-eIF-5A1-HA fwd	CTAGAGATCTGCCACCATGATCAAACGGAATGACTT
C-terminal-eIF-5A1-HA rev	CTAGGAATTCCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATTTGCCATGGCCTTG ATTG

2.1.7.2 Oligonukleotide für Genotypisierungen

Oligonukleotid

Sequenz

***Dhs-KO-Maus***

Dhs-for	CCTCTGCCCTCTCACAGACCTGCG
Dhs-5'-arm	AGAGCGCCCAGGTCCAAGGCTACG
Dhs-3'-arm	AGCGTTAAGCTCCTCTACAAAGC
Dhs-rev	ACCATCCGCAGGAGACCACACCTA

***Eif-5a2-KO-Maus***

Eif-5a2-5'-arm	AGCCGAGATGCTTGGGAACTGGAGG
Eif-5a2-3'-arm	TGGAGTATACTTTGCCATTCAGGCC
Eif-5a2-rev	AAGGCCAGCCTGAGACCTAT

**allgemeine Genotypisierungsprimer**

loxR	TGAACTGATGGCGAGCTCAGACC
LAR3	CAACGGGTTCTTCTGTTAGTCC
Flp for	GTCACTGCAGTTTAAATACAAGACG
Flp rev	GTTGCGCTAAAGAAGTATATGTGCC
Cre for	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC
Cre rev	GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT
CAG-Cre for	CTCTAGAGCCTCTGCTAACC
CAG-Cre rev	CCTGGCGATCCCTGAACATGTCC

### 2.1.7.3 Oligonukleotide für PCR

<u>Oligonukleotid</u>	<u>Sequenz</u>
18S-rRNA-fwd	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
18S-rRNA-rev	GTAACCCGTTGAACCCATT
Gapdh-fwd	TGCACCACCAACTGCTTA
Gapdh-rev	GATGCAGGGATGATGTTC
Eif-5a1-N-term-fwd	GGCAGATGATTTGGACTTCG
Eif-5a1-C-term-fwd	GACAGTGGGGAGGTACGAGA
Eif-5a2-fwd	CATGCAAATCGTGGAGATG
HA-Tag-rev	CGTAATCTGGAACATCGTATGG
Dhs-trunk-Ex.1-fwd	CGGCTTCCAGGCTACCAA
Dhs-trunk-Ex.8-rev	ACAGCGTAGTCTGCTCCATTCC

### 2.1.7.4 Oligonukleotide für qPCR

<u>Gen</u>		
<i>Dhs</i> (Exon 8+9)	fwd: ATGGACGCACAGCCAGTAAA	
	rev: CTGCCTTTGGGCGAATGTC	
<i>Dhs</i> (Exon 1+1/8)	fwd: TTCAACCGCGGCGTAGATTA	
	rev: TCTGCTCCATTCTCATGGC	
<i>Wdr83</i>	fwd: TGAGGCGCTATGACCTAAGGA	
	rev: CGTCCCGGCTGAAGCA	
<i>18S-rRNA</i>	Quantitect Oligonukleotid-Mix	QT01036875
<i>Dhs</i>	Quantitect Oligonukleotid-Mix	QT02529093
<i>Dohh</i>	Quantitect Oligonukleotid-Mix	QT00163268
<i>Eif-5a1</i>	Quantitect Oligonukleotid-Mix	QT01757861
<i>Rplp0</i>	Quantitect Oligonukleotid-Mix	QT00249375
<i>Pex6</i>	Quantitect Oligonukleotid-Mix	QT00169148
<i>Rbm14</i>	Quantitect Oligonukleotid-Mix	QT00291319
<i>Ccdc28b</i>	Quantitect Oligonukleotid-Mix	QT00124663
<i>Stip1</i>	Quantitect Oligonukleotid-Mix	QT01042552
<i>Sik2</i>	Quantitect Oligonukleotid-Mix	QT00129269
<i>Gtf2i</i>	Quantitect Oligonukleotid-Mix	QT00154280
<i>Brdt</i>	Quantitect Oligonukleotid-Mix	QT00141218

## 2.1.8 Antikörper

### 2.1.8.1 Primäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Produzent</u>	<u>Art</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
anti-DHS	Kaninchen	polyklonal	1 : 800	Santa Cruz
anti-eIF-5A1	Kaninchen	monoklonal	1 : 5.000	Novus
anti-HA	Kaninchen	polyklonal	1 : 1.000	Santa Cruz
anti-GAPDH	Maus	monoklonal	1 : 5.000	Chemicon
anti-Tubulin	Maus	monoklonal	1 : 5.000	Sigma-Aldrich
anti-Aktin	Maus	monoklonal	1 : 5.000	Calbiochem

### 2.1.8.2 Sekundäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Markierung</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
anti-Kaninchen	Meerrettich-Peroxidase	1 : 10.000	Amersham
anti-Kaninchen	IRDye 700DX/800CW	1 : 10.000	Li-Cor
anti-Maus	Meerrettich-Peroxidase	1 : 10.000	Amersham
anti-Maus	IRDye 700DX/800CW	1 : 10.000	Li-Cor

## 2.1.9 Größen- und Molekulargewichtsstandards

### 2.1.9.1 DNA-Größenstandards

<u>Größenstandard</u>	<u>Größenbereich</u>	<u>Hersteller</u>
100 bp DNA ladder	100 – 1.000 bp	Peqlab
Smart Ladder	200 – 10.000 bp	Eurogentec

### 2.1.9.2 Protein-Molekulargewichtsstandards

<u>Molekulargewichtsstandard</u>	<u>Größenbereich</u>	<u>Hersteller</u>
Marker IV	10 – 170 kDa	Peqlab

### 2.1.10 Enzyme

<u>Enzym</u>	<u>Hersteller</u>
Proteinase K	Fermentas
RNase A	Roth
diverse Restriktionsendonukleasen mit Puffern	New England Biolabs/Fermentas

### 2.1.11 Reagenzsysteme

<u>Reagenzsystem</u>	<u>Hersteller</u>
RNA-Aufreinigung: <i>Nucleo Spin RNA XS</i>	Macherey-Nagel
DNA-Entfernung nach RNA-Isolation: <i>DNaseI</i>	Fermentas
Erststrang-cDNA-Synthese: <i>RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	Fermentas
gDNA-Isolierung: <i>QIAamp DNA Blood Mini Kit</i>	Qiagen
PCR: <i>DreamTaq Green PCR Master Mix</i>	Fermentas
Klonierungs-PCR: <i>Phusion High-Fidelity PCR Kit</i>	Finnzymes
Long Range-PCR: <i>Long PCR Enzyme Mix</i>	Fermentas
qPCR-Mastermix: <i>Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG</i>	Life Technologies
DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen: <i>GeneJET Gel Extraction Kit</i>	Fermentas
PCR-Aufreinigung: <i>GeneJET PCR Purification Kit</i>	Fermentas
Plasmid-Mini-Präparation: <i>GeneJET Plasmid Miniprep Kit</i>	Fermentas
Plasmid-Maxi-Präparation: <i>PureYield Plasmid Maxiprep System</i>	Promega
Radioaktive Markierung: <i>Megaprime DNA Labelling System</i>	Amersham
BAC-Isolierung: <i>NucleoBond AX500</i>	Macherey-Nagel
Klonierung: <i>CloneJET PCR Cloning Kit</i>	Fermentas
Klonierung: <i>Gateway LR Clonase II Enzyme Mix</i>	Invitrogen
Ribonukleoprotein-Immunopräzipitation: <i>Magnetic anti-HA-MicroBeads, <math>\mu</math> Columns, <math>\mu</math>MACS Separator</i>	Miltenyi Biotec
Microarray: <i>3'-IVT Express Kit, Mouse Genome 430 2.0 GeneChips</i>	Affymetrix

## 2.1.12 Puffer und Lösungen

<u>Lösung</u>	<u>Zusammensetzung</u>
<b>Zellbiologische Methoden</b>	
2x HEPES-gepufferte Salzlösung	280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Natriumdihydrogenphosphat, 12 mM Glukose, 50 mM HEPES, pH 7,05, sterilfiltriert
<b>Molekularbiologische Methoden</b>	
50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer	2 M Tris, 100 mM EDTA, pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA
<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	
Western Blot-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,25% Natriumdeoxycholat, 1x Protease Inhibitor Cocktail
4x Ladepuffer	0,4% Glycerol, 1% Dithiothreitol, 0,4 M Tris-HCl (pH 6,7), 8% SDS, 20 µL/mL Bromphenolblau
Trenngel: 12% (15%) SDS-Polyacrylamid-Gel	3,35 mL (2,35 mL) H <sub>2</sub> O, 4,0 mL (5 mL) 30% Acrylamid, 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 50 µL 20% SDS, 50 µL Ammoniumperoxodisulfat, 10 µL Tetramethylethylen-diamin
Sammelgel: 4% SDS-Polyacrylamid-Gel	6,1 mL H <sub>2</sub> O, 1,33 mL 30% Acrylamid, 2,5 mL 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 50 µL 20% SDS, 50 µL Ammoniumperoxodisulfat, 10 µL Tetramethylethylen-diamin
SDS-Laufpuffer	192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% SDS
Transferpuffer	60 mM Tris, 48 mM Glycin, 2% SDS, 20% Ethanol
Blockierlösung	PBS, 0,05% Tween20, 5% BSA
Waschlösung	PBS, 0,05% Tween20
Urea-Lysepuffer	9 M Urea, 4% 3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure, 1% Pharmalyte, 1% Dithiothreitol, 10 µg/mL Bromphenolblau
Äquilibrierungspuffer 1	375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6 M Urea, 20% Glycerol, 2% SDS, 130 mM Dithiothreitol



Agarose	Invitrogen
Ammoniumperoxodisulfat	Merck
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Bromphenolblau	Roth
BSA	Merck
Calciumchlorid	Roth
3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure	GE Healthcare
Chloroform	Sigma-Aldrich
DEPC-Wasser	Invitrogen
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
Dithiothreitol	Roth
EDTA	Sigma-Aldrich
Essigsäure	J. T. Baker
Ethanol	J. T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Gelatine	Sigma-Aldrich
Glukose	Sigma-Aldrich
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
Harnstoff	Sigma-Aldrich
Immobiline DryStrip	GE Healthcare
Iodacetamid	GE Healthcare
Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich
Methanol	J. T. Baker
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	J. T. Baker
Natriumcitrat	Roth
Natriumdeoxycholat	Applichem

Natriumhydroxid	J. T. Baker
Natriumlactat	Sigma-Aldrich
NP-40	Applichem
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-markierte dATP und dCTP	Hartmann Analytik
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
PBS	Lonza
Pharmalyte	GE Healthcare
Phenol	Roth
Pierce Elektrochemilumineszenz Western Blot Substrat	Thermo
Polyethylenglykol 6000	Roth
<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>	Sigma-Aldrich
Salzsäure	Roth
SDS	Roth
Tetramethylethylendiamin	Amersham
Trifast	Peqlab
Tris	Sigma-Aldrich
Tween20	Sigma-Aldrich
Zufalls-Hexanukleotide	Fermentas

### 2.1.14 Geräte

Im Folgenden werden nur die zur Datenerhebung relevanten Geräte aufgeführt. Alle anderen verwendeten Geräte entsprechen der Standard-Laboraausstattung.

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
<i>7500 Fast Real-Time PCR-System</i>	Applied Biosystems
<i>Bioanalyzer 2010</i>	Agilent Technologies
<i>Cellometer Auto T4</i>	Nexcelom Bioscience
<i>DU530 Photometer</i>	Beckmann Coulter
<i>E-Box Gel Documentation System</i>	Peqlab
<i>Fujix Bio-imaging analyzer BAS-2000</i>	Fujifilm
<i>GeneChip Scanner 7G</i>	Affymetrix
<i>Gene-Pulser Xcell mit Shock-Pod</i>	Bio-Rad

*Mastercycler gradient*

Eppendorf

*Nanodrop ND 1000*

Peqlab

*Odyssey Infrared Imaging System*

Li-Cor

*OmniTissue Homogenizer*

Omni International

*PROTEAN Isoelectric focusing system*

Bio-Rad

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung von adhären wachsenden Zellen

Für *in vitro*-Versuche wurden die adhären wachsenden Zelllinien (NIH-3T3, 293T, Phoenix eco) und primären *Dhs*-MEF-Zellen in DMEM-Kulturmedium bzw. MEF-Medium unter Standardbedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Um die Zellpopulation subkonfluent zu halten, wurden die Zellen regelmäßig passagiert indem sie durch Trypsin-EDTA vom Gefäßboden abgelöst und in der gewünschten Verdünnung ausgesät wurden.

#### 2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden  $1 - 4 \times 10^6$  durch Zentrifugation (450 x g, 5 min) sedimentierte Zellen in kaltem Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen langsam auf -80 °C gekühlt und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad angetaut und in Kulturmedium aufgenommen. Durch Zentrifugation (450 x g, 5 min) wurde das DMSO-haltige Einfriermedium entfernt und die Zellen in der gewünschten Verdünnung ausgesät.

#### 2.2.1.3 Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung

Zur Bestimmung des Zelltiters wurde ein Aliquot der Zellsuspension im Verhältnis 1:2 – 1:5 mit Trypanblau gemischt und die Anzahl ungefärbter Zellen in einer Neubauer-Zählkammer (Kammerfaktor: 10<sup>4</sup>) in vier Kleinquadraten bestimmt. Dabei ließen sich die ungefärbten lebenden Zellen von den gefärbten toten Zellen unterscheiden, da Trypanblau intakte Zellmembranen nicht durchdringen kann. Aus dem Durchschnittswert der viablen Zellen wurde durch Multiplikation mit dem Kammerfaktor und der Verdünnung der Zelltiter

errechnet und über den Anteil gefärbter Zellen die Vitalität bestimmt. Alternativ erfolgte die Zellzahlbestimmung nach dem gleichen Prinzip am Zellzählgerät Cellometer Auto T4.

#### 2.2.1.4 Retrovirale Transduktion

Zur stabilen Expression von modifizierten Genen wurden entsprechende DNA-Abschnitte zunächst mithilfe von Verpackungszelllinien in retrovirale Partikel verpackt, damit Zielzellen transduziert und anschließend Zellen mit stabiler Integration der Fremd-DNA selektiert.

Für die gammaretrovirale Transduktion wurde zunächst die Vektor-DNA mittels Calciumphosphat-Transfektion in 70% konfluente Phoenix-Zellen eingebracht. Dazu wurden 20 µg Vektor-DNA mit 62,5 µL 2 M CaCl<sub>2</sub> in einem Volumen von 500 µL gemischt und 500 µL 2x HEPES-gepufferte Salzlösung tropfenweise, unter Erzeugung eines konstanten Luftstroms in der Lösung, zugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation wurde der Transfektionsansatz tropfenweise zu den Phoenix-Zellen in frischem Medium gegeben und zur Hemmung lysosomaler DNasen 2,5 µM Chloroquin zugefügt.

Nach 12 Stunden wurde das Medium gewechselt und weitere 12 Stunden später das Viruspartikel-enhaltende Medium gesammelt, gefiltert (Porendurchmesser 0,45 µm) und zusammen mit 4 µg/mL Polybren auf etwa 40% konfluente, gut wachsende Zielzellen gegeben. Nach weiteren 12 und 24 Stunden wurde die zuvor beschriebene Prozedur wiederholt und nach weiteren 12 Stunden das Medium gewechselt. 36 – 48 Stunden nach Zugabe des letzten Viruspartikel-enhaltenden Überstandes wurden die Zellen durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums (2,5 µg/mL Puromycin) für 3 – 5 Tage selektiert.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 RNA-Isolation

Zur Isolation der Gesamt-RNA wurden Zellen in Trifast resuspendiert und nach 5-minütiger Inkubation mit 1/5 Volumen Chloroform gemixt. Durch Zentrifugation (15.000 x g, 15 min, 4 °C) wurde das Homogenat in eine wässrige RNA-haltige Phase, eine DNA-haltige Interphase

und eine Protein-haltige organische Phase aufgetrennt. Durch 10-minütige Inkubation mit ½ Volumen 2-Propanol und Zentrifugation (15.000 x g, 15 min, 4 °C) wurde die RNA aus der wässrigen Phase gefällt. Nach zweimaligem Waschen mit 75% Ethanol und Lufttrocknung wurde die RNA für 10 min bei 55 °C in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Verbliebene genomische DNA wurde durch 30-minütige Inkubation mit DNase I (1 U pro µg RNA) bei 37 °C entfernt und das Enzym anschließend durch 10-minütige Inkubation bei 65 °C in Chelat-haltigem Puffer inaktiviert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

#### 2.2.2.2 Erststrang-cDNA-Synthese

Zur Umschreibung von RNA in cDNA wurden 1 µg RNA zunächst mit Zufalls-Hexanukleotiden (5 µM) 5 min bei 65 °C inkubiert um mögliche RNA-Sekundärstrukturen zu zerstören. Nach Zugabe von Reverser Transkriptase (2 U/µL), dNTP-Mix (1 mM) und Ribolock RNase-Inhibitor (1 U/µL) fand die cDNA-Synthese für 10 min bei 25 °C und 60 min bei 42 °C statt und wurde anschließend durch 10-minütiges Erhitzen auf 70 °C beendet. Zur Kontrolle der Reaktion wurde die 18S-rRNA mittels PCR amplifiziert und die Reaktionsprodukte durch elektrophoretische Auftrennung überprüft.

#### 2.2.2.3 PCR

Zur Amplifikation spezifischer gDNA oder cDNA-Abschnitte wurden 1 µL cDNA bzw. 0,1 – 1 µg gDNA in *DreamTaq Green PCR-Mastermix* (0,2 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) mit je 0,5 µM Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotiden gemischt und bei folgenden Temperaturen inkubiert:

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Zyklen-Anzahl</u>
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	} 25 – 35
Oligonukleotid-Anlagerung	50 – 60 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec	
Finale Elongation	72 °C	3 min	1

Die PCR-Produkte wurden anschließend durch gelelektrophoretische Auftrennung überprüft.

#### 2.2.2.4 Long range-PCR

Für die Amplifikation längerer DNA-Abschnitte (>6 kb) wurden 0,1 – 1 µg gDNA mit 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4% DMSO, je 0,5 µM Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotiden und 2 U Long PCR Enzyme Mix (*Long PCR Enzyme Mix*-Reagenzsystem) gemischt. Die PCR wurde nach folgendem dreistufigem Programm durchgeführt und die PCR-Produkte anschließend mittels Gelelektrophorese analysiert.

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Zyklen-Anzahl</u>
Initiale Denaturierung	94 °C	90 sec	1
Denaturierung	95 °C	15 sec	} 10
Oligonukleotid-Anlagerung	54 °C	30 sec	
Elongation	68 °C	7 min	
Denaturierung	95 °C	15 sec	} 25
Oligonukleotid-Anlagerung	54 °C	30 sec	
Elongation	68 °C	7 min + 5 sec/Zyklus	
Finale Elongation	68 °C	10 min	1

#### 2.2.2.5 Klonierungs-PCR

Für Klonierungen wurde der gewünschte DNA-Abschnitt zunächst per PCR vervielfältigt. Dazu wurden 50 ng Template-DNA mit 0,2 mM dNTPS, 0,8 µM Vorwärts- und Rückwärtsoligonukleotiden, 3% DMSO und 0,4 U Phusion DNA-Polymerase (*Phusion High-Fidelity PCR Kit*) nach folgendem Programm amplifiziert:

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Zyklen-Anzahl</u>
Initiale Denaturierung	98 °C	3 min	1
Denaturierung	98 °C	20 sec	} 30 – 35
Oligonukleotid-Anlagerung	50 – 60 °C	20 sec	
Elongation	72 °C	15 – 60 sec	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1

Anschließend wurde das PCR-Produkt gelelektrophoretisch aufgetrennt, die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die enthaltene DNA mittels *GeneJET Gel Extraction Kit* für die weitere Klonierung aufgereinigt.

### 2.2.2.6 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Um RNA-Transkripte zu quantifizieren erfolgte eine SYBR-Green-basierte Echtzeit-PCR der zuvor hergestellten cDNA (2.2.2.2) mit ROX als Referenz-Farbstoff. Dazu wurde 1:10 verdünnte cDNA mit dem *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* und je 0,5 µM Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotiden oder 1 µL Quantitect-Primermix gemischt und die qPCR nach folgendem Programm durchgeführt:

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Zyklen-Anzahl</u>
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1
Denaturierung	95 °C	15 sec	} 40
Primer-Anlagerung	60 °C	30 sec	
Schmelzkurve	60 – 95 °C		

Die Bestimmung erfolgte jeweils in Triplikaten und die Spezifität der Produkte wurde mittels Schmelzkurvenanalyse überprüft. Die relative Expression wurde nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet, wobei die Expression jeweils auf die Expression eines *Housekeeping*-Gens (18S-rRNA) normiert wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm *GraphPad Prism* nach der *Two-Way ANOVA*-Methode.

### 2.2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Molekülen wurden diese in einem elektrischen Feld nach Größe aufgetrennt. Dazu wurden die PCR-Produkte oder DNA-Restriktionsfragmente auf ein Agarosegel (1 – 2% Agarose in Tris-Acetat-EDTA-Puffer, 0,5 µg/mL Ethidiumbromid) aufgetragen und bei 80 – 100 V gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente konnten anschließend durch den Nukleinsäure-Interkalator Ethidiumbromid unter ultraviolettem Licht visualisiert und ihre Größe anhand eines DNA-Größenstandards bestimmt werden.

#### 2.2.2.8 Transformation von *E. coli* durch Hitze-Schock

Zur Vervielfältigung von Vektoren wurden kompetente Bakterien transformiert. Dazu wurden pro Transformation 50 µL chemisch-kompetente *E. coli* auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit 50 ng Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem einminütigen Hitzeschock bei 42 °C wurde der Reaktionsansatz auf Eis gekühlt und nach Zugabe von vorgewärmtem SOC-Medium für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde ein Teil der Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 2.2.2.9 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Für die effizientere Einbringung von DNA in Bakterien wurden diese elektroporiert. Dazu wurden 50 µL elektrokompetente *E. coli* auf Eis vorsichtig mit 100 – 500 ng DNA gemischt und in einer vorgekühlten Kuvette einem elektrischen Schock ausgesetzt (1,8 kV, 200 Ω, 25 µF). Nach sofortiger Zugabe von SOC-Medium wurde die Bakteriensuspension für 1 h bei 37 °C geschüttelt, anschließend auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 2.2.2.10 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden Einzelkolonien von einer LB-Agar-Platte isoliert und in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Aus 2 – 4 mL bzw. 250 mL einer Übernachtskultur wurde die Plasmid-DNA mithilfe des *GeneJET Plasmid Miniprep Kits* bzw. des *PureYield Plasmid Maxiprep Systems* nach Herstellerangaben isoliert und die DNA-Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt.

#### 2.2.2.11 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA wurde die DNA-haltige Lösung mit Phenol/Chloroform (1:1) gemischt und die wässrige Phase durch Zentrifugation (20.000 x g, 1 min) abgetrennt.

Die enthaltene DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 7,8) und 3 Volumen Ethanol bei -80 °C präzipitiert und durch Zentrifugation (20.000 x g, 5 min) pelletiert. Nach Waschen mit 70% Ethanol wurde das Pellet luftgetrocknet und im gewünschten Puffer gelöst.

#### 2.2.2.12 Restriktionsanalyse

Zur Überprüfung oder Klonierung von Plasmid-DNA wurde diese mit geeigneten Restriktionsendonukleasen inkubiert. Dazu wurden 1 µg Plasmid-DNA mit je 1 µL der gewünschten Restriktionsendonukleasen, geeignetem Puffer und ggf. BSA gemischt und 30 – 90 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die erhaltenen DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Größe der erhaltenen Fragmente analysiert.

#### 2.2.2.13 Klonierung von Plasmiden

Um einen DNA-Abschnitt in einen gewünschten Vektor einzubringen, wurde das zuvor mittels PCR amplifizierte und aufgereinigte DNA-Fragment sowie das Zielplasmid mit den gewünschten Restriktionsenzymen behandelt (2.2.2.12) und aufgereinigt. Zur Ligation wurden 0,025 pmol Vektor mit 0,075 pmol DNA-Fragment und 1 U T4-DNA-Ligase im entsprechenden Puffer gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 5 µL des Reaktionsansatzes zur Transformation von *E. coli* (2.2.2.8) verwendet, die Plasmid-DNA anschließend aufgereinigt und die Klonierung mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

### 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.2.3.1 Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung

Zur Herstellung eines Gesamtzell-Extraktes wurden die Zellen durch Zentrifugation (450 x g, 5 min) sedimentiert, mit PBS gewaschen und im 7-fachen Volumen Western Blot-Lysepuffer

resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei 4 °C wurde das Lysat durch Zentrifugation (15.000 x g, 15 min, 4 °C) geklärt und der Überstand bei -80 °C gelagert.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden je 2 µL Proteinlysate mit einer 20% Bradford-Lösung gemischt und die Extinktion bei 595 nm gemessen. Anhand einer BSA-Eichreihe (0 – 10 µg BSA) konnte die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt werden.

#### 2.2.3.2 Western Blot

Für die Analyse der Proteinexpression wurde das zuvor hergestellte Proteinlysate elektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschten Proteine über spezifische Antikörper detektiert.

Dazu wurden zur elektrophoretischen Auftrennung 5 – 30 µg Protein mit 4x Ladebuffer gemischt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (12% bzw. 15% mit 4% Sammelgel) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 – 120 V in SDS-Laufpuffer. Anschließend wurden die Proteine mittels halbtrockenem Elektroblootting (1,2 mA pro cm<sup>2</sup> für 1 h) mit Transferpuffer auf eine zuvor durch Methanol aktivierte Polyvinylidendifluorid-Membran transferiert und diese danach zur Absättigung unspezifischer Bindungen für 1 h in Blockierlösung inkubiert.

Zur Detektion des gewünschten Proteins wurde die Membran entweder über Nacht bei 4 °C oder 1 h bei Raumtemperatur mit dem in Blockierlösung verdünnten Primär-Antikörper unter leichtem Schwenken inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit Waschlösung für 5 min wurde nicht gebundener Antikörper entfernt und die Membran dann für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert. Die gebildeten Immunkomplexe wurden nach erneutem dreimaligen Waschen über Peroxidase-vermittelte Chemilumineszenz durch Zugabe eines Chemilumineszenz-Substrates und Exposition eines Röntgenfilms oder mithilfe von Fluorophor-markierten Sekundärantikörpern mittels Infrarot-Scanner detektiert und quantifiziert.

### 2.2.3.3 Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung für 2D-Western Blot

Für einen 2D-Western Blot wurden die pelletierten Zellen in Urea-Lysepuffer resuspendiert, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und das Lysat durch Zentrifugation (15.000 x g, 15 min) geklärt.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Aliquot des Proteinlysats mit 10 mM HCl versetzt und nach Mischung mit einer 20%igen Bradford-Lösung die Extinktion bei 595 nm gemessen. Anhand einer BSA-Eichreihe (0 – 10 µg BSA) konnte die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt werden.

### 2.2.3.4 2D-Western-Blot

Um verschiedene Modifikationsformen eines Proteins unterscheiden zu können, wurde das zuvor hergestellte Proteinlysate zunächst dem isoelektrischen Punkt nach (1. Dimension) und anschließend der Größe nach (2. Dimension) aufgetrennt.

Für die isoelektrische Fokussierung wurden 7 cm lange Streifen mit einem linearen pH-Gradienten (pH 4 – 7) verwendet. Die Streifen wurden über Nacht passiv mit 25 – 50 µg Protein in 120 µL Urea-Puffer rehydratisiert und die Proteine anschließend entsprechend ihres isoelektrischen Punktes entlang des pH-Gradienten im Streifen aufgetrennt (20°C, maximale Spannung: 50 µA pro Streifen; Programm: 30 min bei 500 V, 5000 V linear bis 5000 Vh, 5000 V schnell bis 5000 Vh).

Die Streifen wurden nacheinander für je 15 min in Äquilibriumspuffer 1 und 2 äquilibriert, auf ein 15% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgebracht und mit 0,5% Agarose versiegelt. Die weiteren Schritte (elektrophoretische Auftrennung, Transfer auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran, Detektion des gewünschten Proteins) erfolgten wie für den Western Blot (2.2.3.2) beschrieben.

## 2.2.4 RIP-Chip

### 2.2.4.1 Ribonukleoprotein-Immunopräzipitation (RIP)

*Die Bioanalyser-Messung wurde in der Microarray-Core Facility am Institut für Klinische Chemie des UKEs unter Leitung von Dr. Thomas Streichert angefertigt.*

Um an ein spezifisches Protein gebundene RNAs zu isolieren, wurden mittels Ribonukleoprotein-Immunopräzipitation (RIP) zunächst die Protein-RNA-Komplexe aus den Zellen aufgereinigt und anschließend die RNA daraus isoliert.

Dazu wurden HA-markierte Proteine in NIH-3T3-Zellen exprimiert (2.2.1.4).  $3,5 \times 10^6$  am Vortag in einer 100 mm-Schale ausgesäte Zellen wurden in vorgekühltem frisch angesetzttem RIP-Lysepuffer für 15 min homogenisiert. Nach Klärung des Lysates durch Zentrifugation ( $20.000 \times g$ , 15 min,  $4^\circ\text{C}$ ) wurde der Überstand für 30 min mit 50  $\mu\text{L}$  Anti-HA-Antikörperkonjugierten Mikroträgern inkubiert. Anschließend wurden die gebildeten Komplexe aus Anti-HA-Mikroträgern, HA-markierten Proteinen und ggf. gebundenen RNAs auf einer Säule im magnetischen Feld zurückgehalten, je dreimal mit RIP-Basispuffer, RIP-Waschpuffer und RIP-Basispuffer gewaschen und dann in Proteinase K-haltigem RIP-Elutionspuffer durch Entfernung des magnetischen Feldes eluiert. Durch 35-minütige Inkubation bei  $50^\circ\text{C}$  wurden die enthaltenen Proteine abgebaut und die Mikroträger durch Durchlaufen einer Säule im magnetischen Feld entfernt. Die RNA-enhaltende Fraktion wurde mit DEPC-behandeltem Wasser eluiert und mit dem *NucleoSpin RNA XS Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt und konzentriert. Konzentration und Reinheit der RNA wurden am Nanodrop bestimmt und die Integrität der RNA mittels Bioanalyser-Messung überprüft.

### 2.2.4.2 Microarray-basierte Analyse (Chip)

*Die Microarray-Analyse wurde in der Microarray-Core Facility am Institut für Klinische Chemie des UKEs unter Leitung von Herrn Dr. Thomas Streichert angefertigt, die RNA-Sequenzmotiv-Suche wurde von Herrn Dr. Hubert Rehrauer an der Universität Zürich durchgeführt.*

Um die zuvor durch RIP gewonnene RNA zu identifizieren und zu quantifizieren wurde eine *Microarray*-basierte Analyse durchgeführt.

Dazu wurden pro Ansatz je 100 ng RNA eingesetzt. Die cDNA-Synthese und Markierung erfolgten nach Herstellerangaben mit dem *Affymetrix 3'-IVT Express Kit*. Für die Hybridisierung wurden *Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 GeneChips* verwendet und die am *Affymetrix GeneChip Scanner 7G* erhaltenen Signale mit der *Affymetrix GeneChip Operating Software 1.4* und einem Zielwert von 300 prozessiert. Für die Normalisierung und Hintergrundkorrektur wurde die *Expression Console 1.1 Software*, für statistische Tests die *TIGR MeV 4.8.1 Software* verwendet.

Die weitere Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Software Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>), Expander<sup>104</sup> (Version 6.0), DAVID<sup>105,106</sup> (Version 6.7), FuncAssociate (Version 2.0)<sup>107</sup> und GeneGo von Thomson Reuters unter Zuhilfenahme des ID-Mappers der UniProt-Datenbank<sup>108</sup> und einer Datenbank für Protein-Sequenzmuster ([http://scansite.mit.edu/dbsequence\\_one.html](http://scansite.mit.edu/dbsequence_one.html)) sowie des *Heatmap*-Programms Matrix2png Interface (<http://www.chibi.ubc.ca/matrix2png/bin/matrix2png.cgi>). RNA-Sequenzmotive wurden mit den Algorithmen DRIM<sup>109</sup> und FIRE<sup>110</sup> gesucht.

## 2.2.5 Rekombinations-basiertes Klonieren

### 2.2.5.1 Red/ET-basierte Rekombination

Um von Restriktionsschnittstellen unabhängig einen *Targeting Vector* zur Generierung einer konditionalen *Knockout*-Mauslinie zu klonieren, wurde die auf homologer Rekombination beruhende Red/ET-basierte Rekombination eingesetzt.

Dafür wurden zunächst Rekombinations-kompetente Bakterien hergestellt, indem das die Rekombinationsproteine vom Bakteriophagen  $\lambda$  kodierende Plasmid pKD46 per Hitzeschock-Transformation (2.2.2.8) in *E. coli* eingebracht wurde. Die Expression der Rekombinationsproteine wurde bei einer optischen Dichte von 0,1 – 0,2 durch Zugabe von 0,3 – 0,4% L-Arabinose für 2 – 4 h bei 30 °C induziert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 10 min auf Eis inkubiert, durch Zentrifugation (2.000 x g, 15 min, 4 °C) pelletiert und in eiskaltem 10% Glycerol resuspendiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und die nun kompetenten Bakterien bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Für die Rekombination wurde der einzubauende DNA-Abschnitt mittels Klonierungs-PCR amplifiziert (2.2.2.5). Dabei wurden Oligonukleotide mit etwa 80 bp langen Überhängen, die 100% Homologie zum Vektor aufweisen, verwendet. Das PCR-Produkt wurde mit dem *GeneJET PCR Purification Kit* aufgereinigt, die methylierte parentale DNA durch einen Restriktionsverdau mit DpnI abgebaut (2.2.2.12) und das PCR-Produkt erneut aufgereinigt.

PCR-Produkt und Vektor wurden dann durch Elektroporation in die zuvor generierten Rekombinations-kompetenten Bakterien eingebracht (2.2.2.9) und die Bakterien in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika kultiviert. Anschließend wurden Klone isoliert und mittels Restriktionsanalyse (2.2.2.12) auf die erwünschte homologe Rekombination überprüft.

#### 2.2.5.2 Cre-basierte Rekombination

Um nach erfolgreicher Selektion nicht mehr benötigte loxP-flankierte-Resistenzkassetten zu entfernen, wurden diese durch die Cre-Rekombinase deletiert.

Dazu wurden die Vektor-haltigen Bakterien zunächst durch dreimalige Zentrifugation (13.000 x g, 1 min, 4 °C) und Resuspension in eiskaltem 10% Glycerol elektrokompent gemacht und dann das Cre-Rekombinase-kodierende Expressionsplasmid durch Elektroporation eingebracht (2.2.2.9). Die erhaltenen Bakterienklone wurden bei 30 °C in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika kultiviert, dann wurde die Expression der Cre-Rekombinase durch 12-stündige Inkubation bei 37 °C induziert und die Klone anschließend per Restriktionsanalyse auf die gewünschte Rekombination überprüft.

#### 2.2.5.3 Gateway-Rekombination

Zum Restriktionsschnittstellen-unabhängigen Umklonieren von DNA-Abschnitten wurde die Rekombinations-basierte *Gateway*-Technologie von Invitrogen verwendet.

Dazu wurden ein Zielvektor mit attR-flankiertem sogenanntem Selbstmordgen (*ccdB*) und ein Eingangsklon mit attL-flankiertem Genabschnitt benötigt. Nach Linearisierung des Zielvektors wurden je 150 ng DNA des Zielvektors und des Eingangsklons mit 2 µL *Gateway LR Clonase II Enzymmix* gemischt und 2 h bei 25 °C inkubiert um das Selbstmordgen im Zielvektor gegen den flankierten Genabschnitt auszutauschen. Die Reaktion wurde durch 10-minütige

Inkubation mit 0,2 µg/µL Proteinase K bei 37 °C gestoppt, 2 µL des Reaktionsansatzes in Bakterien transformiert (2.2.2.8) und die Bakterien in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika kultiviert. Anschließend wurden Klone isoliert und mittels Restriktionsanalyse auf den gewünschten DNA-Austausch untersucht.

#### 2.2.5.4 Separation rekombinierter Plasmide

Da die gewünschte Rekombination nicht zwangsläufig in allen Plasmiden eines Klons stattgefunden hat und somit in einem Klon eine Mischung aus rekombinierten und nicht-rekombinierten Plasmiden vorliegen konnte, mussten die Plasmide nach der Rekombination separiert werden.

Dazu wurde die Plasmid-DNA mithilfe einer Restriktionsendonuklease linearisiert und nach Aufreinigung 300 ng DNA mit 1 U T4-DNA-Ligase ligiert (2.2.2.13). Die religierten Plasmide wurden dann durch Hitzeschock-Transformation in *E. coli* eingebracht und die erhaltenen Klone wiederum per Restriktionsanalyse überprüft.

### 2.2.6 Herstellung von konditionalen *Knockout*-Mauslinien

*Alle in diesem Kapitel beschriebenen Arbeitsschritte wurden von oder zusammen mit der Servicegruppe Transgene Tiere am Zentrum für Molekulare Neurobiologie des UKEs unter Leitung von Frau PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer durchgeführt.*

#### 2.2.6.1 Zellkultur von murinen embryonalen Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurden auf gelatinisierten, mit Mitose-inaktivierten Neomycin-resistenten MEFs beschichteten Zellkulturschalen unter Standardbedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub> (JM8A3.N1) bzw. 7,5% CO<sub>2</sub> (IDG3.2), 95% Luftfeuchtigkeit) kultiviert.

MEFs wurden alle 3 Tage 1:3 – 1:4 passagiert und expandiert. Vor der Verwendung als *Feeder*-Zellen wurden die MEFs durch 2 – 3 stündige Inkubation mit Mitomycin C (10 µg/mL) mitotisch inaktiviert und in einer Dichte von 5×10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> auf mit 0,1% Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen ausgesät.

Die ES-Zellen wurden nach dem Auftauen in den vorbereiteten Zellkulturschalen ausgesät. Das Medium wurde täglich gewechselt und die Zellen alle zwei Tage 1:4 – 1:6 passagiert.

#### 2.2.6.2 Elektroporation embryonaler Stammzellen

Um ES-Zellen zu modifizieren, wurde der linearisierte *Targeting Vector* mittels Elektroporation in ES-Zellen eingebracht, so dass eine homologe Rekombination zwischen dem Wildtyp- und dem modifizierten Allel stattfinden konnte.

Dazu wurden etwa  $1 \times 10^7$  ES-Zellen zwei Stunden nach dem täglichen Mediumwechsel trypsinisiert, in PBS gewaschen und in 800  $\mu$ L PBS resuspendiert. Die Zellen wurden zusammen mit 30  $\mu$ g linearisiertem *Targeting Vector* in eine Elektroporationsküvette (4 mm) überführt, elektroporiert (250 V, 500  $\mu$ F) und nach 10 min in gelatinierten *Feeder*-haltigen Zellkulturschalen ausgesät. Nach 24 h wurde die Selektion durch Zugabe von 200  $\mu$ g/mL G418 gestartet und bei dem täglichen Mediumwechsel über acht Tage fortgesetzt. Nach einer Woche wurden Kolonien mit runder, scharf begrenzter Morphologie isoliert, durch Trypsinierung in eine Einzelzell-Suspension überführt und in gelatinierten mit Feeder-Zellen beschichteten 96 *Well*-Platten ausgesät. Nach zwei Tagen wurden die Klone durch 1:4-Passagierung expandiert und nach weiteren zwei Tagen die eine Hälfte der ES-Zell-Platten für die spätere Injektion in Embryonen eingefroren und die andere Hälfte zur Isolierung von genomischer DNA für den Southern Blot eingesetzt.

#### 2.2.6.3 Southern Blot

Um ES-Zellen mit erfolgreicher homologer Rekombination zu identifizieren, wurden die zuvor gewonnen ES-Zellklone mittels Southern Blot überprüft.

Zur Gewinnung der genomischen DNA der ES-Zellen wurden diese durch 12-stündige Inkubation mit ES-Zell-Lysepuffer in einer feuchten Kammer bei 55 °C lysiert und die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid und 1 Volumen 2-Propanol über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation (3.000 x g, 30 min) wurde das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, bei 55 °C getrocknet und über Nacht in 100  $\mu$ L TE-Puffer (0,1 mM EDTA) gelöst.

Zur Generierung der Sonde für den Southern Blot wurde der entsprechende DNA-Abschnitt vom BAC mittels PCR amplifiziert und in den pJET1.2-Vektor kloniert. Durch Inkubation mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen wurde die Sonde isoliert, aufgereinigt und mit dem *Megaprime DNA Labelling System* nach Herstellerangaben radioaktiv markiert.

8 – 10 µg der ES-Zell-DNA wurden mit 20 U Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 50 µL für etwa 18 h bei 37 °C verdaut und anschließend auf einem 0,8% Agarose-Gel der Größe nach aufgetrennt. Das Gel wurde für 10 min in 0,25 M HCl inkubiert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und für 15 min in 0,4 M Natriumhydroxid inkubiert um die DNA in Einzelstränge aufzutrennen. Über Nacht wurde die DNA in 0,4 M Natriumhydroxid über Kapillarkräfte aus dem Gel auf eine Nylon-Membran transferiert. Die Membran wurde für 5 min mit 2x SSC neutralisiert, die DNA durch 2-stündiges Backen bei 80 °C auf der Membran fixiert und die Membran in einer Hybridisierungsflasche mindestens 1 h mit vorgewärmten Herings-Sperma-DNA-haltigem Hybridisierungspuffer bei 65 °C inkubiert. Die radioaktiv-markierte Sonde wurde zur Auftrennung in einzelsträngige DNA für 5 min gekocht, in Herings-Sperma-DNA-haltigem Hybridisierungspuffer auf 2,5 – 5 × 10<sup>5</sup> cpm/mL verdünnt und über Nacht mit der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit vorgewärmtem Waschpuffer A und B jeweils so lange gewaschen bis im Waschpuffer keine Radioaktivität mehr nachgewiesen werden konnte. Die Hybridisierungssignale auf der Membran wurden nach mehrstündiger bis mehrtägiger Exposition mithilfe eines Phospho-Imagers gemessen.

#### 2.2.6.4 Injektion von embryonalen Stammzellen in Embryonen

Um chimäre Mäuse mit dem, über den *Targeting Vector* eingeführten, veränderten Allel zu erhalten, wurden die zuvor modifizierten ES-Zellen in Embryonen injiziert.

Zur Gewinnung der 8-zelligen Embryonen wurden trächtige C57BL/6-Weibchen an Tag 2,5 p. c. getötet und das Ovidukt präpariert. Die Embryonen wurden mit KSOM-HEPES-Medium herausgespült und unter Öl in Mediumtropfen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> aufbewahrt.

Die modifizierten ES-Zellen wurden zwei Stunden nach dem täglichen Mediumwechsel leicht trypsiniert um 2 – 10-Zell-Aggregate zu erhalten, zentrifugiert und nach Resuspendieren in ES-Zell-Medium auf Eis aufbewahrt. Etwa sieben ES-Zellen wurden in eine Injektionskapillare

aufgezogen und in die mittels Haltekapillare fixierten Embryonen mit Hilfe eines Piezopulses injiziert. Die injizierten Embryonen wurden über Nacht inkubiert.

#### 2.2.6.5 Transfer der injizierten Blastozysten in scheinchwangere Ammen

Für die weitere Entwicklung der Embryonen wurden solche, die sich zu Blastozysten entwickelt hatten, in scheinchwangere Ammen implantiert.

Dafür wurden zwei Tage zuvor mit sterilen Böcken verpaarte Weibchen narkotisiert, der Uterus durch einen seitlichen Schnitt aus der Bauchhöhle gezogen und fixiert. Nach Injektion von bis zu sieben chimären Blastozysten pro Uterushorn wurde der Uterus wieder in seine ursprüngliche Position gebracht und die Wunde vernäht.

### 2.2.7 Tierexperimentelle Arbeiten

#### 2.2.7.1 Mäusehaltung und -zucht

*Alle Mausarbeiten innerhalb der Barriere wurden von den Tierpflegern der Versuchstierhaltung des UKEs übernommen, insbesondere von Frau Sabrina Noster.*

Die in dieser Arbeit generierten Mauslinien wurden in der Versuchstierhaltung des UKEs in spezifiziert Pathogen-freier Umgebung bei 21 °C Raumtemperatur und 50% Luftfeuchtigkeit gehalten. Schwanzspitzenbiopsien wurden etwa 1 Woche nach Geburt entnommen und Jungtiere im Alter von 3 Wochen abgesetzt. Verpaarungen erfolgten ab einem Alter von 6 Wochen (Böcke) bzw. 8 Wochen (Weibchen).

Sämtliche Arbeiten mit Mäusen wurden gemäß dem Tierschutzgesetz durchgeführt. Für die Tierversuche lag eine Genehmigung der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz Hamburg vor (Aktenzeichen 71/07, 38/10 und 60/12).

#### 2.2.7.2 Genotypisierung

Zur Genotypisierung des Nachwuchses wurde den Jungtieren eine Schwanzspitzenbiopsie entnommen. Diese wurde für 6 – 12 h bei 55 °C in Proteinase K-Lysepuffer lysiert und das

Enzym anschließend durch 10-minütige Inkubation bei 95 °C inaktiviert. Der Genotyp wurde mittels PCR-Analyse (2.2.2.3) mit Allel-spezifischen Oligonukleotiden oder über die Größe des PCR-Produktes bestimmt.

#### 2.2.7.3 Isolation und Kultivierung von murinen embryonalen Fibroblasten

Um *in vitro*-Experimente mit Mauszellen durchführen zu können, wurden murine embryonale Fibroblasten aus E14,5-Embryonen isoliert.

Dazu wurden 8 – 12 Wochen alte Weibchen terminiert verpaart und an Tag 14,5 p. c. getötet. Nach Eröffnung des Peritoneums wurde der Uterus entnommen und die Embryonen steril präpariert. Nach Entfernung des Kopfes und der roten blutbildenden Organe wurde der restliche Embryo mithilfe eines Skalpell zerkleinert und 10 min in Trypsin-EDTA bei 37 °C inkubiert. Durch Auf- und Abpipettieren wurde die Suspension homogenisiert, die Zellen durch Zentrifugation (450 x g, 5 min) sedimentiert und in einer Dichte von 8 – 10 x 10<sup>6</sup> Zellen pro 10 cm-Schale in MEF-Kulturmedium ausgesät. Nach 12 h wurden nicht abgesetzte Zellen entfernt und zur Genotypisierung verwendet. Die MEFs wurden subkonfluent gehalten und alle zwei bis drei Tage in einer Dichte von 1 x 10<sup>6</sup> Zellen pro 10 cm-Schale ausgesät.

#### 2.2.7.4 Induktion des *Knockouts*

Zur Induktion des konditionalen *Knockouts* wurden die Mäuse zwei Wochen mit Tamoxifen-haltigem Mausfutter (400 mg/kg Futter) gefüttert. Während und nach der Behandlung wurden die Tiere engmaschig untersucht, wöchentlich gewogen und der Versuch bei Erreichen eines schlechten Gesundheitszustands (Beurteilung mithilfe einer *Scoring*-Tabelle) beendet.

#### 2.2.7.5 Kardiale Perfusion und Aufbereitung der Organe

*Die Kardiale Perfusion wurde von Frau Dr. Michaela Schweizer durchgeführt.*

Um histologische und molekularbiologische Auswirkungen des *Knockouts* auf die Mausorgane zu untersuchen, wurde eine kardiale Perfusion der Mäuse vorgenommen.

Dazu wurde nach Narkotisierung der Mäuse durch intraperitoneale Injektion von 1 µL Ketamin/Xylazin pro Gramm Körpergewicht und Eröffnung des Bauchraumes, Zwerchfell- und Brustkorb-Durchschnitt, eine Kanüle in den linken Herzventrikel eingeführt und der rechte Vorhof angeschnitten. Der Blutkreislauf wurde mit PBS gespült und die Maus ggf. mit 50 mL Fixativ (4% PFA in PBS) fixiert.

Fixierte Organe wurden für histologische Analysen für 24 h in Fixativ, dann in PBS gelagert. Gespülte Organe wurden schockgefroren und mit einem Skalpell zerkleinert. Für qPCR-Analysen wurden 50 – 100 mg Organ in 1 mL Trifast homogenisiert und die RNA isoliert (2.2.2.1). Für Western-Blot-Analysen wurden die Organe in der 10-fachen Menge Western Blot-Lysepuffer homogenisiert und die Proteine extrahiert (2.2.3.1). Für Untersuchungen der genomischen DNA wurde diese mithilfe des *QIAamp DNA Blood Mini Kits* aufgereinigt.

#### 2.2.7.6 Histologische Analyse von Mausorganen

*Die histologischen Färbungen der Organe wurden in der Mauspathologie-Facility am Institut für Neuropathologie des UKEs unter Leitung von Frau Dr. Melanie Neumann angefertigt.*

Zur Analyse der Mausgewebe wurden die fixierten Organe entwässert, in Paraffin eingebettet und mit dem Rotationsmikrotom Schnitte angefertigt. Zur Übersicht wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefertigt<sup>111</sup>. Eisenablagerungen wurden mit einer Turnbull-Färbung nachgewiesen<sup>112</sup>.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Herstellung einer konditionalen *Dhs-Knockout-Mauslinie*

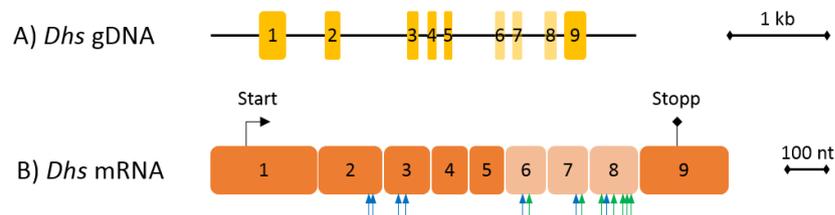
Um die Rolle der Hypusin-Modifikation und ihre Inhibition im Säugermodell besser zu verstehen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine konditionale *Knockout-Mauslinie* für das *Dhs*-Gen generiert und analysiert. Solche *Knockout-Mausmodelle* erlauben die kontrollierte Ausschaltung eines Proteins, indem Teile des betreffenden Gens gänzlich aus dem Mausgenom entfernt werden. Konditionale *Knockout-Strategien* umgehen gegebenenfalls auftretende embryonale Letalität und ermöglichen die Untersuchung von gewebs- oder entwicklungspezifischen Funktionen im Säugerorganismus.

Die Herstellung einer konditionalen *Knockout-Mauslinie* umfasste die Klonierung eines *Targeting Vectors*, mit dem die gewünschte Modifikation ins Genom embryonaler Stammzellen eingebracht wurde, die Generierung chimärer Mäuse mit Keimbahntransmission des veränderten Allels, sowie die Verpaarung mit entsprechenden *Deleter-Mäusen* zur Erzeugung des *Knockouts*.

#### 3.1.1 *Knockout-Strategie*

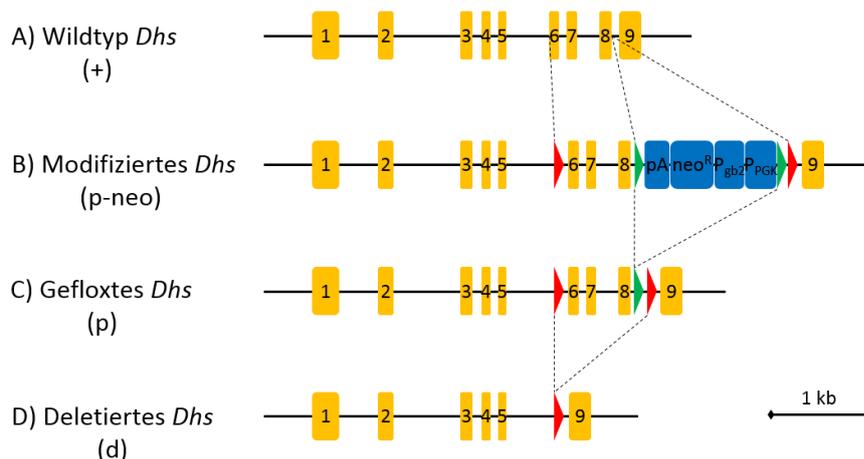
Um einen *Knockout* des *Dhs*-Gens zu erreichen, musste das Wildtyp-Allel so verändert werden, dass kein funktionelles DHS-Enzym mehr gebildet werden konnte. Da bei der konditionalen Strategie die Deletionsgröße beschränkt ist, mussten kritische Gen-Abschnitte für den KO ausgewählt werden. Dabei boten sich das aktive Zentrum oder Bindungsstellen-kodierende Bereiche an. Für die DHS-vermittelte Reaktion vom Lysin-haltigen eIF-5A-Vorläufer zum Deoxyhypusin-haltigen eIF-5A-Intermediat werden Spermidin als Substrat und NAD als Kofaktor benötigt<sup>113</sup>. Mit einem KO der Exons 6, 7 und 8 des *Dhs*-Gens wurden Bereiche deletiert, die für viele für die Spermidin- und die NAD-Bindung wichtige Aminosäuren

kodieren<sup>22</sup>, so dass von einem vollständigen Funktionsverlust des verkürzten DHS-Enzyms ausgegangen werden konnte (Abbildung 3-1). Des Weiteren musste das Exon 9 unverändert bleiben, da es partiell auch Bestandteil eines anderen Gens (*Wdr83*) ist.



**Abbildung 3-1: *Dhs*-Gen und -mRNA mit Markierung der für den *Knockout* ausgewählten Exons.** A) Von dem 9 Exons umfassenden *Dhs*-Gen wurden die Exons 6, 7 und 8 (heller dargestellt) für den *Knockout* vorgesehen. B) Das Start-Codon befindet sich im ersten Exon, das Stopp-Codon im letzten Exon. Für die Bindung von Spermidin wichtige Aminosäuren (Asp<sup>243</sup>, His<sup>288</sup>, Tyr<sup>305</sup>, Asp<sup>316</sup>, Glu<sup>323</sup>, Trp<sup>327</sup>, Lys<sup>329</sup>) werden von Exon 6, 7, und 8 kodiert (grüne Pfeile). Für die Bindung von NAD wichtige Aminosäuren (Ser<sup>105</sup>, Asn<sup>106</sup>, Ser<sup>109</sup>, Thr<sup>131</sup>, Glu<sup>137</sup>, Asp<sup>238</sup>, Gly<sup>283</sup>, Thr<sup>308</sup>, Ala<sup>309</sup>) werden von Exon 2, 3, 6, 7 und 8 kodiert (blaue Pfeile). Bei einem *Knockout* der Exons 6 bis 8 wäre also von einem vollständigen Funktionsverlust des entsprechend verkürzten DHS-Enzyms auszugehen.

Um den konditionalen *Knockout* der kritischen Exons zu erzielen, sollten diese von loxP-Elementen flankiert werden. Außerdem war eine Neomycin-Resistenz für die Selektion der modifizierten ES-Zellen notwendig. Nach erfolgreicher Selektion kann die dafür von FRT-Elementen flankierte Resistenzkassette durch die Flp-Rekombinase entfernt werden. Der *Knockout* wird dann durch die Cre-Rekombinase erzielt, die den von loxP-Elementen flankierten Gen-Abschnitt entfernt (Abbildung 3-2).



**Abbildung 3-2: *Knockout*-Strategie für das *Dhs*-Gen.** Für den *Knockout* des *Dhs*-Gens (A) sollten die Exons 6 bis 8 von loxP-Elementen (rote Dreiecke) flankiert und eine von FRT-Elementen (grüne Dreiecke) flankierte Neomycin-Resistenzkassette (blau) eingebracht werden (B). Über Flp-basierte Rekombination würde das gefloxtete Allel (C) erhalten, das durch Cre-basierte Rekombination in das deletierte Allel (D) überführt werden kann. Die eingefügten Elemente sind zur besseren Erkennbarkeit vergrößert bzw. angepasst dargestellt. pA: Polyadenylierungssignal, neo<sup>R</sup>: Neomycin-Resistenzgen, P<sub>gb2</sub>: prokaryotischer Promotor, P<sub>PGK</sub>: eukaryotischer Promotor.

Nach dem durch die Cre-Rekombinase erzielten *Knockout* der Exons 6 bis 8 würden die Exons 1 bis 5 und 9 intakt bleiben. Da das Leseraster nicht gestört wird, könnte eine verkürzte *Dhs*-mRNA gebildet werden (997 nt statt 1333 nt), die theoretisch zur Expression eines verkürzten DHS-Proteins (257 AS statt 369 AS) führt. Auch falls dieses mutierte Enzym nicht schon bei der Protein-Qualitätskontrolle abgebaut werden sollte, wäre von einem vollständigen Funktionsverlust der DHS im Hinblick auf die Hypusin-Modifikation auszugehen (siehe oben).

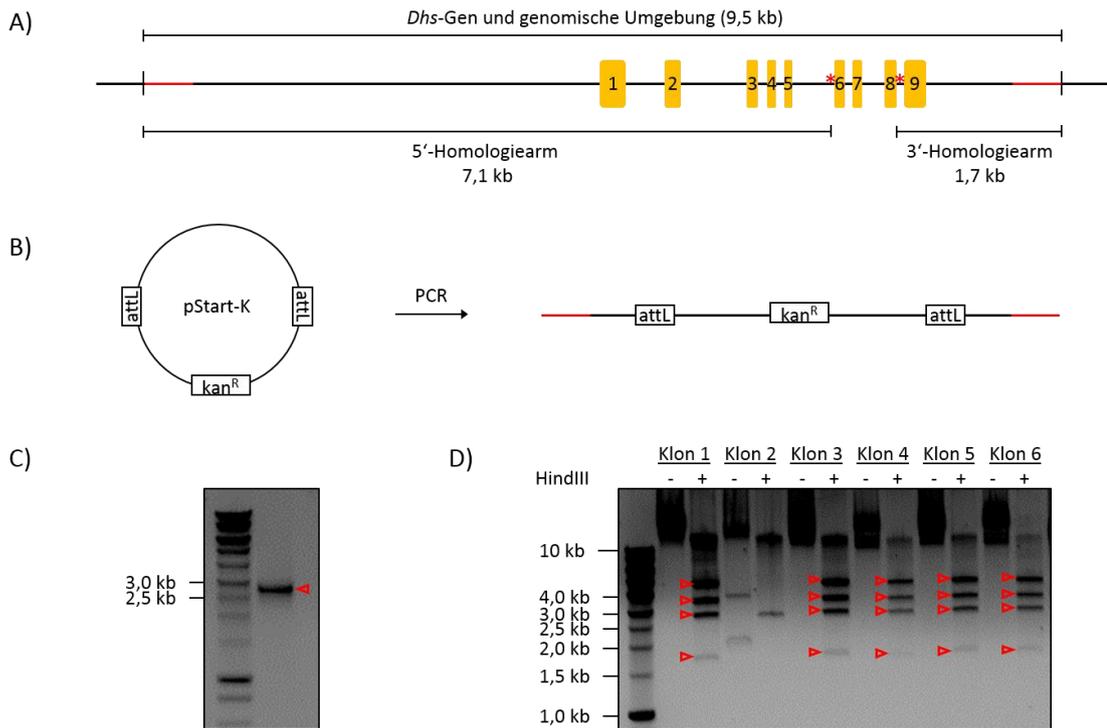
### 3.1.2 Generierung eines *Targeting Vectors*

Für die Einführung der beschriebenen Modifikationen in das *Dhs*-Gen wurde ein sogenannter *Targeting Vector* benötigt, der die modifizierte Genstruktur sowie Homologiearme enthielt, über die in den ES-Zellen durch homologe Rekombination ein Austausch gegen das Wildtyp-Allel erfolgen konnte.

Um bei der Herstellung dieses *Targeting Vectors* vom Vorhandensein geeigneter Restriktionsschnittstellen unabhängig zu sein, und um PCR-bedingte Mutationen zu vermeiden, wurde dazu die Methode des Rekombinations-basierten Klonierens (siehe 2.2.5) verwendet.

#### 3.1.2.1 Subklonierung des *Dhs*-Gens

Für die Klonierung des *Targeting Vectors* musste zunächst der Homologiebereich ausgewählt werden. Dazu wurde die Umgebung des *Dhs*-Gens mit dem *RepeatMasker* ([www.repeatmasker.org](http://www.repeatmasker.org)) auf repetitive DNA-Elemente untersucht und entsprechende Bereiche ausgeschlossen. Der insgesamt 9,5 kb lange Bereich von 4,7 kb stromaufwärts bis 1,4 kb stromabwärts des *Dhs*-Gens wurde ausgewählt, so dass sich asymmetrische Homologiearme von 7,1 kb und 1,7 kb ergaben (Abbildung 3-3 A).

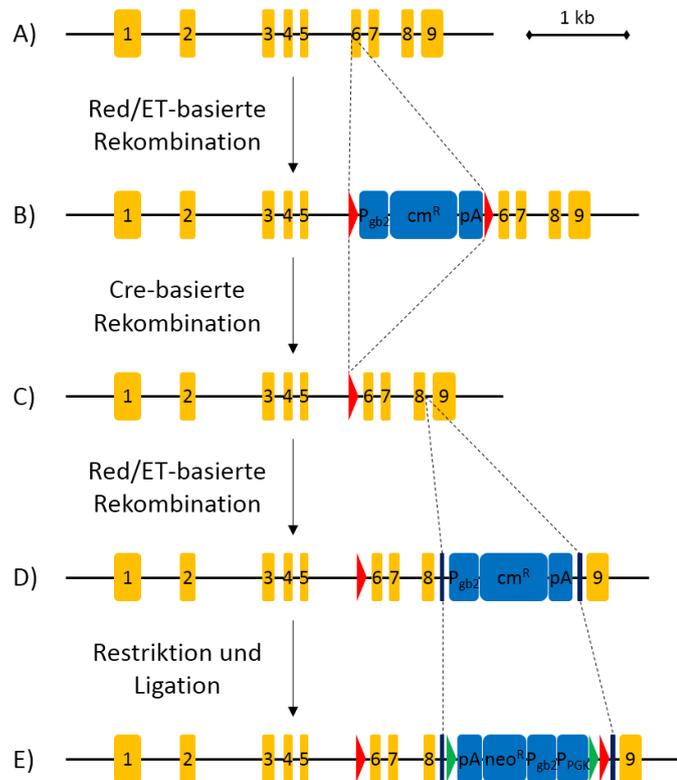


**Abbildung 3-3: Subklonierung des *Dhs*-Gens und seiner genomischen Umgebung in den Minimalvektor pStart-K.** A) Um das *Dhs*-Gen zu modifizieren, wurde es zusammen mit seiner genomischen Umgebung in den Minimalvektor (B) eingebracht. An den markierten Stellen (rote Sterne) sollten später Erkennungselemente für Sequenz-spezifische Rekombinasen bzw. Resistenzkassetten eingeführt werden, wobei asymmetrische Homologiearme von 7,1 kb und 1,7 kb entstanden. B) Um das *Dhs*-Gen über Red/ET-basierte Rekombination in den Minimalvektor pStart-K einzubringen, wurde der Vektor per PCR amplifiziert und dabei zu den Homologiearm-Enden homologe Bereiche (rot) inseriert. C) Überprüfung des 2,8 kb großen Minimalvektor-PCR-Produktes im 1% Agarosegel. D) Restriktionsanalyse der bei der Red/ET-Rekombination erhaltenen Klone 1 bis 6 mit HindIII. Rote Dreiecke zeigen das bei erfolgreicher Rekombination zu erwartende Bandenmuster (4,5 kb, 3,4 kb, 2,7 kb, 1,6 kb) an. Die Rekombination war in den Klonen 1 und 3 bis 6 erfolgreich. kan<sup>R</sup>: Kanamycin-Resistenzgen, attL: Gateway-Rekombinations-Element.

Die DNA-Sequenz des *Dhs*-Gens mit seiner genomischen Umgebung lag in Form eines BACs vor und wurde zunächst zur besseren Handhabung in einen Minimalvektor eingebracht. Dazu wurde der Minimalvektor pStart-K per PCR amplifiziert und dabei durch Verwendung von entsprechenden Oligonukleotiden zu den Homologiearm-Enden homologe Sequenzen inseriert. Über Red/ET-basierte Rekombination mit dem BAC RP23-359B23 wurde das *Dhs*-Gen mit seiner genomischen Umgebung in den Minimalvektor überführt und erfolgreiche Klone mittels Restriktionsanalyse identifiziert (Abbildung 3-3).

### 3.1.2.2 Modifizierung des *Dhs*-Gens

In das nun im Minimalvektor vorliegende *Dhs*-Gen mussten Exon 6 und 8 flankierende loxP-Elemente und eine Neomycin-Resistenzkassette eingeführt werden.



**Abbildung 3-4: Klonierungsschritte zur Modifizierung des *Dhs*-Gens.** In das im Minimalvektor vorliegende *Dhs*-Gen (A) wurde das erste loxP-Element (rotes Dreieck) über Red/ET-basierte Rekombination mit einer geflochtenen Chloramphenicol-Resistenzkassette (blau) inseriert (B). Über Cre-basierte Rekombination wurde die Resistenzkassette anschließend entfernt, so dass ein loxP-Element im *Dhs*-Gen verblieb (C). Für die Insertion des zweiten loxP-Elements sowie der Neomycin-Resistenzkassette wurde zunächst eine mit spezifischen Restriktionsschnittstellen (dunkelblau) versehene Chloramphenicol-Resistenzkassette über Red/ET-basierte Rekombination eingeführt (D). Diese wurde dann durch Restriktion und Ligation gegen eine mit denselben Schnittstellen versehene von FRT-Elementen (grüne Dreiecke) flankierte Neomycin-Resistenzkassette (blau) mit endständigem loxP-Element ausgetauscht (E).  $P_{gb2}$ : prokaryotischer Promotor,  $cm^R$ : Chloramphenicol-Resistenzgen,  $pA$ : Polyadenylierungssignal,  $neo^R$ : Neomycin-Resistenzgen,  $P_{PGK}$ : eukaryotischer Promotor.

Die Insertion des ersten loxP-Elements vor Exon 6 erfolgte über Red/ET-basierte Rekombination einer geflochtenen Chloramphenicol-Resistenzkassette und anschließendem Entfernen der Kassetten durch Cre-Rekombinase-vermittelte Rekombination, so dass ein loxP-Element im Vektor erhalten blieb (Abbildung 3-4 A-C). Dazu wurde die geflochte Chloramphenicol-Resistenzkassette zunächst per PCR amplifiziert und mit zum Intron 5-6 homologen Bereichen versehen (Abbildung 3-5 A), um sie ins *Dhs*-Gen vor Exon 6 einzusetzen. Richtig rekombinierte Klone wurden mittels Chloramphenicol-Selektion und

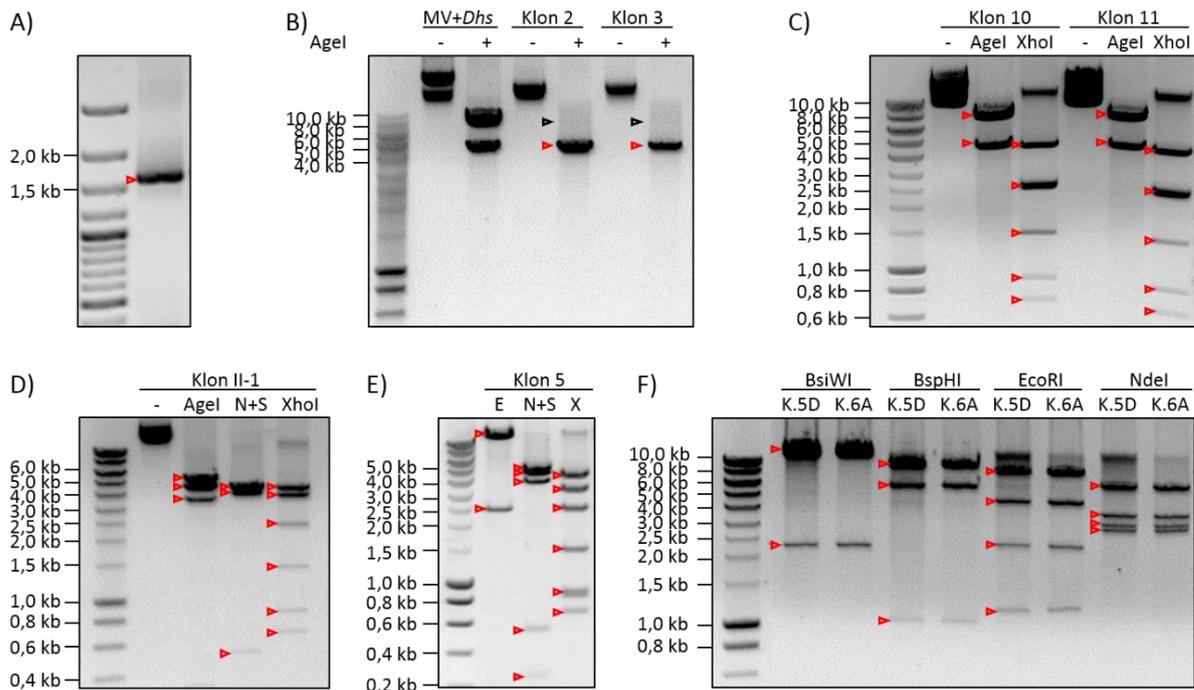
---

Restriktionsanalyse ausgewählt (Abbildung 3-5 B). Anschließend wurde durch Expression der Cre-Rekombinase die Entfernung der geflochten Resistenzkassette induziert und erfolgreiche Klone mittels Restriktionsanalyse identifiziert (Abbildung 3-5 C).

Das zweite loxP-Element sowie die Neomycin-Resistenzkassette wurden über einen Zwischenschritt hinter Exon 8 eingebracht (Abbildung 3-4 C-E). Zunächst wurde die geflochte Chloramphenicol-Resistenzkassette per PCR mit zum Intron 8-9 homologen Bereichen sowie zwei unterschiedlichen Restriktionsschnittstellen (BsiWI und SbfI) versehen und über Red/ET-basierte Rekombination ins *Dhs*-Gen eingeführt. Korrekte Klone wurden über Chloramphenicol-Selektion und Restriktionsanalyse ausgewählt (Abbildung 3-5 D). Anschließend wurde die Chloramphenicol-Resistenzkassette mittels BsiWI- und SbfI-Restriktionsverdau wieder entfernt. Die von FRT-Elementen flankierte Neomycin-Resistenzkassette mit endständigem loxP-Element wurde per PCR mit denselben Restriktionsschnittstellen versehen, geschnitten und mit dem *Dhs*-Vektor ligiert. Richtige Klone wurden mittels Restriktionsanalyse identifiziert (Abbildung 3-5 E). Diese Klone enthielten das nun vollständig modifizierte *Dhs*-Gen mit seiner genomischen Umgebung.

Um den *Targeting Vector* zu vervollständigen, musste nun noch eine negative Selektionskassette eingebracht werden. Dazu wurde das modifizierte *Dhs*-Gen per Gateway-Rekombination aus dem Minimalvektor pStart-K in den Thymidinkinasegen-haltigen Vektor pWS-TK6 (mit Ampicillin-Resistenzgen) überführt (Abbildung 3-5 F). Die über Ampicillin-Selektion und Restriktionsanalyse ermittelten positiven Klone konnten nun als *Targeting Vector* verwendet werden.

Zur weiteren Kontrolle wurde der gesamte *Targeting Vector* sequenziert, wobei die *Dhs*-Gensequenz, die genomische Umgebung sowie die korrekte Integration der eingebrachten Elemente bestätigt werden konnten. Zur weiteren Überprüfung konnte durch Expression der Cre-Rekombinase die Deletion der Exons 6 bis 8 erreicht werden und somit die Funktionsfähigkeit der loxP-Elemente nachgewiesen werden.



**Abbildung 3-5: Modifikation des im Minimalvektor vorliegenden *Dhs*-Gens.** A) Die gefloخته Chloramphenicol-Resistenzkassette wurde zunächst per PCR mit zum Intron 5-6 homologen Bereichen versehen und das 1,6 kb große Amplifikat im 1% Agarosegel überprüft. B) Die Rekombinations-basierte Insertion der gefloخته Chloramphenicol-Resistenzkassette wurde mittels Restriktionsanalyse mit Agel überprüft. Die korrekt rekombinierten Klone 2 und 3 zeichnen sich durch eine Bande von 4,4 kb+4,5 kb (rotes Dreieck) und die Abwesenheit einer 7,4 kb großen Bande (schwarzes Dreieck) aus. C) Nach Cre-basierter Rekombination konnte in Klon 10 die Entfernung der Chloramphenicol-Resistenzkassette nachgewiesen werden (Bandenmuster: Agel: 7,5 kb, 4,4 kb; XhoI: 4,4 kb, 2,5 kb+2,4 kb, 1,4 kb, 0,9 kb, 0,7 kb). D) Bei Klon II-1 war die Insertion der modifizierten Chloramphenicol-Resistenzkassette erfolgreich (Bandenmuster: Agel: 5,3 kb, 4,4 kb, 3,6 kb; NsiI+SpeI: 4,5 kb, 3,9 kb, 0,5 kb; XhoI: 4,4 kb, 3,9 kb, 2,4 kb, 1,4 kb, 0,9 kb, 0,7 kb). E) In Klon 5 konnte der korrekte Austausch der Chloramphenicol-Resistenzkassette gegen die FRT-Element flankierte Neomycin-Resistenzkassette detektiert werden (Bandenmuster: EcoRI: 11,6 kb, 2,3 kb; NsiI+SpeI: 5,0 kb, 4,5 kb, 3,7 kb, 0,5 kb, 0,3 kb; XhoI: 4,4 kb, 3,3 kb, 2,4 kb, 1,4 kb, 0,9 kb, 0,7 kb). Dieser Klon enthält das nun vollständig modifizierte *Dhs*-Gen mit seiner genomischen Umgebung. F) Abschließend wurde das modifizierte *Dhs*-Gen über Gateway-Rekombination in einen Vektor mit negativer Selektionskassette überführt und korrekte Klone mittels Restriktionsanalyse bestimmt (BsiWI: 13,8 kb, 2,2 kb; BspHI: 9,2 kb, 5,7 kb, 1,0 kb; EcoRI: 8,1 kb, 4,4 kb, 2,3 kb, 1,2 kb; NdeI: 6,2 kb, 3,7 kb, 3,2 kb, 2,9 kb). MV+*Dhs*: Minimalvektor mit *Dhs*-Gen ohne Rekombination, N+S: NsiI+SpeI, E: EcoRI, X: XhoI.

### 3.1.3 Gezielte Modifikation embryonaler Stammzellen

#### 3.1.3.1 Elektroporation des *Targeting Vectors* in ES-Zellen

Für die Generierung transgener ES-Zellklone wurde die Hybrid-ES-Zelllinie IDG3.2 verwendet, die von einer männlichen (C57BL/6J x 129S6/SvEvTac)-F1-Blastozyste abstammt. Der fertige *Targeting Vector* wurde mit ClaI linearisiert, aufgereinigt und per Elektroporation in die ES-

Zellen eingebracht. Über die im *Targeting Vector* enthaltene Neomycin-Resistenzkassette wurden stabil transfizierte Zellen mit G418 selektiert und 192 ES-Zellklone isoliert.

Da es neben der gewünschten Insertion des modifizierten *Dhs*-Gens durch homologe Rekombination, also einem Austausch des Wildtyp-Allels gegen das modifizierte *Dhs*-Allel, auch zu einer Sequenz-unspezifischen Integration gekommen sein konnte, mussten die Klone per Southern Blot oder *Long Range*-PCR hinsichtlich der korrekten Integrationsstelle überprüft werden. Dabei konnte zunächst kein eindeutig positiver Klon identifiziert werden.

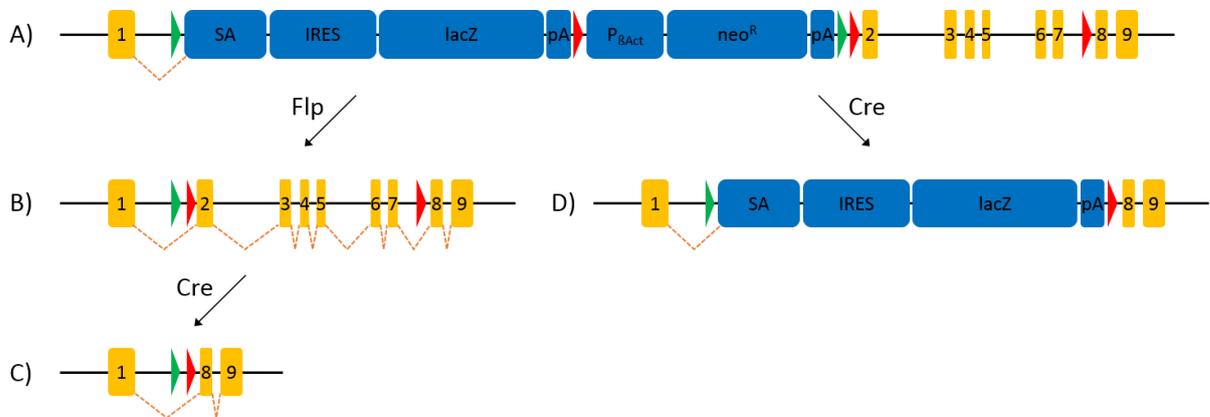
### 3.1.3.2 Systemwechsel zu EUCOMM

Da inzwischen ES-Zellklone mit einem modifizierten *Dhs*-Allel im Rahmen des *European Conditional Mouse Mutagenesis Program* (EUCOMM) erhältlich waren, die sich zur Etablierung einer konditionalen KO-Mauslinie eigneten und zudem bereits im C57BL/6-Hintergrund vorlagen, wurde im Folgenden mit diesen ES-Zellklonen weiter gearbeitet.

Die drei erhaltenen ES-Zellklone B06, C06 und F05 stammten von der ES-Zelllinie JM8A3.N1 ab. Diese wurde aus der C57BL/6-abgeleiteten ES-Zelllinie JM8 durch gezielte Reparatur der *non-agouti*-Mutation generiert und weisen trotz des C57BL/6-Hintergrundes agouti-farbenes Fell sowie eine gute Keimbahntransmissionsrate auf<sup>114</sup>. Der C57BL/6-Hintergrund, der bisher aufgrund von im Vergleich zum 129-Stamm schlechten Keimbahntransmissionsraten vermieden wurde, erspart die zeitaufwändige Rückkreuzung in den korrekten genetischen Hintergrund.

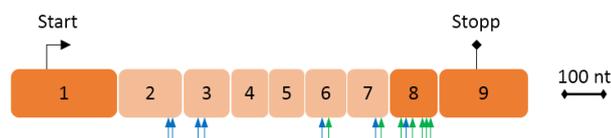
Bei dem in den ES-Zellklonen vorliegenden modifizierten *Dhs*-Allel ( $Dhs^{tm2a(EUCOMM)Wtsi}$ ) handelte es sich um ein sogenanntes *Knockout first*-Allel. Vor Exon 2 wurde eine zweiteilige von FRT-Elementen flankierte Kassette integriert, die aus einer lacZ-Reporterkassette und einer geflochten Neomycin-Resistenzkassette besteht, und dem Exon 7 nachfolgend wurde ein loxP-Element eingefügt. (Abbildung 3-6 A). Das in der lacZ-Kassette enthaltene Spleißakzeptor- und Polyadenylierungssignal würde zur Bildung einer verkürzten *Dhs*-mRNA, bestehend aus Exon 1 gespleißt an IRES und lacZ und somit zur Expression eines funktionsunfähigen DHS-Enzyms sowie des Reporters  $\beta$ -Galaktosidase führen. Durch Flp-basierte Rekombination würde die Genfunktion wiederhergestellt und aus dem *Knockout first*-

Allel ein konditionales Allel (Abbildung 3-6 B) werden, das für den Cre-vermittelten *Knockout* der Exons 2 bis 7 verwendet werden könnte (Abbildung 3-6 C).



**Abbildung 3-6: Knockout-Strategie für das *Dhs*-Gen nach EUCOMM.** A) Beim *Knockout first*-Allel ist eine von FRT-Elementen (grüne Dreiecke) gefloxt zweiteilige Kassetten (blau), bestehend aus einer lacZ-Reporterkassette sowie einer gefloxt Neomycin-Resistenzkassette vor Exon 2 und ein loxP-Element (rotes Dreieck) dem Exon 7 nachfolgend ins *Dhs*-Gen inseriert, so dass eine verkürzte lacZ-markierte *Dhs*-mRNA gebildet wird. B) Durch Flp-basierte Rekombination wird die Genfunktion wiederhergestellt und das konditionale Allel erhalten. C) Cre-basierte Rekombination führt zum *Knockout* der Exons 2 bis 7. D) Alternativ können aus dem *Knockout first*-Allel über Cre-basierte Rekombination die Neomycin-Resistenzkassette sowie die Exons 2 bis 7 entfernt werden. SA: Spleißakzeptorsignal, IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle, lacZ:  $\beta$ -Galaktosidasegen, pA: Polyadenylierungssignal, P<sub>βAct</sub>: eukaryotischer Promotor, neo<sup>R</sup>: Neomycin-Resistenzgen.

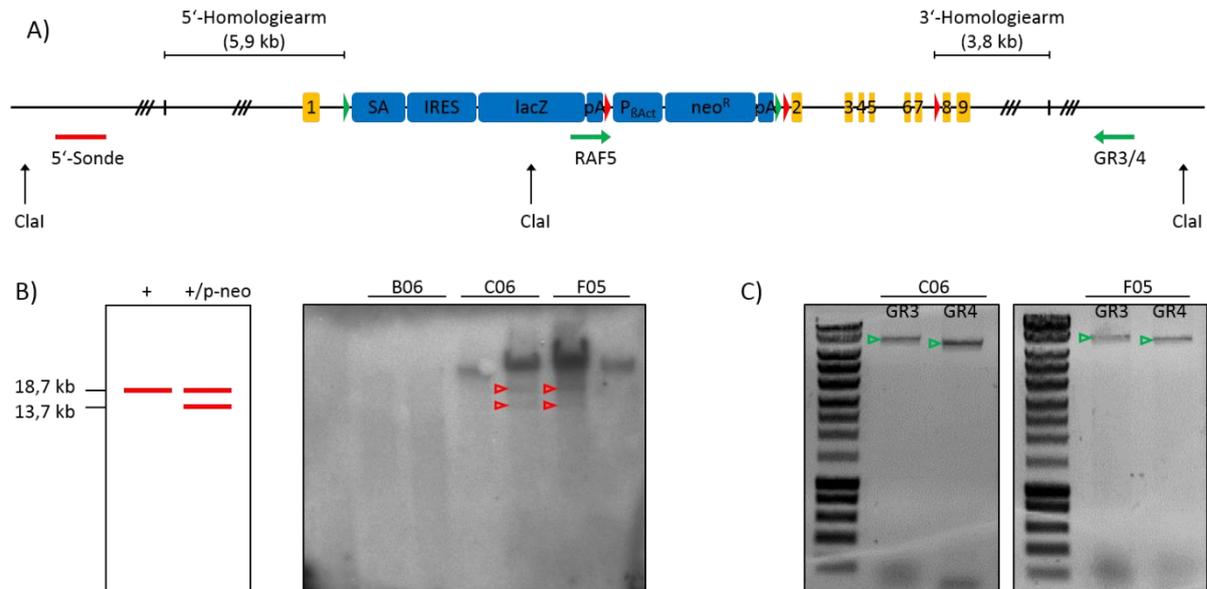
Nach dem Cre-basierten *Knockout* des *Dhs*-Gens blieben Exons 1, 8 und 9 erhalten und da das Leseraster nicht gestört wird, könnte eine verkürzte *Dhs*-mRNA gebildet werden (652 nt statt 1333 nt). Theoretisch könnte es dadurch zur Expression eines deletierten DHS-Enzyms (142 AS statt 369 AS) kommen, das vermutlich im Rahmen der Protein-Qualitätskontrolle degradiert würde. Da viele für die Spermidin- und NAD-Bindung wichtige Aminosäuren im verkürzten Protein fehlen würden, wäre in jedem Fall von einem vollständigen Funktionsverlust der DHS hinsichtlich der Hypusin-Modifikation auszugehen (Abbildung 3-7).



**Abbildung 3-7: *Dhs*-mRNA mit Markierung der beim EUCOMM-Ansatz deletierbaren Exons.** Der *Knockout* der Exons 2 bis 7 (heller dargestellt) würde zur Bildung einer verkürzten *Dhs*-mRNA führen, der Bereiche fehlen, die für die Bindung vom Kofaktor NAD oder vom Substrat Spermidin wichtig sind. Blaue bzw. grüne Pfeile markieren Bereiche, die die dabei relevanten Aminosäuren kodieren (NAD-Bindung: Ser<sup>105</sup>, Asn<sup>106</sup>, Ser<sup>109</sup>, Thr<sup>131</sup>, Glu<sup>137</sup>, Asp<sup>238</sup>, Gly<sup>283</sup>, Thr<sup>308</sup>, Ala<sup>309</sup>; Spermidin-Bindung: Asp<sup>243</sup>, His<sup>288</sup>, Tyr<sup>305</sup>, Asp<sup>316</sup>, Glu<sup>323</sup>, Trp<sup>327</sup>, Lys<sup>329</sup>). Es könnte also von einem vollständigen Funktionsverlust des deletierten *Dhs*-Gens ausgegangen werden.

### 3.1.3.3 Nachweis der homologen Rekombination

Die erhaltenen ES-Zellklone wurden zunächst auf die Sequenz-spezifische Integration des modifizierten *Dhs*-Allels überprüft. Dazu wurde das 5'-Ende mittels Southern Blot und das 3'-Ende mittels *Long Range*-PCR untersucht (Abbildung 3-8).



**Abbildung 3-8: Nachweis der homologen Rekombination in den ES-Zellklonen C06 und F05.** A) Die korrekte Insertion des modifizierten *Dhs*-Gens mit 5,9 kb langem 5'- und 3,8 kb langem 3'-Homologiearm wurde mittels Southern Blot und *Long Range*-PCR überprüft. Für den Southern Blot wurde die genomische DNA mit *Clal* geschnitten und mit einer Sonde (rot), die stromaufwärts außerhalb des 5'-Homologiearms bindet, detektiert. Für die *Long Range*-PCR wurde ein in der *lacZ*-Reporterkassette bindendes „Vorwärts“-Oligonukleotid und ein stromabwärts außerhalb des 3'-Homologiearms bindendes „Rückwärts“-Oligonukleotid verwendet (grüne Pfeile). B) Da die *lacZ*-Reporterkassette eine zusätzliche *Clal*-Schnittstelle aufweist, kann das modifizierte *Dhs*-Allel durch das Erscheinen einer kleineren Bande im Southern Blot identifiziert werden. In den ES-Zellklonen C06 und F05 konnte neben der Wildtyp-Bande (+, 18,7 kb) auch die Bande für das modifizierte Allel (p-neo, 13,7 kb) detektiert werden, diese Klone tragen also heterozygot das modifizierte Allel. C) Bei der *Long Range*-PCR konnte das modifizierte *Dhs*-Allel in den ES-Zellklonen C06 und F05 durch das Vorhandensein eines 10,5 kb (GR3) bzw. 9,8 kb (GR4) großen PCR-Produktes nachgewiesen werden.

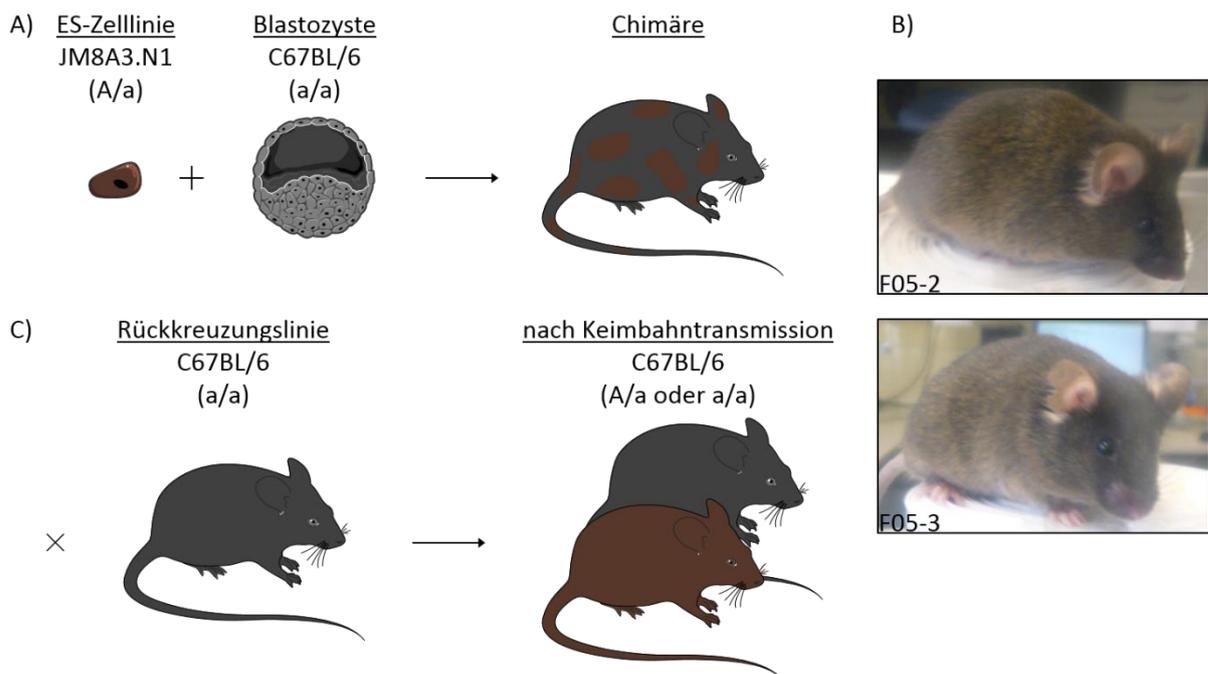
Beim Southern Blot konnte das modifizierte *Dhs*-Allel über eine zusätzliche *Clal*-Schnittstelle in der *lacZ*-Reporterkassette und daraus resultierendem kleineren Restriktionsfragment vom Wildtyp-Allel unterschieden werden. Für die *Long Range*-PCR wurde ein in der *lacZ*-Reporterkassette bindendes Oligonukleotid mit einem außerhalb des Homologiebereichs bindenden Oligonukleotid kombiniert, so dass die Bildung eines entsprechend großen PCR-Produktes als Nachweis für das modifizierte *Dhs*-Allel diente.

Mit beiden Methoden konnte die korrekte heterozygote Integration des modifizierten *Dhs*-Allels in den ES-Zellklonen C06 und F05 detektiert werden.

### 3.1.4 Generierung von chimären Mäusen

Zur Herstellung der *Dhs*-KO-Mauslinie wurden die modifizierten ES-Zellklone in Embryonen der Linie C57BL/6 injiziert und diese in scheinchwangere Ammen implantiert. Durch Vermischung der modifizierten ES-Zellen mit den in den Embryonen enthaltenen ES-Zellen entstanden chimäre Nachkommen, die aus Wildtyp- und mutierten Zellen bestanden. Der Chimärismus ließ sich an der schwarz-agouti gescheckten Fellfarbe erkennen, da die verwendete ES-Zelllinie durch eine Reparatur der *non-agouti*-Mutation zu agouti-farbenem Fell, Zellen aus dem Embryo zu schwarzem Fell führten (Abbildung 3-9).

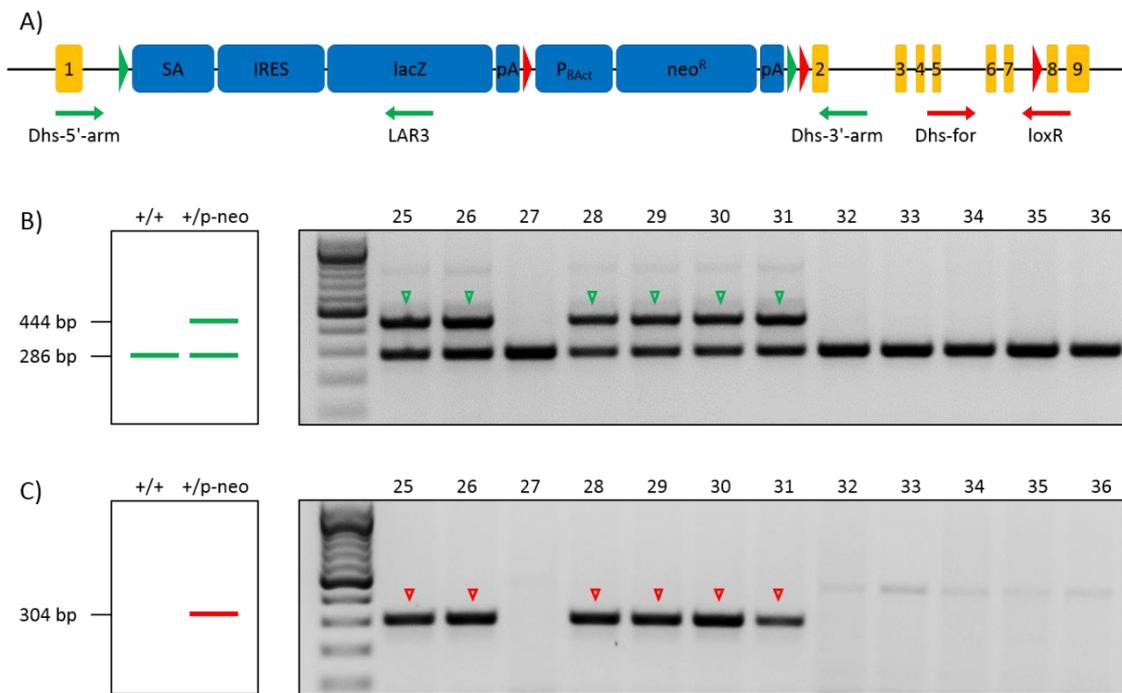
Aus den drei erhaltenen ES-Zellklonen wurden insgesamt zwölf chimäre Böcke generiert. Dabei gingen jeweils sechs chimäre Tiere aus Klon B06 (B06-1 – 6) und Klon F05 (F05-1 – 6) hervor, wohingegen C06 zu keinen chimären Nachkommen führte.



**Abbildung 3-9: Generierung und Rückkreuzung der chimären Mäuse.** A) Nach Injektion der modifizierten ES-Zellen der Linie JM8A3.N1 mit heterozygot repariertem *Agouti*-Allel (A/a) in Embryonen der Linie C57BL/6 mit schwarzer Fellfarbe (a/a) wurden schwarz-agouti gescheckte Chimären geboren. B) Schwarze und agouti-farbene Fellbereiche der Chimären waren nicht klar voneinander abgegrenzt, da das vom *Agouti*-Gen kodierte Signalpeptid sekretiert wird und alle Haarfollikel, deren Melanozyten mit diesem Signalpeptid in Kontakt kommen, agouti-farbene Haare produzieren können. Abgebildet sind zwei aus dem ES-Zellklon F05 generierte chimäre Böcke mit einem chimären Anteil von etwa 60%. C) Nach Rückkreuzung der Chimären mit C57BL/6-Mäusen konnte es sowohl in den agouti-farbenen als auch in den schwarzen Nachkommen zu einer Keimbahntransmission des modifizierten *Dhs*-Allels gekommen sein.

Die Weitergabe des modifizierten Allels an die Nachkommen konnte nur erfolgen, wenn die modifizierten ES-Zellen zur Bildung der Keimbahn beigetragen haben. Da männliche ES-Zellen

verwendet wurden, wurden nur die chimären Böcke für eine Rückkreuzung mit C57BL/6-Tieren eingesetzt. Der Nachwuchs wurde auf das veränderte *Dhs*-Allel getestet. Dabei mussten neben den Nachkommen mit agouti-farbener auch die mit schwarzer Fellfarbe getestet werden, da aufgrund der Heterozygotie des intakten *agouti*-Allels schwarze Fellfarbe nach der Rückkreuzung keine Aussage mehr über das *Dhs*-Allel zuließ.



**Abbildung 3-10: Keimbahntransmission des modifizierten *Dhs*-Allels.** A) Die Nachkommen aus der Rückkreuzung der chimären Böcke wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des modifizierten *Dhs*-Allels getestet. Zum Nachweis der inserierten Kasette (blau) wurde eine PCR mit Oligonukleotiden, die innerhalb, stromauf- und stromabwärts der Kasette binden (grün: LAR3, Dhs-5'-arm, Dhs-3'-arm), durchgeführt. Das einzelne loxP-Element wurde über ein im loxP-Element und ein stromaufwärts bindendes Oligonukleotid (rot: loxR, Dhs-for) nachgewiesen. B) Mäuse mit Keimbahntransmission (grüne Dreiecke) zeigten in der LAR3-PCR neben der Wildtyp-Bande (+, 286 bp, Dhs-5'-arm mit Dhs-3'-arm) eine zweite Bande von 444 bp (Dhs-5'-arm mit LAR3). (Ein Produkt von Dhs-3'-arm und Dhs-5'-arm (7,4 kb) wurde aufgrund des kinetischen Nachteils in der PCR gegenüber den kleineren Produkten nicht gebildet). C) Bei der loxR-PCR wurden nur im Fall einer Keimbahntransmission (rote Dreiecke) die 304 bp großen Produkte gebildet. In den Mäusen 25, 26 und 28 bis 31 kam es also zu einer Keimbahntransmission, hier konnte das modifizierte *Dhs*-Allel (p-neo) heterozygot detektiert werden.

Jeder chimäre Bock wurde mit zwei C57BL/6-Weibchen verpaart und jeweils mindestens drei Würfe per PCR auf das Vorhandensein des modifizierten *Dhs*-Allels getestet (Abbildung 3-10). Einzig bei Verwendung des Bocks F05-4 konnte eine Keimbahntransmission nachgewiesen werden (Tabelle 3-1). Seine Nachkommen zeigten erwartungsgemäß zu 50% das modifizierte *Dhs*-Allel.

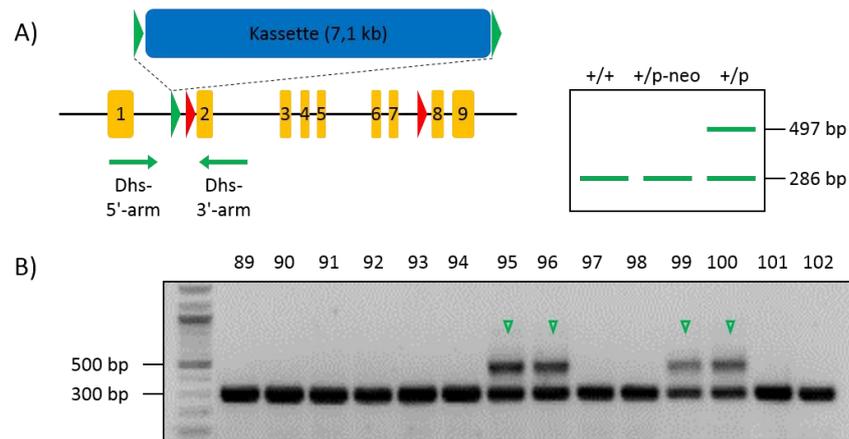
**Tabelle 3-1: Chimäre Nachkommen und Keimbahntransmission.** Aus den drei erhaltenen ES-Zellklonen wurden insgesamt zwölf Böcke mit einem chimären Anteil von 55 – 95% generiert. Nur bei Verwendung des Bocks F-04 konnte eine Keimbahntransmission des modifizierten *Dhs*-Allels festgestellt werden.

ES-Zellklon	Chimäre	Chimärer Anteil	Keimbahntransmission
B06	1	55%	0/29
	2	55%	0/26
	3	65%	0/19
	4	70%	0/26
	5	70%	0/17
	6	65%	0/18
C06	-	-	-
F05	1	95%	0
	2	60%	0
	3	60%	0/30
	4	60%	<b>12/24</b>
	5	60%	0/23
	6	60%	0

### 3.1.5 Etablierung der konditionalen *Dhs-Knockout*-Mauslinie

#### 3.1.5.1 Entfernung der Resistenzkassette

Nach erfolgreicher Keimbahntransmission trugen die Mäuse das modifizierte *Dhs*-Allel heterozygot in allen Zellen. Um eine mögliche Beeinflussung der Genexpression durch die eingebrachten Elemente so gering wie möglich zu halten, und einen konditionalen KO zu erhalten, sollte zunächst die von FRT-Elementen flankierte lacZ-Reporter- und Neomycin-Resistenzkassette entfernt werden. Dazu wurden die Mäuse mit Flp-*Deleter*-Mäusen verpaart, die ubiquitär eine modifizierte Flp-Rekombinase exprimieren<sup>99</sup>.



**Abbildung 3-11: PCR-Nachweis der Entfernung der lacZ-Reporter- und Neomycin-Resistenzkassette.** A) Nach Flp-basierter Deletion der von FRT-Elementen flankierten Kasette (blau, 50% verkleinert dargestellt) blieben ein FRT-Element (grünes Dreieck) und zwei loxP-Elemente (rotes Dreieck) im *Dhs*-Gen zurück. Die Rekombination wurde durch stromauf- und -abwärts der Kasette bindende Oligonukleotide (grün: Dhs-5'-arm, Dhs-3'-arm) nachgewiesen. Während beim Kassetten-enthaltenden Allel (p-neo) aufgrund des großen Abstands der Oligonukleotide voneinander (7,4 kb) unter den gewählten Bedingungen kein PCR-Produkt gebildet wurde, konnte nach Deletion der Kasette (p) ein 497 bp großes PCR-Produkt detektiert werden, das sich vom Wildtyp-Produkt (+, 286 bp) unterscheiden ließ. B) In den Mäusen 95, 96, 99 und 100 konnte die gewünschte Deletion nachgewiesen werden (grüne Pfeile).

Die Nachkommen wurden per PCR auf die gewünschte Deletion der Kasette untersucht (Abbildung 3-11). Da das modifizierte *Dhs*-Allel und die Flp-Rekombinase in den verpaarten Mäusen jeweils heterozygot vorlagen, sollte die Rekombination statistisch in 25% des Nachwuchses stattgefunden haben. Tatsächlich konnte in 22% der Tiere das nun gefloxtete *Dhs*-Allel nachgewiesen werden.

### 3.1.5.2 Verpaarungsstrategie und Genotypisierung mittels Multiplex-PCR

Die Mäuse mit heterozygot gefloxtem *Dhs*-Gen zeigten keine erkennbaren Unterschiede zu Wildtyp-Tieren, die konditionale Modifikation des *Dhs*-Gens hatte also keinen offensichtlichen Einfluss.

Zur Untersuchung des konstitutiven *Knockouts* des *Dhs*-Gens wurden die Mäuse mit gefloxtem *Dhs*-Allel mit *Cre-Deleter*-Mäusen verpaart. Diese exprimieren die Cre-Rekombinase ab der frühen Embryonalentwicklung ubiquitär unter Kontrolle eines CMV-Minimalpromotors<sup>100</sup>, so dass Nachkommen mit deletiertem *Dhs*-Allel entstanden.

Um einen induzierbaren *Dhs-Knockout* untersuchen zu können, wurden die gefloxteten Mäuse mit CAG-cre/*Esr1*-Mäusen verpaart. Diese Mäuse exprimieren ein Fusionsprotein aus Cre-

Rekombinase und einem mutierten Östrogen-Rezeptor, der seinen natürlichen Liganden Östradiol nicht mehr bindet und das Fusionsprotein im Zytoplasma zurückhält<sup>101</sup>. Der KO ließ sich durch Tamoxifengabe induzieren, da das Fusionsprotein erst nach Bindung von Tamoxifen in den Kern gelangen und gefloxt Genbereiche deletieren kann.

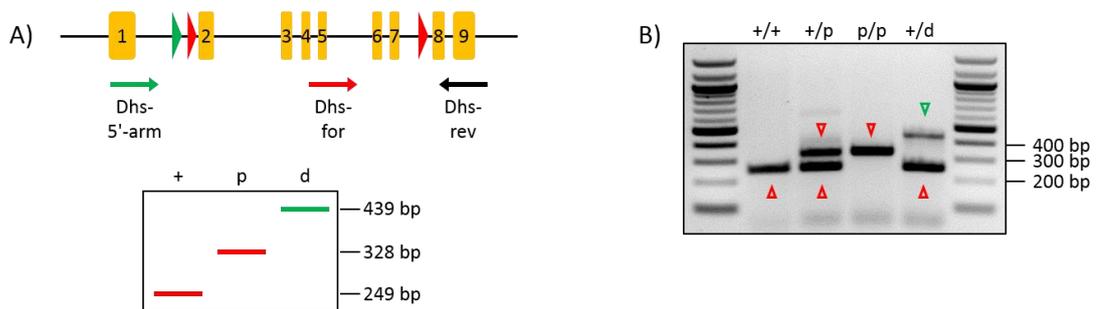
Da das modifizierte *Dhs*-Allel in den ES-Zellen heterozygot vorlag und alle daraus generierten Mäuse ebenfalls heterozygot waren, mussten die entsprechenden Mäuse anschließend untereinander verpaart werden, um einen homozygoten konstitutiven/konditionalen KO des *Dhs*-Gens untersuchen zu können (Tabelle 3-2). Dabei wurden Tiere mit dem nun nicht mehr benötigtem Flp-Transgen von weiteren Verpaarungen ausgeschlossen.

**Tabelle 3-2: Verpaarungsschema und erwartete Genotyp-Verteilung.** Um den konstitutiven *Dhs*-Knockout zu untersuchen, wurden zunächst Mäuse mit heterozygot gefloxtem *Dhs*-Allel (+/p) mit Cre-Deleter-Mäusen (CMV-cre<sup>+</sup>) verpaart, dann die Nachkommen mit heterozygot deletiertem *Dhs*-Allel (+/d) untereinander. Für den konditionalen *Knockout* wurden die heterozygot gefloxten Mäuse mit CAG-cre/Esr1-Mäusen verpaart, und die gefloxten CAG-cre/Esr1-positiven Mäuse wiederum mit gefloxten Mäusen verpaart. \*Aufgrund der X-chromosomalen Vererbung des Cre-Transgens war die Verteilung der Genotypen geschlechtsabhängig. #Das Cre-Transgen wurde bei dieser Angabe nicht berücksichtigt. +: Wildtyp-Allel, p: gefloxtes Allel, d: deletiertes Allel.

Verpaarungen für konstitutiven KO			Nachkommen	Verteilung
<i>Dhs</i> <sup>+/p</sup>	x	<i>Dhs</i> <sup>+/+</sup> ;CMV-cre <sup>+</sup>	<i>Dhs</i> <sup>+/+</sup> , <i>Dhs</i> <sup>+/+</sup> ;CMV-cre <sup>+</sup> , <i>Dhs</i> <sup>+/p</sup> , <i>Dhs</i> <sup>+/d</sup> ;CMV-cre <sup>+</sup>	1:1:1:1*
<i>Dhs</i> <sup>+/d</sup>	x	<i>Dhs</i> <sup>+/d</sup>	<i>Dhs</i> <sup>+/+</sup> , <i>Dhs</i> <sup>+/d</sup> , <i>Dhs</i> <sup>d/d</sup>	1:2:1#
Verpaarungen für konditionalen KO			Nachkommen	Verteilung
<i>Dhs</i> <sup>+/p</sup>	x	<i>Dhs</i> <sup>+/+</sup> ;CAG-cre-Esr1 <sup>+</sup>	<i>Dhs</i> <sup>+/+</sup> , <i>Dhs</i> <sup>+/+</sup> ;CAG-cre/Esr1 <sup>+</sup> , <i>Dhs</i> <sup>+/p</sup> , <i>Dhs</i> <sup>+/p</sup> ;CAG-cre/Esr1 <sup>+</sup>	1:1:1:1
<i>Dhs</i> <sup>+/p</sup> ;CAG-cre-Esr1 <sup>+</sup>	x	<i>Dhs</i> <sup>+/p</sup>	<i>Dhs</i> <sup>+/+</sup> , <i>Dhs</i> <sup>+/+</sup> ;CAG-cre/Esr1 <sup>+</sup> , <i>Dhs</i> <sup>+/p</sup> , <i>Dhs</i> <sup>+/p</sup> ;CAG-cre/Esr1 <sup>+</sup> , <i>Dhs</i> <sup>p/p</sup> , <i>Dhs</i> <sup>p/p</sup> ;CAG-cre/Esr1 <sup>+</sup>	1:1:2:2:1:1
<i>Dhs</i> <sup>p/p</sup> ;CAG-cre-Esr1 <sup>+</sup>	x	<i>Dhs</i> <sup>p/p</sup>	<i>Dhs</i> <sup>p/p</sup> , <i>Dhs</i> <sup>p/p</sup> ;CAG-cre/Esr1 <sup>+</sup>	1:1
<i>Dhs</i> <sup>+/+</sup> ;CAG-cre-Esr1 <sup>+</sup>	x	<i>Dhs</i> <sup>+/+</sup>	<i>Dhs</i> <sup>+/+</sup> , <i>Dhs</i> <sup>+/+</sup> ;CAG-cre/Esr1 <sup>+</sup>	1:1

Der Genotyp der Nachkommen wurde per PCR getestet. Um alle möglichen *Dhs*-Allele (Wildtyp, gefloxt, deletiert) in einer PCR detektieren zu können, wurde eine Multiplex-PCR für das *Dhs*-Allel entwickelt (Abbildung 3-12). Dabei wurde ein im 3'-Bereich bindendes „Rückwärts“-Oligonukleotid mit zwei verschiedenen „Vorwärts“-Oligonukleotiden kombiniert. Das im gefloxten Bereich bindende „Vorwärts“-Oligonukleotid führte beim

geflochtenen Allel durch das loxP-Element zu einem größeren Produkt (328 bp) als beim Wildtyp-Allel (249 bp), während beim deletierten Allel kein Produkt gebildet werden konnte. Mit dem im 5'-Bereich bindendem Oligonukleotid wurde dagegen unter den gewählten Bedingungen nur im Fall des deletierten Allels ein Produkt gebildet, das sich mit 439 bp von den anderen Produkten unterscheiden ließ. Mit dieser Multiplex-Strategie ließen sich also alle Allel-Kombinationen in einer PCR nachweisen. Dadurch, dass in jedem Fall mindestens ein Produkt gebildet werden musste, bestand immer eine Amplifikationskontrolle, so dass falsch negative Ergebnisse ausgeschlossen werden konnten.



**Abbildung 3-12: Multiplex-PCR für das *Dhs*-Allel.** A) Durch Verwendung eines Oligonukleotid-Gemischs mit einem im 3'-Bereich bindenden „Rückwärts“- (Dhs-rev) sowie zwei verschiedenen „Vorwärts“-Oligonukleotiden (Dhs-5'-arm, Dhs-for) konnten alle drei möglichen *Dhs*-Allele in einer PCR nachgewiesen werden (+: Wildtyp-Allel, p: geflochtenes Allel, d: deletiertes Allel). B) In der Multiplex-PCR ließen sich alle Allelkombinationen gut voneinander unterscheiden und der Genotyp eindeutig bestimmen.

Die Nachkommen mussten zusätzlich per PCR auf das gewünschte Cre-Transgen getestet werden, da dieses in der Ausgangslinie heterozygot vorlag. Dafür erfolgte eine Standard-PCR bei der teilweise auch Promotorbereiche amplifiziert wurden, um die verschiedenen Cre-Transgene unterscheiden zu können.

Es wurde eine konditionale *Knockout*-Mauslinie für das *Dhs*-Gen generiert, die die Cre-basierte Deletion der geflochtenen Exons 2 bis 7 erlaubt und folglich zu einem vollständigen Funktionsverlust des kodierten DHS-Enzyms führt. Zusammen mit verschiedenen *Cre-Deleter*-Mäusen ermöglicht dieses Mausmodell nun die Untersuchung des konstitutiven und konditionalen DHS-Verlustes im Säugerorganismus.

## 3.2 Analyse des *Dhs-Knockouts*

Mit der generierten *Dhs-Knockout*-Mauslinie ließen sich die Auswirkungen des DHS-Verlustes im Säugerorganismus untersuchen. Das konditionale Design erlaubte neben der Untersuchung des konstitutiven auch den gewebs- oder entwicklungspezifischen KO sowie die Generierung eines *in vitro*-KO-Systems.

### 3.2.1 Der heterozygote *Dhs-Knockout* zeigt keinen auffälligen Phänotyp

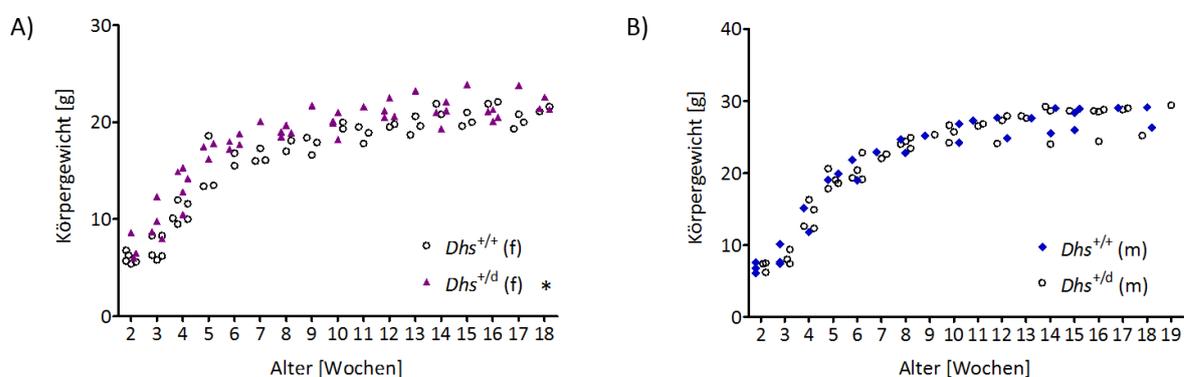
Um zu untersuchen, ob Mäuse mit heterozygotem *Dhs-Knockout* einen Phänotyp aufweisen, wurden Mäuse mit heterozygot gefloxtem *Dhs*-Allel mit *Cre-Deleter*-Mäusen verpaart. Dabei wurden Nachkommen mit allen vorhergesagten Genotypen ( $Dhs^{+/+}$ ,  $Dhs^{+/+};CMV-cre^+$ ,  $Dhs^{+/p}$ ,  $Dhs^{+/d};CMV-cre^+$ ) geboren. Bei allen Tieren mit modifiziertem *Dhs*-Allel und *Cre*-Transgen, lag das Allel in der deletierten Form vor, es wurde kein Tier mit gefloxtem Allel und *Cre*-Transgen ( $Dhs^{+/p};CMV-cre^+$ ) detektiert. Damit konnte gezeigt werden, dass der *Cre*-vermittelte *Knockout* des *Dhs*-Gens zuverlässig während der Embryonalentwicklung funktionierte.

**Tabelle 3-3: Nachkommen aus der Verpaarung von heterozygot geflochten *Dhs*-Mäusen mit *Cre-Deleter*-Mäusen.** Bei der Untersuchung von 74 Nachkommen auf das *Dhs*-Allel und *Cre* wurden alle vorhergesagten Genotypen gefunden. Der *Cre*-vermittelte *Knockout* des *Dhs*-Gens erfolgte zuverlässig während der Embryonalentwicklung, da kein Tier mit gefloxtem *Dhs*-Allel und *Cre*-Transgen detektiert werden konnte. Der Anteil von Nachkommen mit heterozygot deletiertem *Dhs*-Allel ist allerdings geringer als statistisch erwartet, die Genotyp-Verteilung weicht signifikant von der erwarteten 1:1:1:1-Verteilung ab ( $\chi^2$ -Test, Wahrscheinlichkeit für die 1:1:1:1-Verteilung: 0,04). Wegen der X-chromosomalen Vererbung des *Cre*-Transgens sind nur Verpaarungen mit *Cre-Deleter*-Weibchen einbezogen. +: Wildtyp-Allel, p: gefloxtes Allel, d: deletiertes Allel.

$Dhs^{+/+}$	$Dhs^{+/+};CMV-cre^+$	$Dhs^{+/p}$	$Dhs^{+/d};CMV-cre^+$
27	16	21	10
36%	22%	28%	14%

Allerdings wurden prozentual weniger heterozygote Mäuse als statistisch erwartet geboren (Tabelle 3-3), die Verteilung der Genotypen folgte nicht der erwarteten 1:1:1:1-Verteilung, sondern war zugunsten der *Cre*-negativen Nachkommen verschoben. Dies könnte entweder der für eine statistische Auswertung noch zu geringen Zahl an Nachkommen geschuldet sein,

oder die Aktivität der Cre-Rekombinase besonders in Verbindung mit loxP-ähnlichen Elementen im Genom könnte zu einem Nachteil während der Embryonalentwicklung führen. Die weitere Entwicklung der heterozygoten Mäuse erfolgte normal, wie anhand der Körpergewichtsentwicklung über die ersten vier Monate zu erkennen war (Abbildung 3-13). Die heterozygoten Weibchen wiesen ein leicht erhöhtes Durchschnittsgewicht auf. Ansonsten zeigten die heterozygoten Tiere weder einen auffälligen Phänotyp, noch eine verminderte Überlebenswahrscheinlichkeit, eingeschränkte Fertilität, sichtbare Organveränderungen oder Besonderheiten in der Histologie von Milz, Pankreas, Knochen und Knochenmark.



**Abbildung 3-13: Körpergewichtsentwicklung von heterozygoten *Dhs*-Knockout-Mäusen.** Je fünf heterozygote *Dhs*-Weibchen (A) und Böcke (B) wurden über vier Monate regelmäßig gewogen. Als Kontrolle dienten fünf bzw. drei Wildtyp-Geschwister, die ebenfalls das Cre-Transgen trugen. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den heterozygoten Böcken und den Kontrolltieren. Die heterozygoten Weibchen wiesen ein leicht erhöhtes Durchschnittsgewicht auf. Signifikante Abweichungen gegenüber der Wildtyp-Kontrolle sind mit \* gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ). f: Weibchen, m: Böcke. +: Wildtyp-Allel, d: deletiertes Allel.

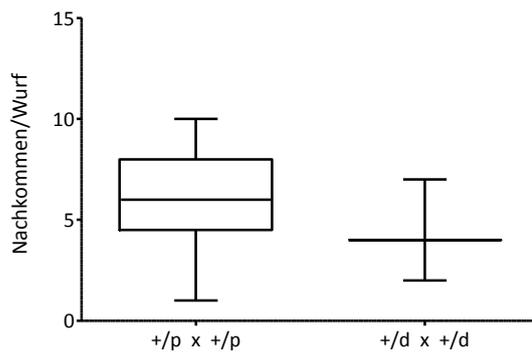
Insgesamt stellte der heterozygote *Dhs*-Verlust also keine auffällige Beeinträchtigung für die Mäuse dar. Ein Gendosis-Effekt war nicht festzustellen.

### 3.2.2 Der konstitutive *Dhs*-Knockout verursacht embryonale Letalität

Um zu testen, ob auch der homozygote *Dhs*-Knockout lebensfähig ist, wurden Mäuse mit heterozygot deletiertem *Dhs*-Allel miteinander verpaart. Dabei konnten keine homozygoten *Knockout*-Nachkommen detektiert werden (Tabelle 3-4). Statt der erwarteten Genotyp-Verteilung von 1:2:1 trat eine 1:2:0-Verteilung auf ( $\chi^2$ -Test, Wahrscheinlichkeit: 0,93) und ließ auf embryonale Letalität des homozygoten *Dhs*-Knockouts schließen.

**Tabelle 3-4: Nachkommen aus der Verpaarung von heterozygot deletierten *Dhs*-Mäusen.** Bei der PCR-Untersuchung von drei Würfen konnte kein Tier mit homozygot deletiertem *Dhs*-Allel gefunden werden. Statt einer 1:2:1-Verteilung wurde eine 1:2:0-Verteilung beobachtet und ließ auf embryonale Letalität des homozygoten *Dhs-Knockouts* schließen. +: Wildtyp-Allel, d: deletiertes Allel.

<i>Dhs</i> <sup>+/+</sup>	<i>Dhs</i> <sup>+/d</sup>	<i>Dhs</i> <sup>d/d</sup>
5	8	0
38%	62%	0%



**Abbildung 3-14: Durchschnittliche Wurfgröße bei Verpaarung der heterozygot deletierten *Dhs*-Mäuse.**

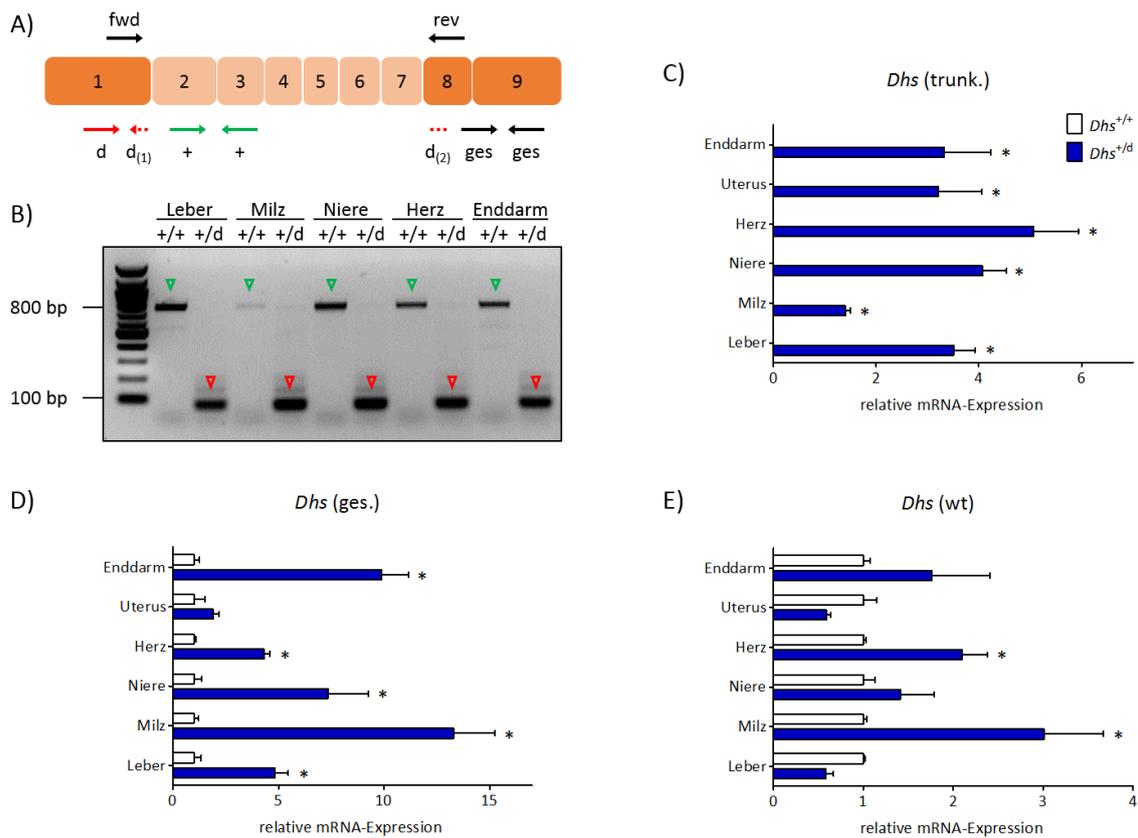
Die Wurfgröße bei der Verpaarung heterozygot deletierter *Dhs*-Mäuse war gemessen an der Verpaarung gefloxtter Mäuse um 30% reduziert und galt als weiterer Hinweis für die embryonale Letalität des homozygoten *Dhs-Knockouts*. Abgebildet ist der Standardfehler des Mittelwerts. +: Wildtyp-Allel, p: gefloxtes Allel, d: deletiertes Allel.

Zusätzlich wurde eine deutlich reduzierte Wurfgröße beobachtet (Abbildung 3-14). Während bei der Verpaarung von heterozygot gefloxtten *Dhs*-Mäusen durchschnittlich 6,2 Nachkommen pro Wurf geboren wurden, war die Anzahl bei der Verpaarung von heterozygot deletierten *Dhs*-Mäusen um 30% auf 4,3 Nachkommen pro Wurf reduziert und entsprach damit etwa dem bei embryonaler Letalität des homozygoten KOs betroffenen Anteil von 20%.

Aus diesem Ergebnis lässt sich ableiten, dass der homozygote *Dhs-Knockout* embryonale Letalität verursacht. Da keine tot geborenen Embryonen gefunden wurden, muss die Letalität in der früheren Embryonalentwicklung aufgetreten sein, der genaue Zeitpunkt wurde nicht näher bestimmt.

### 3.2.3 Ein Kompensationsmechanismus erklärt die Unauffälligkeit des heterozygoten *Dhs-Knockouts*

Da der homozygote *Dhs-Knockout* embryonal letal war, der heterozygote *Knockout* dagegen keinen Phänotyp zeigte, wurde untersucht, ob ein möglicher Gendosis-Effekt durch andere Mechanismen kompensiert wurde. Zunächst wurde daher die Expression der am Hypusin-System beteiligten Gene in den heterozygoten Mäusen untersucht.



**Abbildung 3-15: Analyse der *Dhs*-mRNA-Expression in den heterozygoten *Dhs*-Mäusen.** A) Um zu überprüfen, ob bei deletiertem *Dhs*-Allel eine verkürzte *Dhs*-mRNA entstand, wurden Oligonukleotide verwendet, die Exon 1 bis 8 amplifizieren (fwd und rev), so dass die mutierte mRNA zu einem deutlich verkürzten PCR-Produkt führen würde. Zur quantitativen Bestimmung der gesamten *Dhs*-mRNA sowie der verschiedenen *Dhs*-Formen wurden drei verschiedene Oligonukleotid-Kombinationen (ges, +, d) eingesetzt. Die Gesamtmenge wurde durch Amplifikation eines auch beim deletierten Allel vorhandenen Bereichs vorgenommen, die Wildtyp-mRNA wurde durch Amplifikation eines beim deletierten Allel nicht vorhandenen Bereichs (heller dargestellt) detektiert. Zur spezifischen Messung der verkürzten mRNA wurde ein über die Exon 1 - Exon 8-Grenze verlaufendes Oligonukleotid eingesetzt. B) Die mutierte *Dhs*-mRNA konnte in allen untersuchten Organen der heterozygoten *Dhs*-Tiere nachgewiesen werden (75 bp großes PCR-Produkt), während die Wildtyp-Kontrolltiere nur die Wildtyp-Bande (756 bp) aufwiesen. Da das deutlich kleinere PCR-Produkt kinetisch bevorteilt war, wurde die Wildtyp-Bande in den heterozygoten Tieren nicht detektiert. C-E) Die *Dhs*-Expression wurde mittels qPCR quantifiziert (Referenzgen 18S-rRNA) und jeweils auf die Wildtyp-Expression bzw. im Fall der verkürzten mRNA auf die Gesamtexpression normiert. In den heterozygoten Tieren wurde eine deutliche Hochregulation der gesamten *Dhs*-mRNA beobachtet (D), die durch eine starke Expression der mutierten (C) und der Wildtyp-mRNA (E) hervorgerufen wurde. Abgebildet ist die Standardabweichung jeder Triplikat-Messung. Signifikante Abweichungen gegenüber der Wildtyp-Kontrolle sind mit \* gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ). +: Wildtyp-Allel, d: deletiertes Allel.

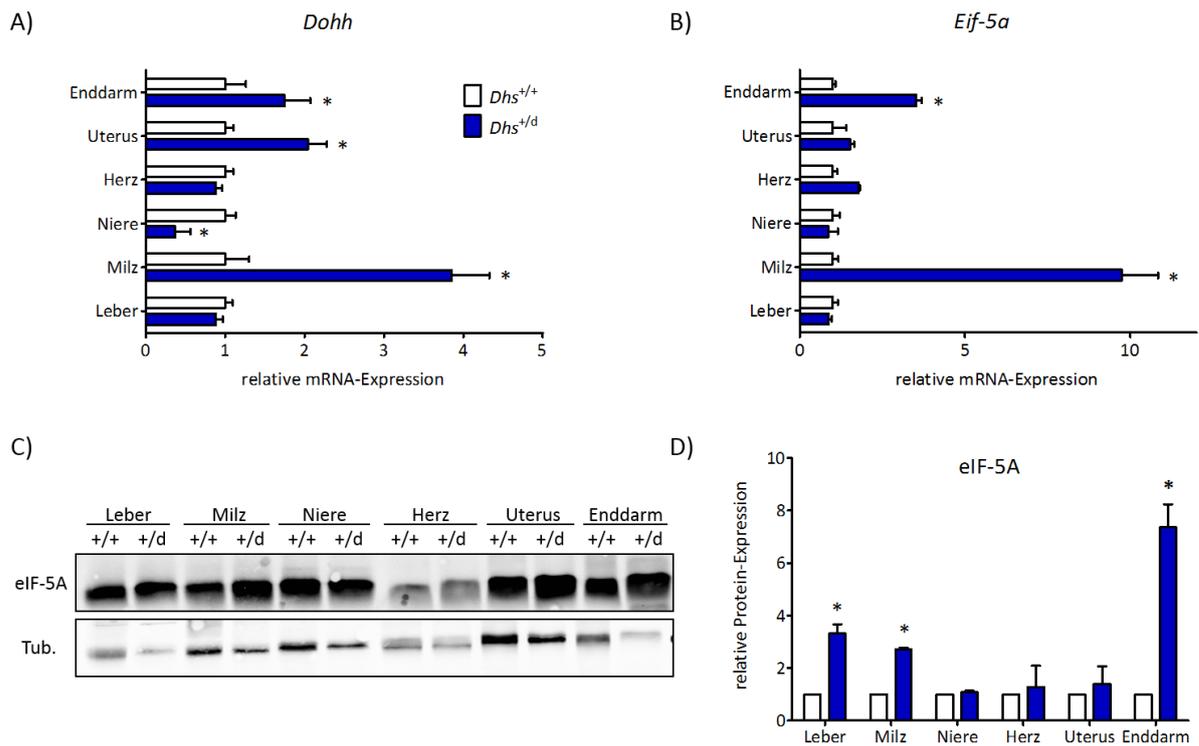
Es wurde getestet, ob das deletierte *Dhs*-Allel tatsächlich zur Expression einer verkürzten *Dhs*-mRNA führte. Dafür wurde eine Oligonukleotid-Kombination verwendet, die zur Amplifikation von Exon 1 bis 8 diente. Dadurch würde nicht nur die Wildtyp- sondern auch die verkürzte mRNA zu einem Produkt führen, das sich in der Größe deutlich vom Wildtyp-Produkt unterscheiden würde (75 bp statt 756 bp). In der Tat war die mutierte *Dhs*-mRNA in allen untersuchten heterozygoten Organen nachweisbar (Abbildung 3-15 B).

Ein verkürztes DHS-Enzym ließ sich im Western Blot dagegen nicht detektieren. Aufgrund der nicht näher eingegrenzten Epitopregion des Antikörpers, lässt sich dadurch allerdings nicht eindeutig die Abwesenheit des mutierten Enzyms beweisen.

Für die genaue Analyse der *Dhs*-mRNA wurden drei verschiedene Oligonukleotid-Kombinationen verwendet um die Wildtyp- und die verkürzte mRNA getrennt und zusammen quantifizieren zu können. Während für die Messung beider Formen ein auch in der verkürzten mRNA enthaltener Bereich und für die ausschließliche Messung der Wildtyp-mRNA ein in der verkürzten mRNA nicht vorhandener Bereich verwendet wurden, erfolgte der Nachweis der mutierten mRNA über ein die Exon 1 - Exon 8-Grenze überspannendes Oligonukleotid.

Es ließ sich eine deutliche Hochregulation der *Dhs*-Gesamtmenge in den heterozygoten Mäusen feststellen. Diese ließ sich auf eine starke Expression der verkürzten und der Wildtyp-mRNA zurückführen (Abbildung 3-15 C-E). Die Wildtyp-mRNA wurde in vielen heterozygoten Geweben stärker als in den Wildtyp-Geweben exprimiert.

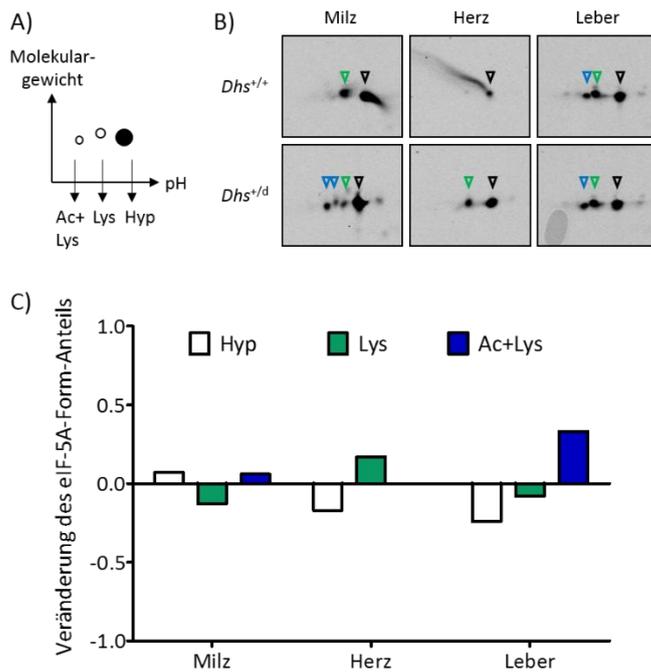
Um zu testen, ob auch die Expression der anderen, vom *Dhs-Knockout* nicht direkt betroffenen Gene des Hypusin-Systems verändert war, wurden die *Eif-5a1*- und *Dohh*-mRNA mittels qPCR quantifiziert. Auch hier zeigte sich in den meisten heterozygoten Organen eine erhöhte Expression, insbesondere in der Milz überstiegen *Eif-5a1*- und *Dohh*-Expression die von Wildtyp-Tieren deutlich (Abbildung 3-16). Der gleiche Trend einer erhöhten Expression in den heterozygoten Tieren zeigte sich für eIF-5A auch auf Proteinebene.



**Abbildung 3-16: Analyse der *Dohh* und *Eif-5a1*-mRNA-Expression in den heterozygoten *Dhs*-Mäusen.** A+B) Die *Dohh*- und *Eif-5a1*-mRNA-Expression wurde mittels qPCR quantifiziert (Referenzgen 18S-rRNA) und jeweils auf die Wildtyp-Expression normiert. In vielen heterozygoten Organen konnte dabei eine verstärkte Expression festgestellt werden. C+D) Auch auf Proteinebene konnte im Western Blot eine verstärkte eIF-5A-Expression nachgewiesen werden. Bei der Quantifizierung diente Tubulin als Referenz, die Expressionswerte wurden anschließend auf die Wildtyp-Organen normiert. Abgebildet ist der Standardfehler des Mittelwerts aus zwei Messungen. Signifikante Abweichungen gegenüber der Wildtyp-Kontrolle sind mit \* gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ). Tub: Tubulin, +: Wildtyp-Allel, d: deletiertes Allel.

Um zu untersuchen, ob die Hypusin-Modifikation von eIF-5A in den heterozygoten Organen weiterhin gewährleistet war, wurde der Modifikationszustand von eIF-5A mittels 2D-Western Blot analysiert. Dabei ließen sich das aktive Hypusin-haltige eIF-5A, der Lysin-haltige eIF-5A-Vorläufer und eine vermutlich acetylierte eIF-5A-Vorläuferform über ihren isoelektrischen Punkt (pI 5,37/5,25/5,1)<sup>115,116</sup> voneinander trennen und mit einem eIF-5A-spezifischen Antikörper detektieren.

Aus den 2D-Western Blot-Analysen wurde ersichtlich, dass es in den heterozygoten Tieren zu einer leichten prozentualen Zunahme der saureren, nicht-Hypusin-haltigen eIF-5A-Formen kam (Abbildung 3-17). Allerdings war unter Berücksichtigung der verstärkten Gesamt-Expression von eIF-5A in diesen Organen (siehe Abbildung 3-16 B-D) weiterhin Hypusin-haltiges eIF-5A vorhanden.



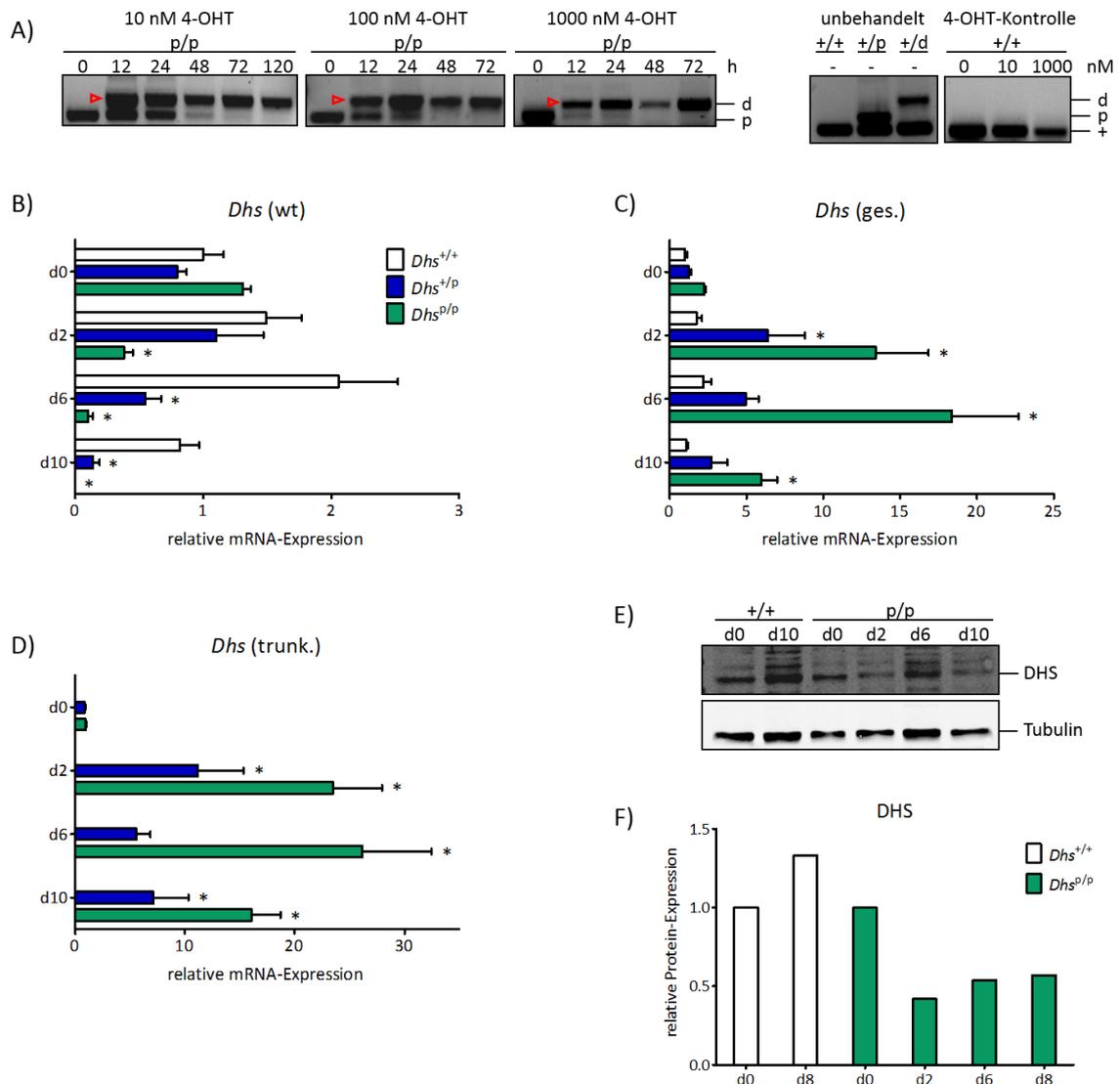
**Abbildung 3-17: Analyse der eIF-5A-Modifikationsformen mittels 2D-Western Blot.** A) Im 2D-Western Blot ließen sich die verschiedenen eIF-5A-Modifikationsformen durch Auftrennung nach Größe und isoelektrischem Punkt voneinander trennen und mit einem gegen eIF-5A-gerichteten Antikörper nachweisen. Neben der Hypusinhaltigen aktiven Form (Hyp, pI 5,37) und dem Lysin-haltigen Vorläuferprotein (Lys, pI 5,25) war unter bestimmten Bedingungen auch eine saurere Form (Ac+Lys, pI 5,1) detektierbar, die vermutlich einer acetylierten Form des eIF-5A-Vorläufers entspricht. B+C) In den heterozygoten Organen war der Anteil an nicht-Hypusinhaltigen eIF-5A-Formen vergrößert. Die Positionskontrolle erfolgte über Aktin. Grünes Dreieck: Lysin-haltige Form, blaues Dreieck: Lysin- und Acetyl-haltige Form, +: Wildtyp-Allel, d: deletiertes Allel.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es in den heterozygoten *Dhs*-KO-Mäusen nicht zu einer reduzierten, sondern einer gesteigerten Expression des *Dhs*-Gens kam. Auch die Expression des zweiten Hypusin-Modifizierungsenzyms DOHH und des Zielproteins eIF-5A war verstärkt. Dadurch kam es nur zu einer leichten Zunahme von nicht-Hypusin-modifiziertem eIF-5A. Die weiterhin vorhandene große Menge an hypusiniertem eIF-5A ist vermutlich der Grund für das Ausbleiben eines Phänotyps bei den heterozygoten *Dhs*-KO-Mäusen.

### 3.2.4 Generierung eines *in vitro* Modells für den induzierten *Dhs*-Knockout

Um die Auswirkungen des *Dhs*-Knockouts auch in Zellkultur untersuchen zu können, wurde ein induzierbares *in vitro* KO-Modell generiert. Dazu wurden gefloxtete *Dhs*-Mäuse mit CAG-cre/Esr1-Mäusen verpaart (siehe Tabelle 3-2) und murine embryonale Fibroblasten (MEFs) an E14,5 gewonnen. Zellen mit den Genotypen  $Dhs^{+/p};CAG\text{-cre}/Esr1^+$  bzw.  $Dhs^{p/p};CAG\text{-cre}/Esr1^+$  wurden für die Induktion des heterozygoten bzw. homozygoten *Dhs*-KOs eingesetzt, Zellen mit  $Dhs^{+/+};CAG\text{-cre}/Esr1^+$ -Genotyp dienten hier als Kontrolle. Durch Zugabe von Tamoxifen wurde der *Dhs*-Knockout induziert und anschließend die Deletion des gefloxteten DNA-Abschnitts überprüft. Der *Knockout* erfolgte effizient und dosisabhängig. Bei 100 nM

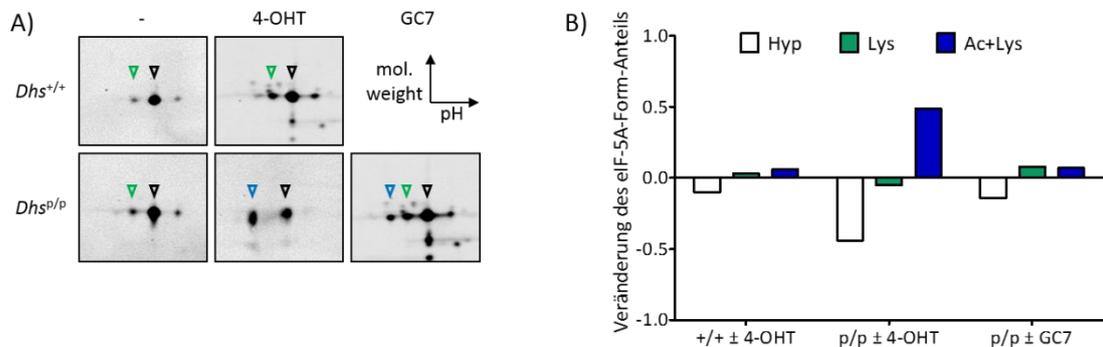
Tamoxifen lag bereits nach zwölf Stunden der überwiegende Anteil als deletiertes Allel vor, nach 48 Stunden war das gefloخته Allel nicht mehr nachweisbar (Abbildung 3-18 A).



**Abbildung 3-18: Induzierter *Dhs*-Knockout *in vitro*.** A) Die Deletion des gefloخته DNA-Abschnitts in den *Dhs*<sup>D/p</sup>;CAG-cre/*Esr1*<sup>+</sup>-Zellen erfolgte nach Tamoxifengabe effizient und dosisabhängig. Bei 100 nM oder 1000 nM Tamoxifen lag nach 48 Stunden ausschließlich das deletierte Allel vor, bei 10 nM Tamoxifen nach 72 Stunden. B-D) Per qPCR wurden die *Dhs*-mRNA-Level im Verlauf der Behandlung mit 100 nM Tamoxifen quantifiziert (Referenzgen 18S-rRNA) und jeweils auf die Wildtyp-Expression bzw. im Fall der verkürzten mRNA auf die Gesamtexpression normiert. Während die Wildtyp-Form (B) nach KO-Induktion erwartungsgemäß abnahm, stieg die Expression der verkürzten mRNA-Form (D) stark an und überlagerte die gemeinsame Messung beider Formen (C). Beim heterozygoten *Dhs*-KO zeigten sich die gleichen Auswirkungen in schwächerer Form. E+F) Auch auf Proteinebene nahm die DHS-Expression nach KO-Induktion deutlich ab. Signifikante Abweichungen gegenüber der Wildtyp-Kontrolle sind mit \* gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ). +: Wildtyp-Allel, p: gefloخته Allel, d: deletiertes Allel, 4-OHT: Tamoxifen.

Erwartungsgemäß sank die *Dhs*-Expression nach Induktion des *Dhs*-KOs ab. Auf mRNA-Ebene war eine starke Abnahme der Wildtyp-Form zu beobachten, die am zehnten Tag nach Behandlungsstart fast vollständig verschwand (Abbildung 3-18 B-D). Dagegen nahm die

Expression der verkürzten mRNA massiv zu, so dass dieser Trend die gemeinsame Messung beider Formen überlagerte. Da die mutierte mRNA nicht zur Bildung des DHS-Enzyms beitragen konnte, sank das DHS-Protein-Level folglich ebenfalls ab (Abbildung 3-18 E+F).



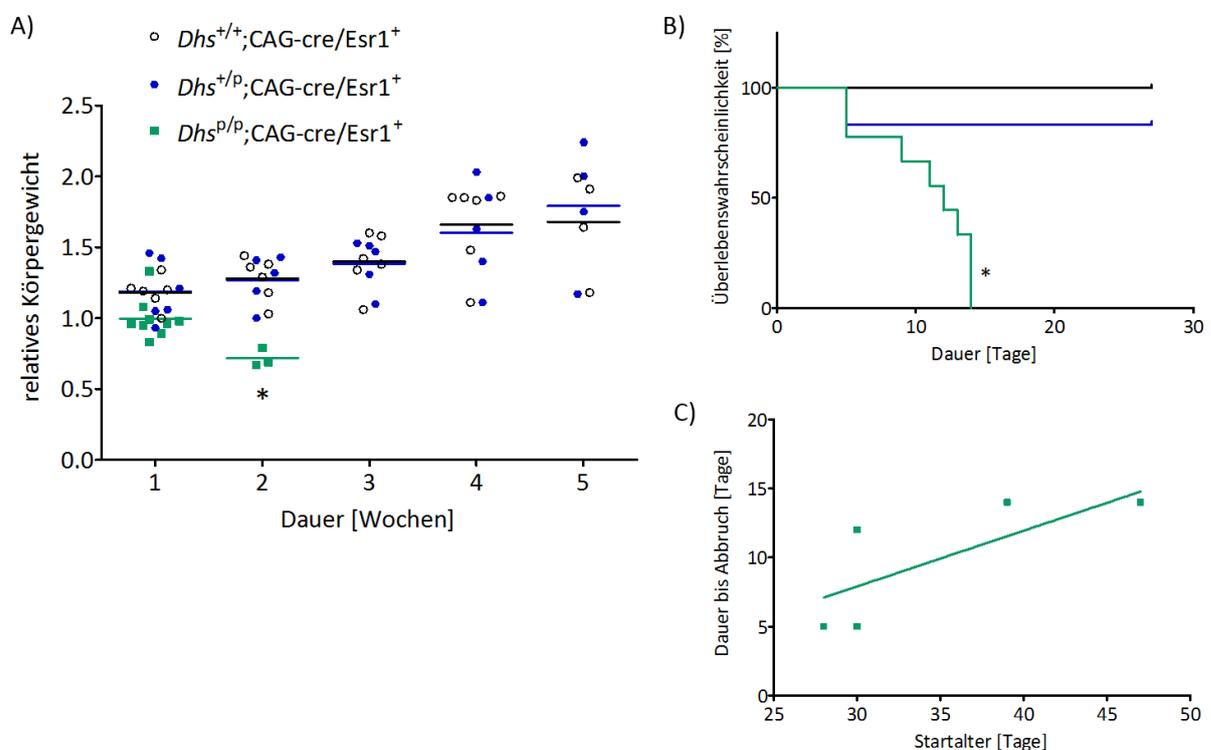
**Abbildung 3-19: Analyse der eIF-5A-Modifikationsform nach Induktion des *Dhs*-Knockouts *in vitro*.** Per 2D-Western Blot mit einem eIF-5A-spezifischen Antikörper wurden die Auswirkungen des Tamoxifen-induzierten *Dhs*-Knockouts (100 nm, 8 Tage) und der GC7-vermittelten DHS-Inhibition (50  $\mu$ M für 48 Stunden) auf die Hypusin-Modifikation von eIF-5A untersucht. Während es in den Kontrollzellen zu kaum einer Veränderung nach Tamoxifengabe kam, änderte sich das Muster nach induziertem *Dhs*-KO massiv. Der Anteil der Hypusin-haltigen aktiven eIF-5A-Form war um etwa 44% reduziert, stattdessen lag eIF-5A als acetylierte Vorläuferform vor. Der nur Lysin-haltige eIF-5A-Vorläufer konnte dagegen nach *Dhs*-KO nicht detektiert werden, so dass sich das *Dhs*-KO-Muster deutlich von der Inhibition mit GC7 unterschied, bei der der Lysin-haltige und der acetylierte Vorläufer etwa zu gleichen Teilen auftraten. +: Wildtyp-Allel, p: gefloxtes Allel, 4-OHT: Tamoxifen, Hyp/schwarzes Dreieck: Hypusin-haltige Form, Lys/grünes Dreieck: Lysin-haltige Form, Ac+Lys/blaus Dreieck: Lysin- und Acetyl-haltige Form.

Die reduzierte DHS-Enzymmenge reichte nicht aus, um die Hypusin-Modifikation im gleichen Ausmaß beizubehalten. Während in den Kontrollzellen unter Tamoxifen kaum eine Veränderung der eIF-5A-Modifikationsformen auftrat, war der Anteil der Hypusin-haltigen eIF-5A-Form acht Tage nach Induktion des *Dhs*-Knockouts um knapp 50% reduziert (Abbildung 3-19). Es kam es zu einer massiven Verschiebung zum acetylierten eIF-5A-Vorläufer. Der nicht-acetylierte Lysin-haltige eIF-5A-Vorläufer war dagegen nicht zu detektieren. Damit unterschied sich das Muster nach *Dhs*-KO deutlich von der DHS-Inhibition durch GC7, bei der sowohl der Lysin-haltige als auch der acetylierte eIF-5A-Vorläufer angereichert wurden.

Mit den generierten *Dhs*<sup>p/p</sup>;CAG-cre/*Esr1*<sup>+</sup>-MEFs wurde also ein effizientes Modell für die *in vitro* Untersuchung des induzierten *Dhs*-Knockouts geschaffen. Der *Knockout* konnte über Tamoxifengabe schnell und vollständig induziert werden, so dass es zu einer massiven Abnahme der *Dhs*-Expression und folglich zu einer stark verminderten Hypusin-Modifikation von eIF-5A kam, wobei interessanterweise nicht der Lysin-haltige, sondern der acetylierte eIF-5A-Vorläufer angereichert wurde.

### 3.2.5 Der induzierte *Dhs-Knockout* ist in juvenilen Tieren frühzeitig letal

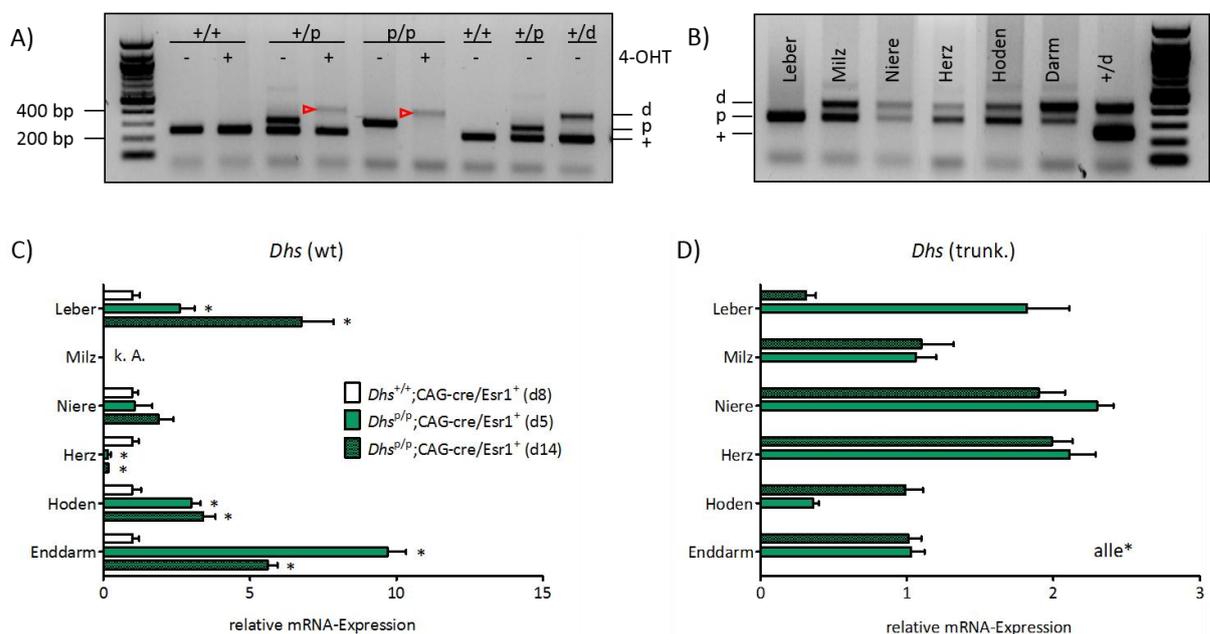
Um trotz der embryonalen Letalität des *Dhs-Knockouts* die Bedeutung dieses Gens nach der Embryonalentwicklung untersuchen zu können, wurde durch Verpaarung der geflochtenen Mäuse mit einer induzierbaren Cre-Mauslinie eine induzierbare Deletion des *Dhs*-Gens ermöglicht (siehe 3.1.5.2). Vier bis sieben Wochen alte Geschwistertiere mit den Genotypen *Dhs<sup>p/p</sup>;CAG-cre/Esr1<sup>+</sup>* (n=9), *Dhs<sup>+/p</sup>;CAG-cre/Esr1<sup>+</sup>* (n=6) und *Dhs<sup>+/+</sup>;CAG-cre/Esr1<sup>+</sup>* (n=6) wurden für bis zu zwei Wochen mit Tamoxifen-haltigem Futter (400 mg/kg Futter) gefüttert und engmaschig beobachtet.



**Abbildung 3-20: Körpergewichtsentwicklung und Überleben nach *Dhs-Knockout*-Induktion.** A) Nach Start der Tamoxifengabe nahmen die Mäuse mit homozygot gefloxtem *Dhs*-Allel (*Dhs<sup>p/p</sup>;CAG-cre/Esr1<sup>+</sup>*, n=9) massiv ab, während sich die heterozygot geflochtenen und Wildtyp-Tiere (*Dhs<sup>+/p</sup>;CAG-cre/Esr1<sup>+</sup>* und *Dhs<sup>+/+</sup>;CAG-cre/Esr1<sup>+</sup>*, jeweils n=6) normal weiter entwickelten. B) Im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren verschlechterte sich der Gesundheitszustand aller neun homozygot geflochtenen Tiere so stark, dass das Experiment zwischen Tag 5 und Tag 14 beendet werden musste. Nur bei einer von sechs heterozygot geflochtenen Mäusen musste der Versuch vorzeitig beendet werden (Tag 5). C) Die Dauer bis zur Beendigung des Experiments korrelierte bei den homozygot geflochtenen Böcken mit dem Alter zu Beginn der Tamoxifen-Behandlung (Korrelationskoeffizient: 0,79). Signifikante Abweichungen gegenüber der Wildtyp-Kontrolle sind mit \* gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ). +: Wildtyp-Allel, p: gefloxtes Allel.

Während sich die Kontrolltiere mit Wildtyp-*Dhs*-Allel normal weiterentwickelten, kam es in den Tieren mit homozygot gefloxtem *Dhs*-Allel nach Induktion des *Knockouts* zu drastischen

Auswirkungen (Abbildung 3-20). Die Tiere nahmen nicht weiter zu, das Körpergewicht sank innerhalb von zwei Wochen um durchschnittlich 30%. Aufgrund des schlechten Gesundheitszustandes musste der Versuch bei allen homozygot geflochten Mäusen zwischen Tag 5 und Tag 14 nach Start der Tamoxifenbehandlung beendet werden. Der Abbruchszeitpunkt korrelierte bei den homozygot geflochten Böcken mit dem Alter zu Beginn der Tamoxifen-Behandlung (Korrelationskoeffizient: 0,79). Das Körpergewicht der heterozygoten Tiere entwickelte sich dagegen normal, nur bei einer von sechs Mäusen musste der Versuch aufgrund des Gesundheitszustandes an Tag 5 beendet werden.

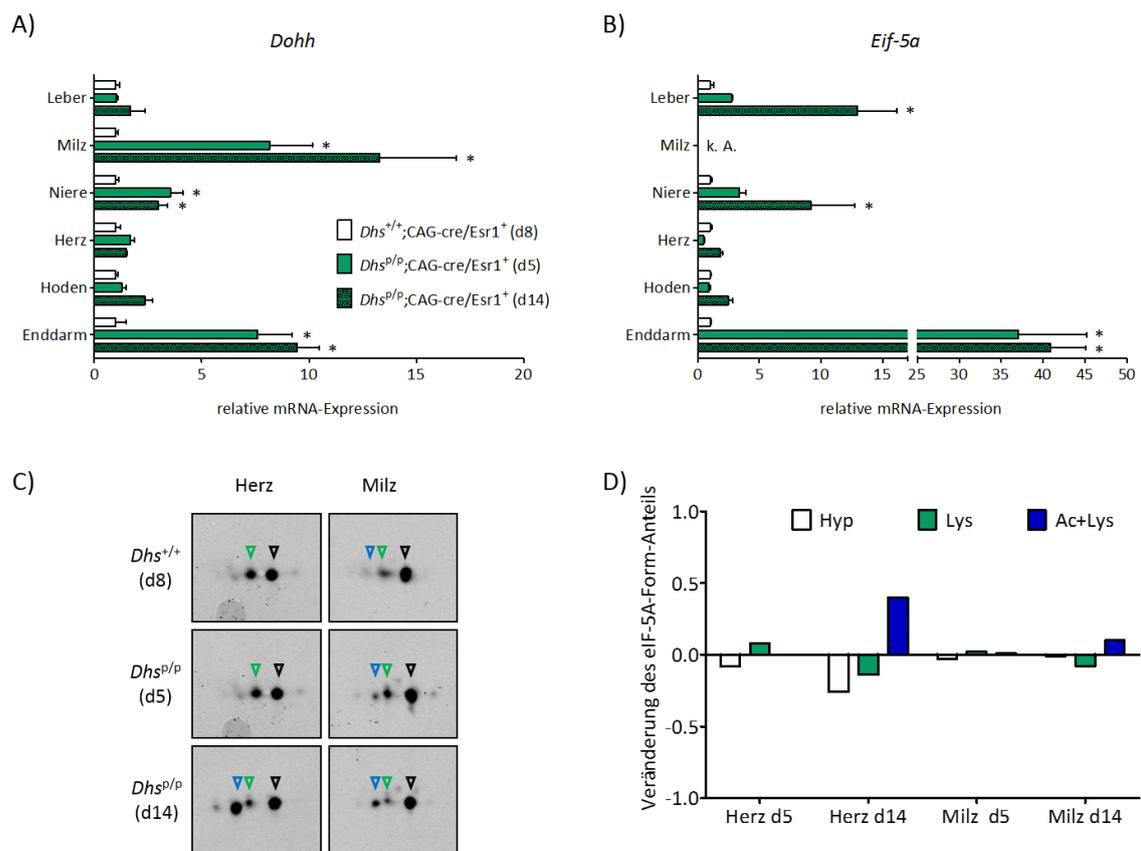


**Abbildung 3-21: Überprüfung des *Dhs*-Knockouts und Expressionsanalyse nach Tamoxifengabe.** A) Unter Tamoxifenbehandlung ließ sich an Tag 5 in den Schwanzspitzenbiopsien der geflochten Mäuse das deletierte *Dhs*-Allel (rotes Dreieck) nachweisen, während das geflochte Allel verschwunden war. B) Mit Ausnahme der Leber war auch in allen untersuchten Organen der geflochten Mäuse das deletierte *Dhs*-Allel an Tag 5 nachweisbar. Das geflochte Allel war hier jedoch im Gegensatz zu den Befunden aus den Schwanzspitzenbiopsien weiterhin vorhanden und der *Knockout* damit nicht vollständig. C+D) Die *Dhs*-Expression wurde mittels qPCR quantifiziert (Referenzgen 18S-rRNA) und jeweils auf die Wildtyp-Expression bzw. im Fall der verkürzten mRNA auf die Gesamtexpression normiert. Dabei zeigte sich auf mRNA-Ebene nach Tamoxifengabe in den meisten Organen der geflochten Tiere eine verstärkte *Dhs*-Expression, die auf die Wildtyp-Form (C) und die verkürzte Form (D) zurückzuführen war. Signifikante Abweichungen gegenüber der Wildtyp-Kontrolle sind mit \* gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ). +: Wildtyp-Allel, p: geflohtes Allel, k. A.: keine Angabe.

Die genomische DNA der homozygot geflochten Tiere wurde per PCR auf die gewünschte Deletion des *Dhs*-Gens überprüft. Mit Ausnahme der Leber konnte in allen untersuchten Organen das deletierte *Dhs*-Allel detektiert werden (Abbildung 3-21). Während das geflochte Allel in den Schwanzspitzen an Tag 5 nicht mehr nachweisbar und damit der *Knockout*

vollständig war, konnte das gefloخته Allel weiterhin in allen untersuchten Organen gefunden werden. Auch an Tag 14 war das gefloخته Allel hier noch nachweisbar.

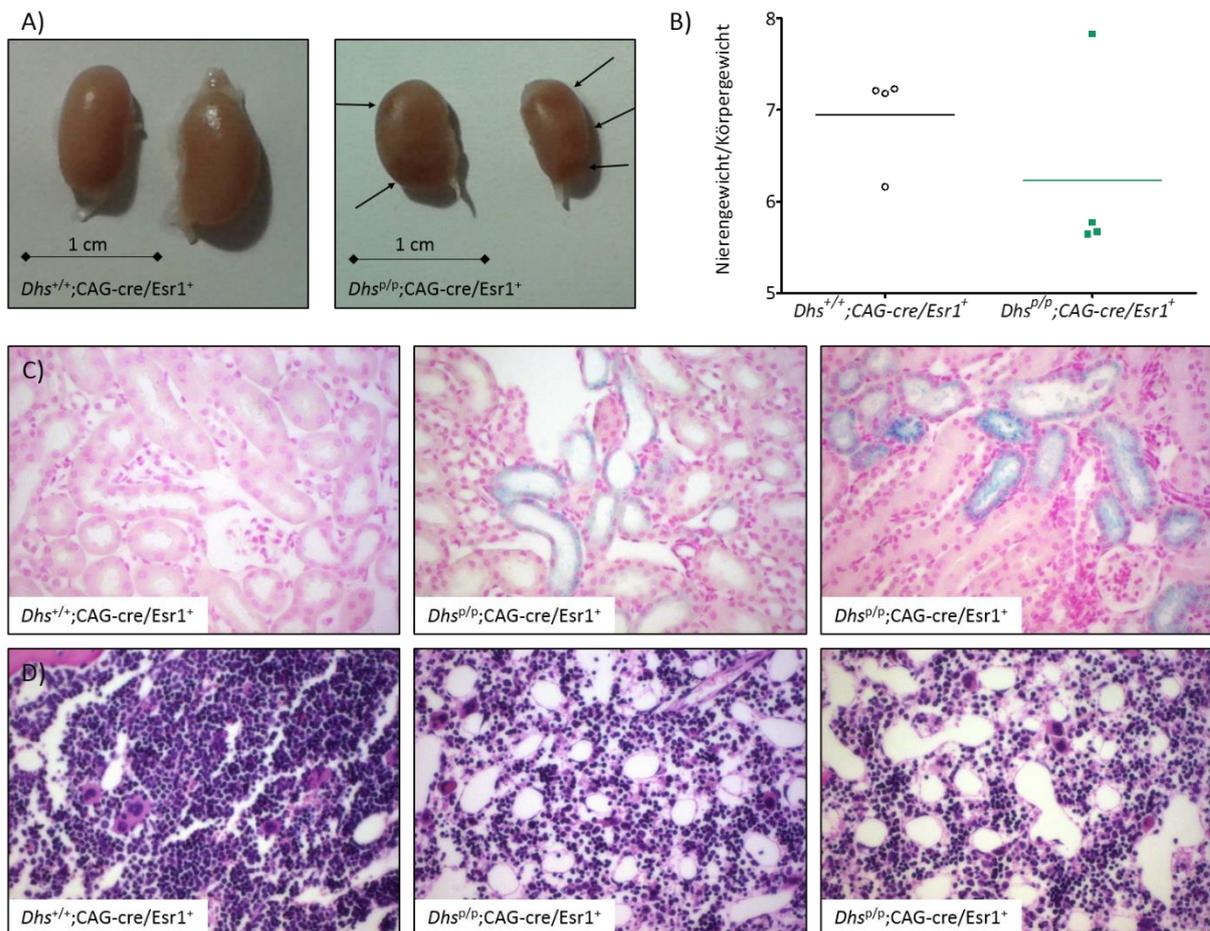
Die unvollständig erfolgte Deletion in den untersuchten Organen war auch auf mRNA-Ebene sichtbar. Wie beim konstitutiven heterozygoten *Dhs-Knockout* (siehe 3.2.3) ließ sich hier keine reduzierte, sondern eine gesteigerte *Dhs*-Expression in Leber, Hoden und Enddarm beobachten, die sowohl die verkürzte als auch die Wildtyp-mRNA umfasste. Nur im Herz zeigte sich eine deutliche Abnahme der Wildtyp-*Dhs*-mRNA.



**Abbildung 3-22: Einfluss des induzierten *Dhs-Knockouts* auf die Hypusin-Modifikation von eIF-5A.** A+B) Per qPCR wurden die *Dohh*- und *Eif-5a1*-mRNA-Level quantifiziert (Referenzen 18S-rRNA) und jeweils auf die Wildtyp-Expression normiert. Dabei konnte nach Tamoxifengabe in mehreren Organen eine verstärkte Expression der *Dohh*- und *Eif-5a1*-mRNA festgestellt werden. C+D) Per 2D-Western Blot mit einem eIF-5A-spezifischen Antikörper wurde der Einfluss auf die eIF-5A-Modifikationsformen untersucht. Nach Induktion des *Knockouts* kam es in der Milz zu einer leichten und im Herz zu einer deutlichen prozentualen Verschiebung vom hypusinierten eIF-5A hin zur acetylierten Lysin-haltigen eIF-5A-Form. Signifikante Abweichungen gegenüber der Wildtyp-Kontrolle sind mit \* gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ). +: Wildtyp-Allel, p: gefloخته Allel, k. A.: keine Angabe, Hyp/schwarzes Dreieck: Hypusin-haltige Form, Lys/grünes Dreieck: Lysin-haltige Form, Ac+Lys/blaus Dreieck: Lysin- und Acetyl-haltige Form.

Auch die Expression der *Dohh*- und *Eif-5a1*-mRNA war in den meisten Geweben der homozygot gefloختen *Dhs*-Mäuse nach *Knockout*-Induktion durch Tamoxifengabe deutlich erhöht (Abbildung 3-22). Das Muster der eIF-5A-Modifikationsformen zeigte in der Milz eine

leichte, im Herz eine deutliche Verschiebung hin zu den nicht-Hypusin-modifizierten eIF-5A-Vorläufern. Am 14. Tag der Tamoxifenbehandlung war insbesondere der acetylierte eIF-5A-Vorläufer angereichert, es lag aber weiterhin viel hypusiniertes eIF-5A vor.



**Abbildung 3-23: Untersuchung der Niere und des Knochenmarks nach Induktion des *Dhs*-Knockouts.** A) Die Nieren von drei von vier homozygoten *Knockout*-Tieren wiesen makroskopisch sichtbare Einblutungen auf (Pfeile). B) Das auf das höchste gemessene Körpergewicht bezogene Nierengewicht war bei den homozygoten *Knockout*-Böcken deutlich reduziert. Gezeigt sind das relative Gewicht jeder Niere von jeweils zwei Tieren und der Mittelwert. Bei den  $Dhs^{p/p}$ -Tieren wurden jeweils ein Tier mit und ein Tier ohne sichtbare Einblutungen untersucht. C) Mit der Turnbull-Färbung konnten Eisenablagerungen in den Nieren von drei von vier KO-Tiere nachgewiesen werden, gezeigt sind ein Wildtyp- und zwei KO-Gewebe. D) Die Übersichtsfärbung des Knochenmarks zeigte nach induziertem *Dhs*-KO vermehrt Hohlräume, die vermutlich von Fettzellen stammen. Gezeigt sind ein Wildtyp- und zwei KO-Gewebe. +: Wildtyp-Allel, p: gefloxtes Allel.

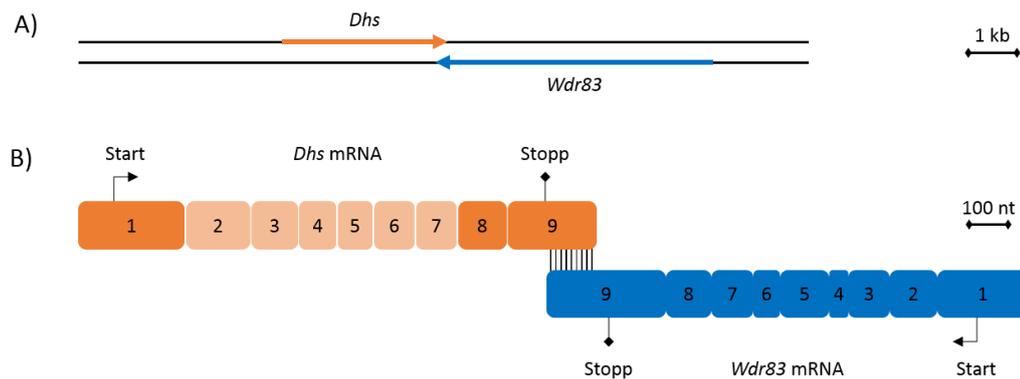
Um herauszufinden, worauf der starke Phänotyp der homozygot gefloxten Tiere nach KO-Induktion basierte, wurden verschiedenste Organe (Leber, Milz, Niere, Knochenmark, Herz, Darm, Lunge, Pankreas, Knochen und Muskel) auf histologische Veränderungen gegenüber der Wildtyp-Kontrollgruppe untersucht. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ergab einen histologisch unauffälligen Befund für die meisten Organe. Bei drei von vier untersuchten homozygoten *Knockout*-Tieren wiesen die Nieren im Gegensatz zu der Kontrollgruppe

makroskopisch sichtbare Einblutungen auf, die mit einer Turnbull-Färbung bestätigt werden konnten (Abbildung 3-23). Das relative Nierengewicht der *Knockout*-Tiere war zudem deutlich reduziert. Im Knochenmark waren vermehrt Hohlräume sichtbar, die vermutlich bei der Präparation herausgelöste Fettvakuolen von Fettzellen darstellen und auf eine Erhöhung des Fettanteils im Knochenmark hinweisen.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die Expression eines funktionellen DHS-Enzyms auch nach der Embryonalentwicklung eine essentielle Rolle spielte. Sein homozygoter Verlust war nach sehr kurzer Zeit letal, der heterozygote Verlust hatte dagegen kaum Auswirkungen. Die meisten untersuchten Organe zeigten einen noch unvollständigen *Knockout* und eine gesteigerte Expression der Gene des Hypusin-Systems, so dass die Hypusin-Modifikation von eIF-5A partiell aufrechterhalten werden konnte. Die Erhöhung des Fettanteils im Knochenmark deutet auf eine Schädigung der blutbildenden Zellen des Knochenmarks hin. Einblutungen in der Nieren könnten Zeichen einer Blutgerinnungsstörung sein und lassen auf daraus resultierendem Nierenversagen als Todesursache schließen.

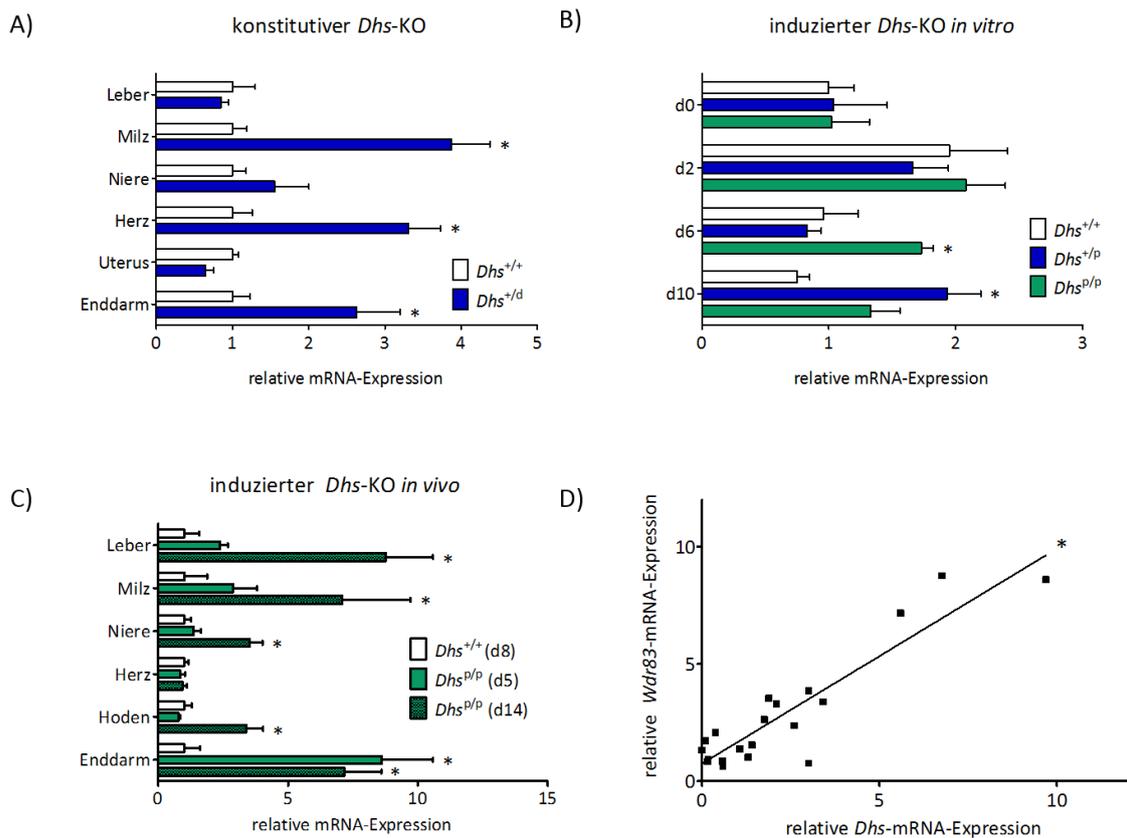
### 3.2.6 Die *Dhs*-Expression korreliert mit der *Wdr83*-Expression

Um zu überprüfen, ob der *Dhs-Knockout* einen Einfluss auf die Expression des benachbarten *Wdr83*-Gens hatte, wurde dessen Expression unter *Dhs-Knockout*-Bedingungen untersucht. *Wdr83* und *Dhs* liegen gegenläufig auf Chromosom 8 und überlappen mit ihren 3'-Enden, so dass ihre mRNAs in der 3'-UTR einen homologen Abschnitt von 128 nt enthalten (Abbildung 3-24). Durch den *Knockout* der *Dhs*-Exons 2 bis 7 war das *Wdr83*-Gen also nicht betroffen und auch die verkürzte *Dhs*-mRNA enthielt weiterhin den homologen Abschnitt in der 3'-UTR. Da es durch den *Dhs-Knockout* aber zu einer veränderten *Dhs*-Expression kam (siehe 3.2.3 bis 3.2.5) und im humanen System gezeigt werden konnte, dass sich die *Dhs*- und *Wdr83*-Expression bidirektional durch mRNA-Stabilisation beeinflussen<sup>117</sup>, sollte die Auswirkung des *Dhs*-KOs auf *Wdr83* untersucht werden.



**Abbildung 3-24: Genstruktur von *Wdr83* und *Dhs*.** A) Auf Chromosom 8 befindet sich das *Dhs*-Gen auf dem „Vorwärts“-Strang und überlappt am 3'-Ende mit dem *Wdr83*-Gen, das auf dem „Rückwärts“-Strang liegt. B) Dadurch weisen die 3'-UTR der *Dhs* und *Wdr83*-mRNA eine 128 nt lange homologe Region auf. Vom *Knockout* des *Dhs*-Gens (Exon 2 bis 7) ist dieser Bereich nicht betroffen.

Bei der Analyse der *Wdr83*-Expression auf mRNA-Ebene ließ sich beobachten, dass tendenziell in den Organen, mit durch hetero- oder homozygoten *Dhs-Knockout* vermehrter *Dhs*-Expression, auch *Wdr83* verstärkt exprimiert wurde (Abbildung 3-25). So zeigten insbesondere einige konstitutiv heterozygote und viele induziert homozygote Organe eine deutliche Anreicherung der *Wdr83*-mRNA. Bei einer Korrelationsanalyse konnte eine positive lineare Korrelation zwischen der *Wdr83*- und der *Dhs*-Expression festgestellt werden. Dieser Effekt galt für die Gesamtexpression von *Dhs* (verkürzte und Wildtyp-mRNA, Korrelationskoeffizient: 0,68), stärker aber für die Expression der Wildtyp-*Dhs*-mRNA (Korrelationskoeffizient: 0,91). Dies erklärt die geringere Veränderung der *Wdr83*-Expression im Fall des induzierten *in vitro-Knockouts*, bei dem die Wildtyp-*Dhs*-mRNA massiv abnahm während die verkürzte mRNA sehr stark exprimiert wurde.



**Abbildung 3-25: Analyse der *Wdr83*-Expression beim hetero- und homozygoten *Dhs*-Knockout.** A-C) Per qPCR wurden die *Wdr83*-mRNA-Expression quantifiziert (Referenzen 18S-rRNA) und jeweils auf die Wildtyp-Expression normiert. Sowohl beim konstitutiv heterozygoten (A), beim induzierten *in vitro* (B) als auch beim induzierten *in vivo* *Dhs*-KO (C) konnte in vielen Fällen eine verstärkte *Wdr83*-Expression festgestellt werden. D) Die Expression von *Wdr83* korrelierte dabei stark mit der Expression der Wildtyp-*Dhs*-mRNA (Korrelationskoeffizient: 0,91; Wahrscheinlichkeit: 1,0). Signifikante Abweichungen gegenüber der Wildtyp-Kontrolle bzw. signifikante Korrelationen sind mit \* gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ). +: Wildtyp-Allel, p: gefloxtes Allel, d: deletiertes Allel.

Obwohl der *Dhs*-Knockout zu keiner Veränderung des benachbarten *Wdr83*-Gens führte, beeinflusste er trotzdem dessen Expression. In Organen mit durch den *Knockout* erhöhter *Dhs*-Expression war tendenziell auch die *Wdr83*-Expression erhöht, zwischen der mRNA-Expression beider Gene bestand ein positiver linearer Zusammenhang.

## 3.3 Etablierung und Analyse einer konditionalen *Eif-5a2*-*Knockout*-Mauslinie

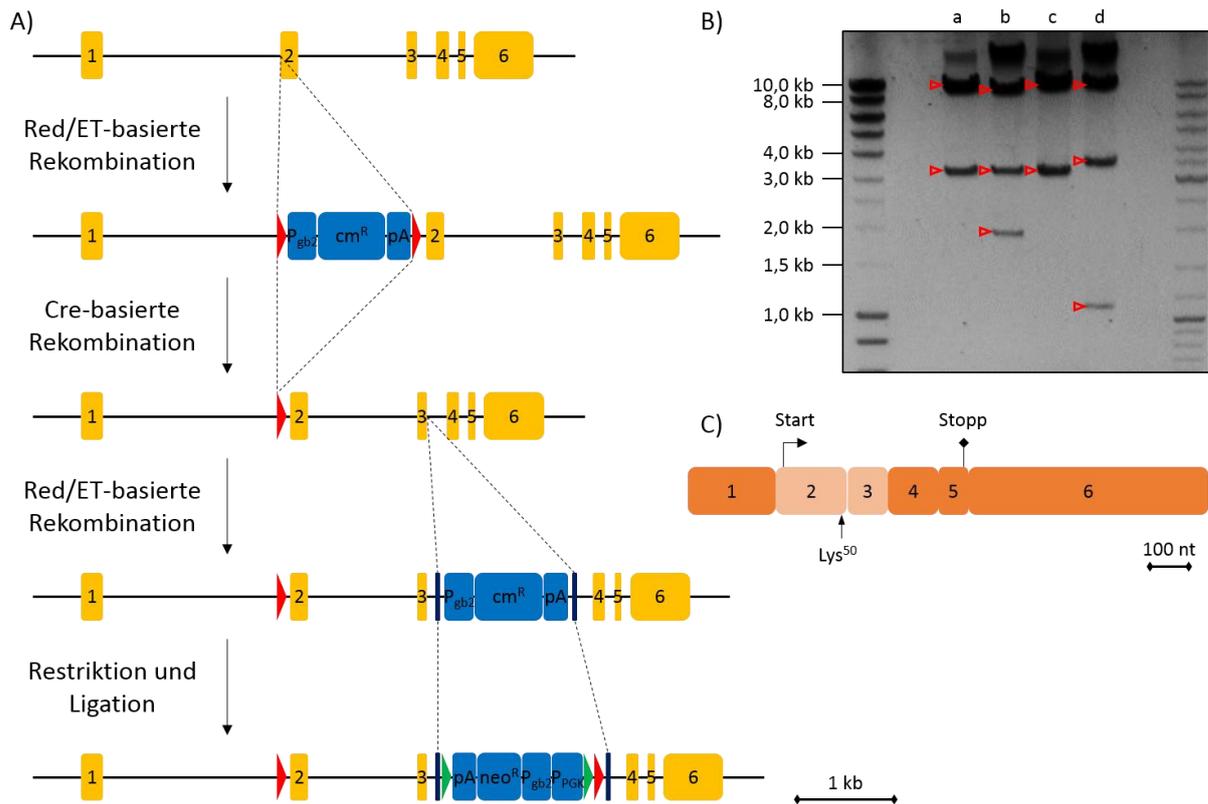
Um die Rolle von eIF-5A2 besser zu verstehen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine konditionale *Knockout*-Mauslinie für das *Eif-5a2*-Gen etabliert und der konstitutive hetero- und homozygote *Eif-5a2*-Verlust im Mausmodell untersucht.

### 3.3.1 Vorarbeiten

#### 3.3.1.1 KO-Strategie und Generierung eines *Targeting Vectors* für *Eif-5a1*

Um einen *Knockout* des *Eif-5a1*-Gens zu erzielen, sollten die Exons 2 und 3 deletiert werden (Abbildung 3-26 C). Diese kodieren neben dem Startcodon auch die Aminosäure Lys<sup>50</sup>, die zu Hypusin umgewandelt wird und daher eine entscheidende Rolle spielt. Von den verbleibenden Exons 1 und 4 bis 6 kann höchstens ein stark verkürztes Protein ab Met<sup>141</sup> gebildet werden (14 AS statt 154 AS) oder ein im Leseraster mutiertes Protein, so dass in jedem Fall von einem vollständigen Funktionsverlust auszugehen ist.

Die Klonierung des *Targeting Vectors* für *Eif-5a1* erfolgte analog zur Klonierung des *Targeting Vectors* für *Dhs* (3.1.2) und wird an dieser Stelle nur kurz beschrieben. Zunächst wurde das *Eif-5a1*-Gen samt seiner genomischen Umgebung (insgesamt 9,5 kb) zur besseren Handhabung aus dem BAC RP23-172M21 in den Minimalvektor pStart-K überführt. Über Rekombinations-basiertes Klonieren wurden nun die Modifikationen ins *Eif-5a1*-Gen eingeführt. Über eine Zwischenstufe mit gefloxter Chloramphenicol-Resistenzkassette wurde das erste loxP-Element vor Exon 2 inseriert. Die Insertion des zweiten loxP-Elements und der Neomycin-Resistenzkassette nach Exon 3 erfolgte über einen Chloramphenicol-Resistenzkassetten-Zwischenschritt mit Restriktionsverdau und Ligation (Abbildung 3-26 A). Korrekte Klone wurden jeweils über Antibiotika-Selektion und Restriktionsanalyse identifiziert (Abbildung 3-26 B). Zuletzt wurde das modifizierte *Eif-5a1*-Gen in den Vektor pWS-TK6 überführt und durch Sequenzierung und Cre-vermittelte Test-Deletion überprüft.



**Abbildung 3-26: Klonierungsschritte für die Generierung eines konditionalen *Eif-5a1*-Knockouts.** A) Das im Minimalvektor vorliegende *Eif-5a1*-Gen wurde mittels Rekombinations-basiertem Klonierens modifiziert. Das erste loxP-Element (rotes Dreieck) wurde über die Insertion einer geflochtenen Chloramphenicol-Resistenzkassette (blau) und anschließende Deletion eingeführt. Das zweite loxP-Element und die Neomycin-Resistenzkassette wurden über die Insertion einer mit spezifischen Restriktionsschnittstellen (dunkelblau) versehenen Chloramphenicol-Resistenzkassette, anschließender Restriktion und Ligation mit einer von FRT-Elementen (grüne Dreiecke) flankierten Neomycin-Resistenzkassette (blau) mit endständigem loxP-Element eingebracht. B) Per Restriktionsanalyse mit Spel wurden die erhaltenen Klone auf die gewünschten Modifikationen untersucht. Abgebildet sind als korrekt identifizierte Klone nach den verschiedenen Schritten. a: Subklonierung des *Eif-5a1*-Gens aus dem BAC in den Minimalvektor pStart-K (9 kb, 3,2 kb), b: Einführung der geflochtenen Resistenzkassette vor Exon 2, c: Cre-basierte Deletion der geflochtenen Resistenzkassette, d: Insertion der von Schnittstellen flankierten Resistenzkassette hinter Exon 3. C) Mit dem hergestellten *Eif-5a1*-Targeting Vector sollte ein konditionaler *Knockout* der Exons 2 und 3 (heller dargestellt) erfolgen. Durch das Fehlen der Bereiche, die das Startcodon sowie Lys<sup>50</sup> kodieren, entstünde ein vollständiger Funktionsverlust des *Eif-5a1*-Gens. P<sub>gb2</sub>: prokaryotischer Promotor, cm<sup>R</sup>: Chloramphenicol-Resistenzgen, pA: Polyadenylierungssignal neo<sup>R</sup>: Neomycin-Resistenzgen, P<sub>PGK</sub>: eukaryotischer Promotor.

Der fertige *Targeting Vector* wurde linearisiert, aufgereinigt und durch Elektroporation in die ES-Zelllinie IDG3.2 eingebracht. Stabil transfizierte Zellen wurden mit G418 selektiert und 288 ES-Zellklone isoliert. Bei der Überprüfung der Sequenz-spezifischen Insertion der Modifikationen mittels Southern Blot wiesen zwar einige Klone neben der Wildtyp-Bande (12,9 kb) eine zweite Bande richtiger Größe (9,8 kb) auf, die allerdings deutlicher schwächer war und nicht bestätigt werden konnte.

### 3.3.1.2 Vorarbeiten für die konditionale *Eif-5a2-Knockout*-Mauslinie

Da zwischenzeitlich der konstitutive *Eif-5a1-Knockout* publiziert wurde<sup>118</sup>, während der *Knockout* der anderen Isoform *Eif-5a2* noch gänzlich unbekannt war und zeitgleich ein ES-Zellklon mit konditionalem *Eif-5a2*-Allel und C57BL/6-Hintergrund im Rahmen des *European Conditional Mouse Mutagenesis Program* (EUCOMM) zur Verfügung stand, wurde im Folgenden mit einer aus diesem ES-Zellklon abgeleiteten *Eif-5a2-Knockout*-Mauslinie weitergearbeitet.

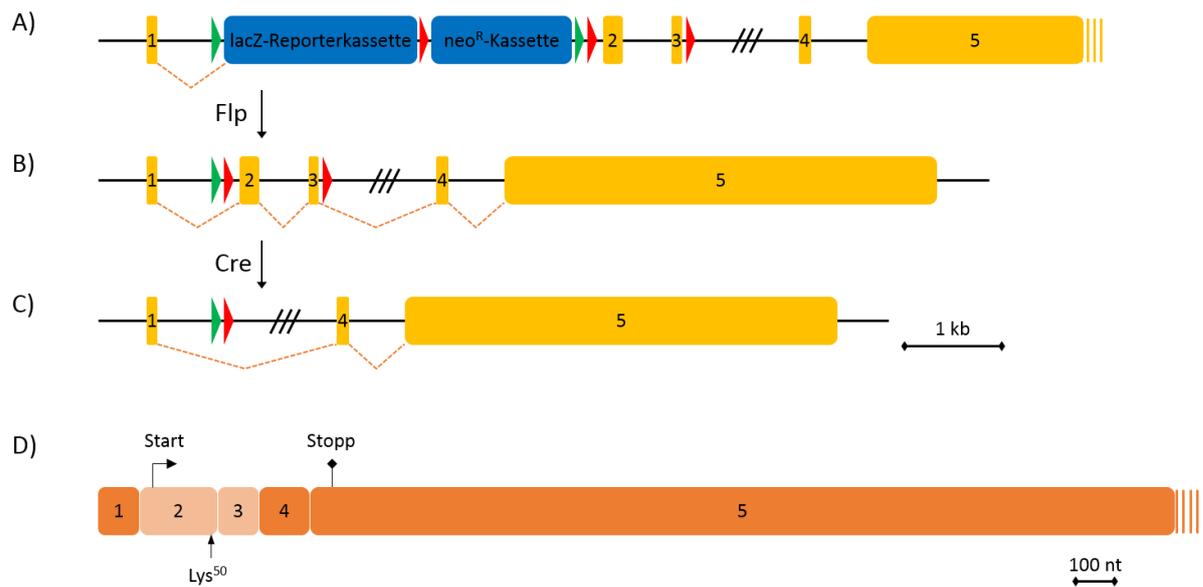
Analog zur Herstellung der *Dhs-Knockout*-Mauslinie wurde von Herrn Dipl.-Biol. Michael Preukschas der erhaltene ES-Zellklon auf die korrekte Integration der eingeführten Elemente überprüft, in Embryonen der Linie C57BL/6 injiziert und diese in Ammen implantiert. Die daraus entstandenen chimären Böcke wurden mit C57BL/6-Weibchen verpaart und die Nachkommen auf das modifizierte *Eif-5a2*-Allel getestet, wobei eine Keimbahntransmission detektiert werden konnte<sup>98</sup>.

## 3.3.2 Etablierung der konditionalen *Eif-5a2-Knockout*-Mauslinie

### 3.3.2.1 *Knockout*-Strategie für das *Eif-5a2*-Gen nach EUCOMM

Bei dem von EUCOMM modifizierten *Eif-5a2*-Allel handelt es sich ebenfalls um ein *Knockout first*-Allel (siehe 3.1.3.2). Durch Flp-basierte Deletion der lacZ-Reporter- und Neomycin-Resistenzkassette entsteht daraus ein gefloxtes Allel, das für die konditionale Cre-basierte Deletion der Exons 2 und 3 verwendet werden kann (Abbildung 3-27).

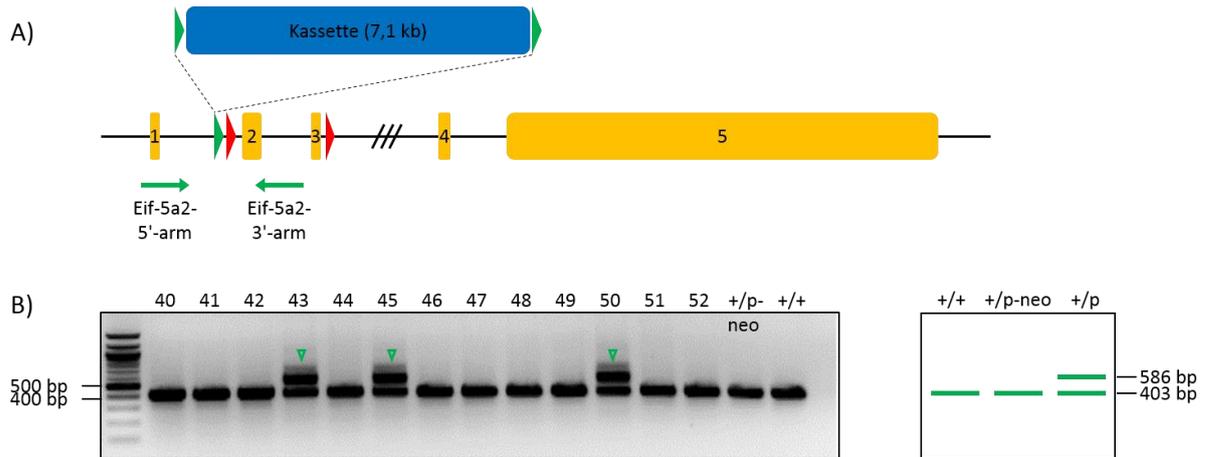
Durch eine Deletion der Exons 2 und 3 fehlen dem *Eif-5a2*-Gen Bereiche, die das Startcodon sowie die Aminosäure Lys<sup>50</sup> kodieren, die die entscheidende Hypusin-Modifikation trägt. Zwar könnte ein verkürztes Protein ab Met<sup>138</sup> gebildet werden (16 AS statt 153 AS) oder ein Protein mit Mutation des Leserasters, in jedem Fall ist aber von einem vollständigen Funktionsverlust des Proteins auszugehen.



**Abbildung 3-27: Knockout-Strategie für das *Eif-5a2*-Gen.** Aus dem *Knockout first*-Allel (A) mit von loxP-Elementen (rotes Dreieck) flankierten Exons 2 und 3 und von FRT-Elementen (grünes Dreieck) flankierter lacZ-Reporter- und Neomycin-Resistenzkassette (blau) wird durch Flp-basierte Deletion das gefloxtes *Eif-5a2*-Allel (B). Dieses kann zur Cre-basierten Deletion der Exons 2 und 3 eingesetzt werden (C). Dadurch fehlen der mRNA (D) Bereiche (heller dargestellt), die das Startcodon sowie die Aminosäure Lys<sup>50</sup> kodieren, so dass es zu einem vollständigen Funktionsverlust des *Eif-5a2*-Gens kommt. neo<sup>R</sup>: Neomycin-Resistenzgen, Intron 3-4 ist zu 10%, die Kassetten und Exon 5 in A und D sind zu 50% ihrer eigentlichen Größe dargestellt.

### 3.3.2.2 Entfernung der Resistenzkassette

Um das *Knockout first*-Allel in ein gefloxtes Allel zu überführen, wurden die Mäuse mit Flp-*Deleter*-Mäusen (siehe 3.1.5.1) verpaart um eine Flp-basierte Deletion der Reporter- und Resistenzkassette zu erzielen. Die Nachkommen wurden per PCR auf die gewünschte Rekombination untersucht (Abbildung 3-28). In 14% der Nachkommen war das gefloxtes *Eif-5a2*-Allel nachweisbar, hier konnte die Resistenzkassette erfolgreich entfernt werden.



**Abbildung 3-28: PCR-Nachweis der Flp-basierten Deletion der Resistenzkassette.** A) Die Nachkommen aus der Verpaarung der Mäuse mit dem *Knockout first-Eif-5a2*-Allel mit den Flp-Deleter-Mäusen wurden per PCR auf die gewünschte Deletion der Resistenzkassette getestet. Dazu wurde ein im 5'-Bereich bindendes Oligonukleotid mit einem im geflochten Bereich bindenden Oligonukleotid kombiniert. B) Bei korrekter Rekombination wurde neben dem Wildtyp-Produkt (403 bp) ein zusätzliches Produkt von 586 bp gebildet. Dagegen entsteht unter den gewählten Bedingungen aufgrund des großen Abstandes der Oligonukleotide kein zusätzliches Produkt beim *Knockout first*-Allel. In den Mäusen 43, 45 und 50 konnte die Resistenzkassette erfolgreich entfernt werden. Rotes Dreieck: loxP-Element, grünes Dreieck: FRT-Element, +: Wildtyp-Allel, p-neo: *Knockout first*-Allel, p: gefloxtes Allel.

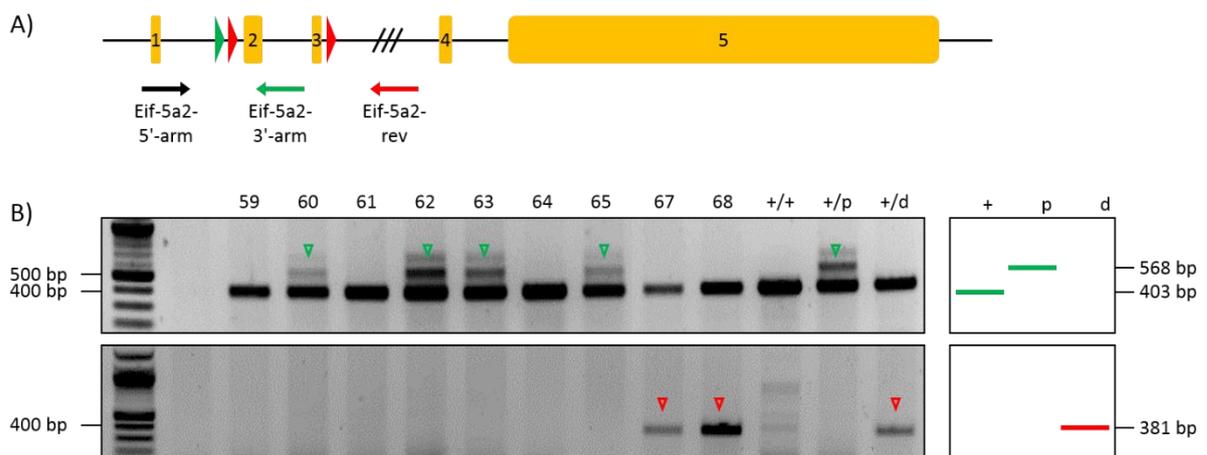
### 3.3.2.3 Verpaarungs- und Genotypisierungsstrategie

Zur Untersuchung des konstitutiven *Eif-5a2-Knockouts* wurden die Versuchstiere mit heterozygot gefloxtem *Eif-5a2*-Allel mit *Cre-Deleter*-Mäusen verpaart, die die Cre-Rekombinase ab der frühen Embryonalentwicklung ubiquitär unter Kontrolle eines CMV-Minimalpromotors exprimieren, so dass Nachkommen mit heterozygot deletiertem *Eif-5a2*-Allel geboren wurden. Diese wurden anschließend untereinander verpaart um auch den homozygoten *Eif-5a2-Knockout* untersuchen zu können (Tabelle 3-5). Im Fall embryonaler Letalität könnte das konditionale Design genutzt werden und durch Verpaarung der geflochten Mäuse mit entsprechenden Cre-Mäusen der gewebsspezifische oder induzierbare *Eif-5a2-Knockout* untersucht werden.

**Tabelle 3-5: Verpaarungsschema für den konstitutiven *Eif-5a2-Knockout*.** Mäuse mit heterozygot gefloxtem *Eif-5a2*-Allel wurden mit Cre-Deleter-Mäusen verpaart um Nachkommen mit heterozygotem *Eif-5a2-Knockout* zu erhalten. Zur Untersuchung des homozygoten *Knockouts* wurden diese untereinander verpaart. +: Wildtyp-Allel, p: gefloxtes Allel, d: deletiertes Allel, \*: Die Genotyp-Verteilung war aufgrund der X-Chromosomgekoppelten Vererbung der Cre-Rekombinase geschlechtsabhängig. #Das Cre-Transgen wurde bei dieser Angabe nicht berücksichtigt.

Verpaarung		Nachkommen	Verteilung
<i>Eif-5a2</i> <sup>+/p</sup>	x	<i>Eif-5a2</i> <sup>+/+</sup> ;CMV-cre <sup>+</sup>	<i>Eif-5a2</i> <sup>+/+</sup> , <i>Eif-5a2</i> <sup>+/+</sup> ;CMV-cre <sup>+</sup> , <i>Eif-5a2</i> <sup>+/p</sup> , <i>Eif-5a2</i> <sup>+/d</sup> ;CMV-cre <sup>+</sup>
<i>Eif-5a2</i> <sup>+/d</sup>	x	<i>Eif-5a2</i> <sup>+/d</sup>	<i>Eif-5a2</i> <sup>+/+</sup> , <i>Eif-5a2</i> <sup>+/d</sup> , <i>Eif-5a2</i> <sup>d/d</sup>

Der Genotyp der Nachkommen wurde per PCR bestimmt. Dazu wurde ein im 5'-Bereich bindendes „Vorwärts“-Oligonukleotid mit einem im geflochten Bereich oder im 3'-Bereich bindenden Oligonukleotid kombiniert (Abbildung 3-29).



**Abbildung 3-29: PCR-Strategie zur Genotypisierung der *Eif-5a2-Knockout*-Mäuse.** A) Durch Kombination von einem im 5'-Bereich bindendem „Vorwärts“-Oligonukleotid mit einem im geflochten und einem im 3'-Bereich bindendem „Rückwärts“-Oligonukleotid ließen sich alle möglichen *Eif-5a2*-Allele detektieren. B) Wildtyp und gefloxtes Allel ließen sich durch eine Größenverschiebung durch die Insertion des FRT- und loxP-Elementes bei Verwendung der beiden erstgenannten Oligonukleotide voneinander unterscheiden (406 bp bzw. 568 bp), während beim deletierten Allel kein Produkt entstand. Bei der anderen Oligonukleotidkombination führte dagegen nur das deletierte Allel zu einem Produkt (381 bp). Die Mäuse 59, 61 und 64 trugen das Wildtyp-*Eif-5a2*-Gen, bei den Mäusen 60, 62, 63 und 65 ist das Gen heterozygot gefloxt und bei den Mäusen 67 und 68 heterozygot deletiert. Rotes Dreieck: loxP-Element, grünes Dreieck: FRT-Element, +: Wildtyp-Allel, p: gefloxtes Allel, d: deletiertes Allel.

Mit den im 5'- und 3'-Bereich bindenden Oligonukleotiden wurde unter den gewählten Bedingungen aufgrund der großen Entfernung nur im Fall des deletierten Allels ein Produkt gebildet (381 bp). Bei der anderen Oligonukleotidkombination konnte dagegen kein Produkt beim deletierten Allel entstehen. Wildtyp- und gefloxtes Allel ließen sich durch eine vom FRT-

und loxP-Element verursachte Größenverschiebung unterscheiden (403 bp bzw. 568 bp). Zusätzlich mussten die Tiere auf das Cre- und das nicht mehr benötigte Flp-Transgen getestet werden.

Bei der konditionalen *Eif-5a2-Knockout*-Mauslinie lag das *Eif-5a2*-Gen nun in gefloxter Form vor, so dass durch Cre-basierte Deletion der Exons 2 und 3 ein vollständiger Funktionsverlust des kodierten eIF-5A2-Proteins erreicht werden kann. Durch entsprechende Verpaarungen mit *Cre-Deleter*-Mäusen können mit diesem Mausmodell also die Auswirkungen des konstitutiven oder konditionalen eIF-5A2-Verlustes im Säugerorganismus untersucht werden.

### 3.3.3 Der heterozygote *Eif-5a2-Knockout* führt zu einer reduzierten Bockanzahl und einer gesteigerten Gewichtszunahme bei Weibchen

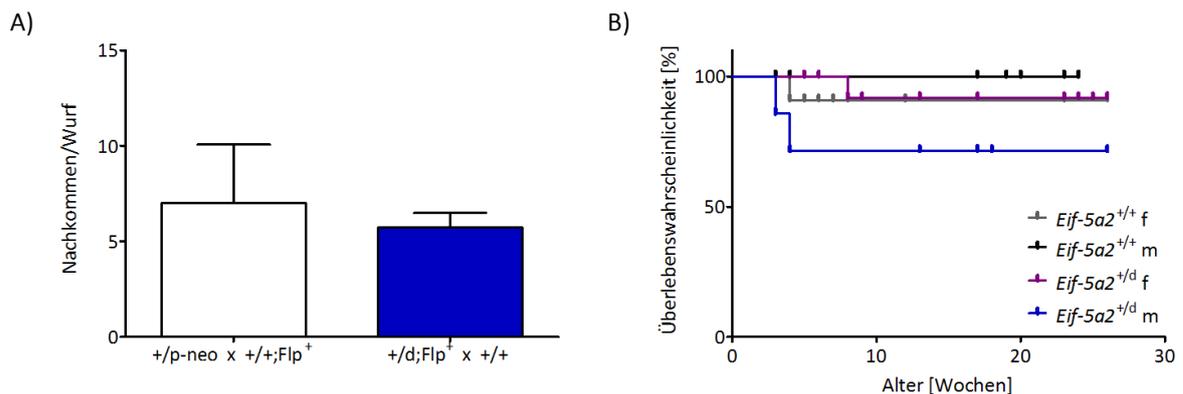
Um den heterozygoten Verlust des *Eif-5a2*-Gens *in vivo* zu untersuchen, wurden heterozygot geflochte *Eif-5a2*-Mäuse mit *Cre-Deleter*-Mäusen verpaart. Der Cre-basierte *Knockout* des *Eif-5a2*-Gens funktionierte zuverlässig während der Embryonalentwicklung, es konnten keine Tiere mit gefloxtem Allel und Cre-Transgen identifiziert werden. Nachkommen mit allen vorhergesagten Genotypen (*Eif-5a2*<sup>+/+</sup>, *Eif-5a2*<sup>+/+</sup>;CMV-cre<sup>+</sup>, *Eif-5a2*<sup>+/p</sup>, *Eif-5a2*<sup>+/d</sup>;CMV-cre<sup>+</sup>) wurden geboren, allerdings war der Anteil heterozygoter *Eif-5a2*-Tiere reduziert.

Um die Genotyp-Verteilung genauer zu untersuchen, wurden heterozygot geflochte *Eif-5a2*-Weibchen mit Wildtyp-Böcken verpaart. Dabei zeigte sich ebenfalls eine Reduktion der heterozygoten Tiere und damit eine deutliche Abweichung vom erwarteten 1:1-Verhältnis von Wildtyp- zu heterozygoten Tieren (Tabelle 3-6).

**Tabelle 3-6: Genotyp-Verteilung bei Verpaarung von heterozygoten *Eif-5a2*-Tieren mit Wildtyp-Tieren.** Die erwartete 1:1-Verteilung konnte bei der Analyse von 72 Nachkommen nicht beobachtet werden (Wahrscheinlichkeit: 0,24). Während die Genotyp-Verteilung bei den weiblichen Nachkommen annähernd das 1:1-Verhältnis ergab, konnten erheblich weniger heterozygote Böcke als Wildtyp-Böcke detektiert werden. Dadurch war auch die Geschlechterverteilung innerhalb der heterozygoten Nachkommen deutlich zu den Weibchen verschoben, während sie innerhalb der Wildtyp-Tiere ausgeglichen war. +: Wildtyp-Allel, d: deletiertes Allel, f: Weibchen, m: Böcke.

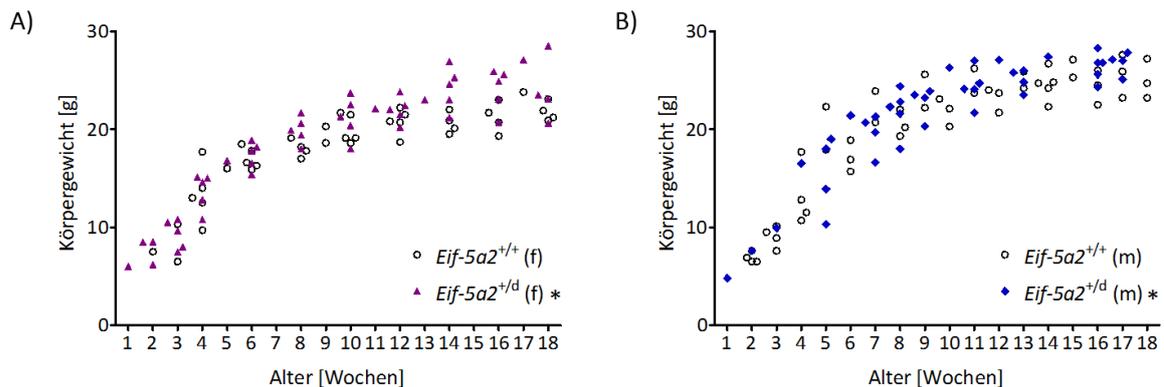
	<i>Eif-5a2</i> <sup>+/+</sup>	<i>Eif-5a2</i> <sup>+/d</sup>
erwartet	50%	50%
gesamt	41	31
Weibchen	20	23
Böcke	23	8
Geschlechter- verhältnis (f/m)	49% / 51%	74% / 26%

Die getrennte Analyse weiblicher und männlicher Nachkommen ergab bei den Weibchen ungefähr eine 1:1-Verteilung, während deutlich weniger heterozygote Böcke als Wildtyp-Böcke geboren wurden. Dadurch war das Geschlechterverhältnis innerhalb der heterozygoten Nachkommen deutlich zu den Weibchen verschoben (74% / 26%), während die Verteilung innerhalb der Wildtyp-Gruppe ausgeglichen war. Die um etwa die Hälfte reduzierte Anzahl heterozygoter Böcke lässt darauf schließen, dass der heterozygote Verlust des *Eif-5a2*-Gens die Embryonalentwicklung männlicher Tiere beeinträchtigte.

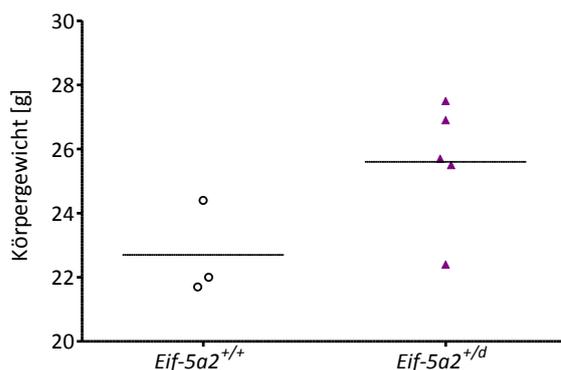


**Abbildung 3-30: Durchschnittliche Wurfgröße bei Verpaarung von heterozygot deletierten *Eif-5a2*-Mäusen und postnatale Überlebenswahrscheinlichkeit.** A) Bei der Verpaarung heterozygoter *Eif-5a2*-Weibchen mit Wildtyp-Böcken ergab sich eine um 18% reduzierte Wurfgröße im Vergleich zur Verpaarung von heterozygot modifizierten *Eif-5a2*-Mäusen mit Flp-Deleter-Mäusen. Abgebildet ist der Standardfehler des Mittelwerts. B) Im Verlauf des ersten Lebensmonats starben verhältnismäßig viele heterozygote Böcke (n=7) verglichen mit der Kontrollgruppe (n=10). Die heterozygoten Weibchen (n=15) zeigten keine Auffälligkeiten gegenüber der Kontrollgruppe (n=13). f: Weibchen, m: Böcke. +: Wildtyp-Allel, p-neo: modifiziertes Allel, d: deletiertes Allel.

Auch die durchschnittliche Wurfgröße war mit 5,7 Nachkommen pro Wurf im Gegensatz zur Verpaarung von Tieren mit modifizierten *Eif-5a2*-Gen mit *Flp-Deletern* leicht reduziert (Abbildung 3-30). Angenommen, nur etwa die Hälfte der heterozygoten Böcke überlebt die Embryonalentwicklung (siehe oben), dann müsste die durchschnittliche Wurfgröße insgesamt um 12,5% reduziert sein, so dass auch die Wurfgröße einen Hinweis auf eine Beeinträchtigung der Embryonalentwicklung gab. Zudem war die postnatale Mortalität der heterozygoten Böcke leicht erhöht.



**Abbildung 3-31: Körpergewichtsentwicklung der heterozygoten *Eif-5a2*-Mäuse.** Jeweils fünf heterozygote Weibchen (A) und Böcke (B) wurden über vier Monate regelmäßig gewogen und mit den jeweiligen Kontrolltieren verglichen. Während sich in den ersten zwei Monaten kaum Unterschiede ergaben, nahmen die heterozygoten *Eif-5a2*-Weibchen im dritten und vierten Monat deutlich stärker zu als die Kontrolltiere. Dieser Effekt war bei den Böcken schwächer ausgeprägt. Signifikante Abweichungen gegenüber der Wildtyp-Kontrolle sind mit \* gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ). f: Weibchen, m: Böcke. +: Wildtyp-Allel, d: deletiertes Allel.



**Abbildung 3-32: Körpergewicht von adulten heterozygoten *Eif-5a2*-Weibchen.** Im Alter von fünf bis sechs Monaten wogen die fünf heterozygoten Weibchen durchschnittlich über 10% mehr als die Wildtyp-Kontrollgruppe. +: Wildtyp-Allel, d: deletiertes Allel.

Die weitere Entwicklung der heterozygoten *Eif-5a2*-Mäuse verlief zunächst unauffällig. Das Körpergewicht entwickelte sich in den ersten zwei Monaten entsprechend den Kontrolltieren. Im dritten und vierten Monat nahmen die heterozygoten Weibchen deutlich mehr an Gewicht zu als die Kontrollen, während dieser Effekt bei den heterozygoten Böcken weniger ausgeprägt war (Abbildung 3-31). Im Alter von fünf bis sechs Monaten wogen die heterozygoten

Weibchen durchschnittlich über 10% mehr als die Wildtyp-Kontrollgruppe (Abbildung 3-32).

Sowohl die heterozygoten Weibchen als auch Böcke waren fertil und konnten lebensfähige Nachkommen erzeugen (siehe 3.3.4).

Zusammenfassend zeigte sich, dass der heterozygote *Eif-5a2-Knockout* zwar lebensfähig war, allerdings schien die embryonale Entwicklung von Böcken beeinträchtigt und die postnatale Mortalität erhöht zu sein. Heterozygote Weibchen waren davon nicht betroffen, sondern zeigten eine gesteigerte Gewichtszunahme gegenüber Kontrolltieren.

### 3.3.4 Der homozygote *Eif-5a2-Knockout* ist lebensfähig

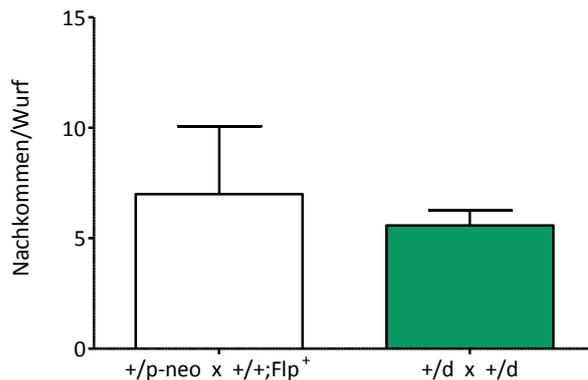
Zur Überprüfung, ob auch der homozygote *Eif-5a2-Knockout* lebensfähig war, wurden heterozygote *Eif-5a2*-Mäuse miteinander verpaart. Unter den Nachkommen wurden homozygote *Knockout*-Tiere identifiziert und damit der Nachweis der Lebensfähigkeit des *Eif-5a2-Knockouts* erbracht. Der Anteil der hetero- und homozygoten Nachkommen war jedoch geringer als statistisch nach der 1:2:1-Verteilung erwartet (Tabelle 3-7).

**Tabelle 3-7: Nachkommen aus der Verpaarung von heterozygoten *Eif-5a2*-Mäusen.** Bei der Untersuchung von 66 Nachkommen konnte die erwartete 1:2:1-Verteilung der Genotypen nicht beobachtet werden, der Anteil hetero- und homozygoter *Eif-5a2*-Tiere war reduziert. Die geschlechtsspezifische Analyse ergab, dass dieser Effekt durch die Böcke hervorgerufen wurde. Während die Genotyp-Verteilung der Weibchen einer 1:2:1-Verteilung ähnelte, zeigten die Böcke eine 2:2:1-Verteilung ( $\chi^2$ -Test, Wahrscheinlichkeit: 1,0). +: Wildtyp-Allel, d: deletiertes Allel.

	<i>Eif-5a2</i> <sup>+/+</sup>	<i>Eif-5a2</i> <sup>+/d</sup>	<i>Eif-5a2</i> <sup>d/d</sup>
erwartet	25%	50%	25%
gesamt	22	28	16
Weibchen	8	14	9
Böcke	14	14	7

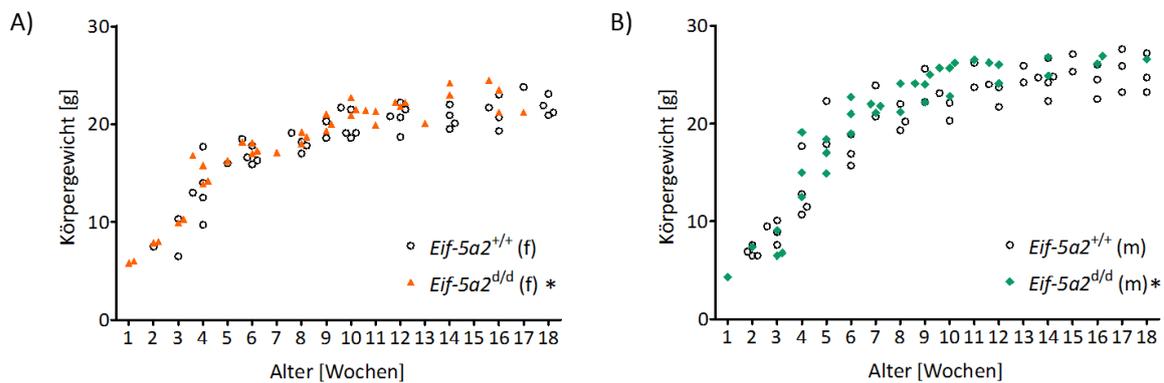
Die geschlechtsspezifische Analyse der Nachkommen ergab bei den Weibchen ungefähr die erwartete 1:2:1-Verteilung ( $\chi^2$ -Test, Wahrscheinlichkeit: 0,84), bei den Böcken jedoch eine massive Abweichung von dieser Verteilung ( $\chi^2$ -Test, Wahrscheinlichkeit: 0). Hier konnte stattdessen eine 2:2:1-Verteilung ( $\chi^2$ -Test, Wahrscheinlichkeit: 1,0) beobachtet werden.

Unter der Annahme einer Überlebenswahrscheinlichkeit von 50% für die hetero- und homozygoten Böcke bei der Embryonalentwicklung (siehe 3.3.3) wäre genau diese 2:2:1-Verteilung der Böcke zu erwarten.



**Abbildung 3-33: Durchschnittliche Wurfgröße bei der Verpaarung der homozygoten *Eif-5a2-Knockout*-Tiere.** Im Vergleich zur Verpaarung von heterozygot modifizierten Tieren mit *Flp-Deleter*-Mäusen war die Wurfgröße bei der Verpaarung homozygoter KO-Tiere um 20% reduziert. Abgebildet ist der Standardfehler des Mittelwerts. +: Wildtyp-Allel, p-neo: modifiziertes Allel, d: deletiertes Allel.

Einen weiteren Hinweis auf eine reduzierte embryonale Überlebenswahrscheinlichkeit lieferte die leicht reduzierte Wurfgröße bei der Verpaarung heterozygoter Tiere (Abbildung 3-33). Im Vergleich zur Verpaarung der heterozygot modifizierten Mäuse mit *Flp-Deleter*-Mäusen war die Wurfgröße um 20% auf 5,6 Nachkommen pro Wurf reduziert und kam damit der für eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 50% bei Böcken erwarteten Wurfgrößen-Reduktion von 18,8% nah.



**Abbildung 3-34: Entwicklung des Körpergewichts von homozygoten *Eif-5a2-Knockout*-Tieren.** Die jeweils fünf homozygoten KO-Weibchen (A) und -Männchen (B) zeigten zunächst keine Unterschiede zur Kontrollgruppe. Die heterozygoten Weibchen nahmen aber im Verlauf des viermonatigen Messzeitraums stärker an Gewicht zu als die Kontrolltiere. Signifikante Abweichungen gegenüber der Wildtyp-Kontrolle sind mit \* gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ). f: Weibchen, m: Böcke. +: Wildtyp-Allel, d: deletiertes Allel.

Die weitere Entwicklung der homozygoten *Eif-5a2-Knockout*-Tiere verlief normal. Zunächst konnten keine größeren Unterschiede beim Körpergewicht festgestellt werden. Im Verlauf des viermonatigen Messzeitraum zeigten die homozygoten *Knockout*-Weibchen dann aber ein höheres Durchschnittsgewicht als die Kontrollgruppe (Abbildung 3-34).

Bei der postnatalen Überlebenswahrscheinlichkeit konnten bisher keine Unterschiede zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Sowohl die homozygoten *Knockout*-Weibchen als auch

Böcke waren fertil. Aus der Verpaarung mit Wildtyp-Tieren gingen lebensfähige Nachkommen hervor.

Auch der homozygote *Knockout* des *Eif-5a2*-Gens in Mäusen war lebensfähig. Wie beim heterozygoten *Knockout* schien auch hier die Embryonalentwicklung ausschließlich von Böcken beeinträchtigt zu sein. Rechnerisch ergab sich eine Überlebenswahrscheinlichkeit von etwa 50%. Anschließend entwickelten sich die homozygoten KO-Tiere normal und waren fertil. Nur die Weibchen wiesen eine leicht gesteigerte Gewichtszunahme gegenüber der Kontrollgruppe auf.

## 3.4 Identifizierung potentieller mRNA-Interaktionspartner von eIF-5A

Die bisher beschriebenen Funktionen von eIF-5A hängen eng mit mRNAs zusammen<sup>43,50</sup>. Für wenige spezifische Transkripte wurde bereits eine Interaktion mit eIF-5A beschrieben<sup>119,120</sup>. Um die Funktion von eIF-5A besser zu verstehen, wurden mit eIF-5A interagierende mRNAs untersucht. Dazu wurde die Methode der Ribonukleoprotein-Immunopräzipitation mit anschließender *Microarray*-Analyse (RIP-Chip) eingesetzt, mit der genomweit potentielle mRNA-Interaktionspartner gefunden werden können. Da eIF-5A an aktiv translatierende Ribosomen bindet<sup>121</sup>, sollten dadurch vorwiegend mRNAs kopräzipitiert werden, die gemeinsam mit eIF-5A am Ribosom lokalisieren.

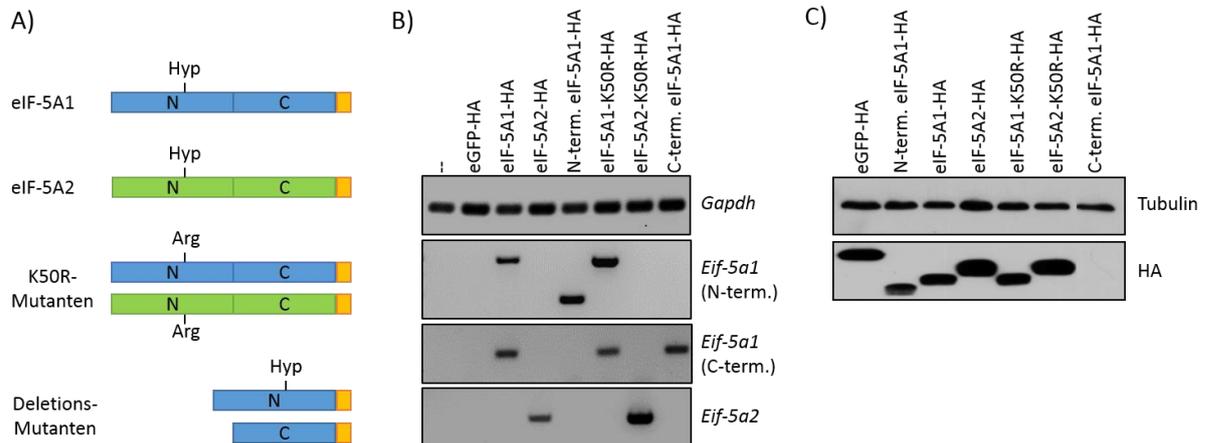
### 3.4.1 Etablierung der Ribonukleoprotein-Immunopräzipitation

Für die Ribonukleoprotein-Immunopräzipitation (RIP) wurden eIF-5A-Proteine über eine eingeführte Hämagglutinin-Epitop (HA)-Markierung aus eukaryotischen Zellen aufgereinigt und die Bedingungen so gewählt, dass daran gebundene RNAs mit isoliert wurden, also Protein-RNA-Komplexe gereinigt bzw. angereichert wurden.

Um auch die Hypusin-Abhängigkeit der eIF-5A-mRNA-Interaktion untersuchen zu können, wurden neben den Konstrukten eIF-5A1-HA, eIF-5A2-HA und der Negativkontrolle eGFP-HA zusätzlich Punkt- und Deletionsmutanten von eIF-5A (eIF-5A1/2-K50R-HA, N-terminales und C-terminales eIF-5A1-HA) verwendet. Bei der eIF-5A-Mutante K50R wurde der Lysin-Rest, der normalerweise zu Hypusin umgewandelt wird, gegen Arginin ausgetauscht. Die Deletionsmutanten enthielten nur die N-terminale (AS 1 – 83) bzw. nur die C-terminale Domäne (AS 84 – 154) des eIF-5A1-Proteins.

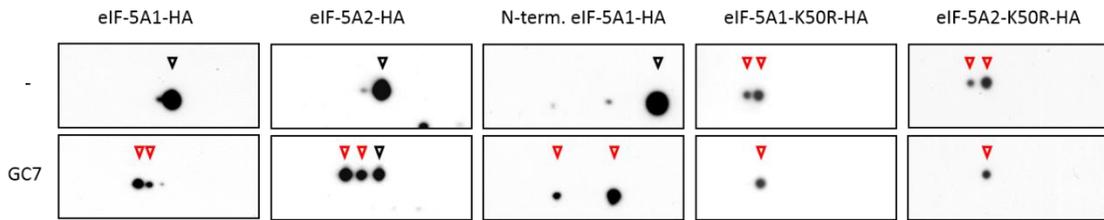
Die Konstrukte wurden über Transduktion in NIH-3T3-Zellen eingebracht und per PCR und Western Blot überprüft, ob die modifizierten Proteine auf vergleichbarem Niveau exprimiert wurden (Abbildung 3-35). Während eine ausreichende Expression der eIF-5A-Proteine, der K50R-Mutanten und der N-terminalen Domäne festgestellt werden konnte, konnte die

C-terminale Domäne lediglich auf mRNA-Ebene jedoch nicht als Protein nachgewiesen werden. Auch mit N-terminaler HA-Markierung oder als Fusionsprotein mit den als nukleäres Lokalisationssignal wirkenden Aminosäuren 1 – 19<sup>122</sup> konnte die C-terminale Domäne nicht als Protein exprimiert werden.



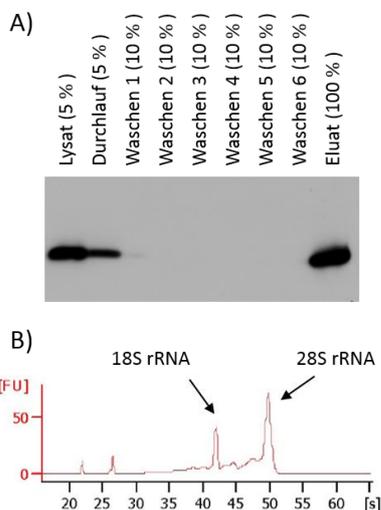
**Abbildung 3-35: Expression von HA-markierten Proteinen für die Ribonukleoprotein-Immunopräzipitation.** Verschiedene eIF-5A-Varianten (A) mit C-terminaler HA-Markierung (gelb) wurden über retrovirale Transduktion in NIH-3T3-Zellen eingebracht und ihre Expression per PCR auf mRNA-Ebene (B) und per Western Blot auf Proteinebene (C) überprüft. Mit der Ausnahme von C-terminalem eIF-5A1 konnte eine ausreichende Expression aller Proteine festgestellt werden. Hyp: Hypusin, Arg: Arginin, N/C: N/C-terminale Domäne von eIF-5A1.

Da die bisher beschriebenen mRNA- und Proteininteraktionen überwiegend Hypusin-abhängig sind<sup>119,121,123</sup>, wurde überprüft, ob die eingebrachten eIF-5A-Proteine trotz ihrer Modifikation in NIH-3T3-Zellen hypusiniert wurden. Dazu wurden die unterschiedlichen eIF-5A-Modifikationsformen mittels 2D-Western Blot aufgetrennt (siehe 3.2.3). Sowohl HA-markiertes eIF-5A1, eIF-5A2 als auch die N-terminale Domäne konnten hypusiniert werden, wohingegen erwartungsgemäß keine Modifikation der K50R-Punktmutanten stattfand (Abbildung 3-36).



**Abbildung 3-36: Überprüfung der Hypusin-Modifikation der HA-markierten eIF-5A-Proteine.** Die verschiedenen eIF-5A-Modifikationsformen wurden mittels 2D-Western Blot und einem HA-spezifischen Antikörper sichtbar gemacht und über eine Aktin-Positionskontrolle zugeordnet. HA-markiertes eIF-5A1, eIF-5A2 und N-terminales eIF-5A1 lagen überwiegend in der hypusinierten Form (schwarzes Dreieck) vor. Bei den K50R-Mutanten wurden dagegen die saureren Lysin-haltigen eIF-5A-Formen (rote Dreiecke) detektiert, die K50R-Mutanten konnten erwartungsgemäß nicht hypusiniert werden. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit dem DHS-Inhibitor GC7 (50  $\mu$ M für zwei Tage) behandelt und ebenfalls das Auftauchen der saureren Lysin-haltigen eIF-5A-Formen beobachtet.

Für die RIP wurden in den Zellen gebildete eIF-5A-mRNA-Komplexe über magnetische Anti-



**Abbildung 3-37: Ribonukleoprotein-Immunoprecipitation von eIF-5A1-HA.** A) Über magnetische Anti-HA-Antikörper-konjugierte Mikroträger wurde eIF-5A1 aufgereinigt. B) Die dabei koprecipitierte RNA wurde isoliert und ihre Integrität mittels chipbasierter elektrophoretischer Separation im Bioanalyzer bestätigt.

HA-Antikörper-konjugierte Mikroträger im magnetischen Feld zurückgehalten und mehrmals gewaschen. Die Bedingungen wurden dabei so gewählt, dass RNA-Protein-Bindungen erhalten blieben. Die Western Blot-Analyse in Abbildung 3-37 zeigt beispielhaft für eIF-5A1, dass die Aufreinigung der HA-markierten Proteine möglich war. Die magnetischen Mikroträger limitierten dabei die Menge der aufgereinigten Komplexe. Anschließend wurde die enthaltene RNA durch Proteinase K-Verdau und SDS-vermittelte Denaturierung der Proteine aus den Komplexen gelöst und aufgereinigt. Eine Bioanalyzermessung bestätigte die Integrität der koprecipitierten RNA. Auch die ribosomale 18S und 28S RNA konnten detektiert werden und bestätigen die Assoziation von eIF-5A mit Ribosomen.

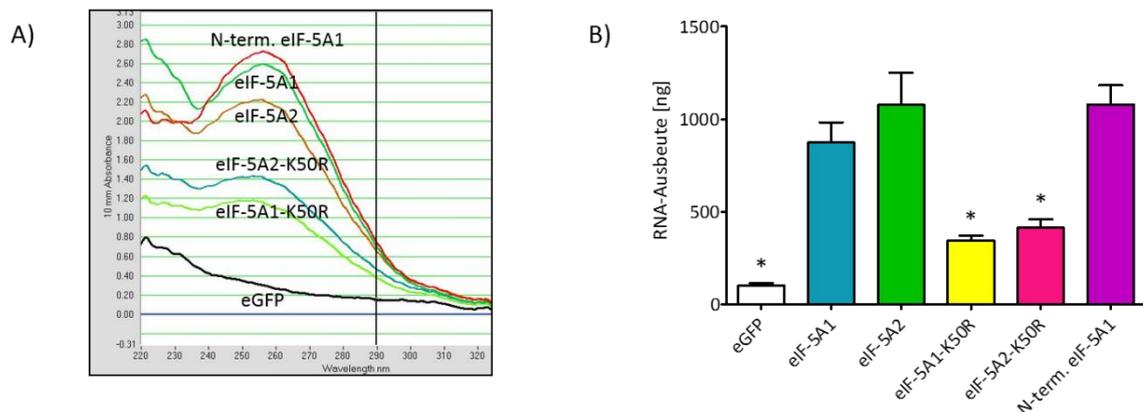
Die beiden HA-markierten eIF-5A-Isoformen sowie verschiedene Mutanten konnten in NIH-3T3-Zellen exprimiert, Lys<sup>50</sup>-abhängig hypusiniert und zur Isoform- und Mutantenspezifischen Koprecipitation von intakter RNA eingesetzt werden.

### 3.4.2 Wie viel RNA kopräzipitiert ist Hypusin-abhängig

Um zu überprüfen, welchen Einfluss Isoform und Hypusin-Modifikation auf die eIF-5A-RNA-Koprazipitation haben, wurde die Ribonukleoprotein-Immunopräzipitation mit den unterschiedlichen eIF-5A-Proteinen durchgeführt. Die dabei erhaltenen RNA-Mengen konnten direkt miteinander verglichen werden, da die Menge der isolierten Komplexe durch die limitierenden Mikroträger konstant gehalten wurde.

Zur Abschätzung der unspezifischen Bindung von RNAs an Mikroträger und Säulen wurde HA-markiertes eGFP eingesetzt, das keine RNA-Bindungsaktivität aufweist. Die über dieses Protein aufgereinigte RNA-Menge lag bei etwa 10% verglichen mit eIF-5A1 und eIF-5A2 (Abbildung 3-38) und zeigte, dass die unspezifische Anreicherung von RNA gering war.

Mit den beiden eIF-5A-Isoformen konnte ungefähr gleich viel RNA koprazipitiert werden. Pro RIP wurden durchschnittlich knapp 1 µg RNA isoliert. Die beiden K50R-Mutanten, die nicht hypusiniert werden konnten, ergaben jeweils eine um über 60% reduzierte RNA-Ausbeute verglichen mit ihrer jeweiligen Wildtyp-Form. Dagegen zeigte die aus der N-terminalen Domäne mit Hypusinrest bestehende Deletionsmutante keine Reduktion der koprazipitierten RNA-Menge.



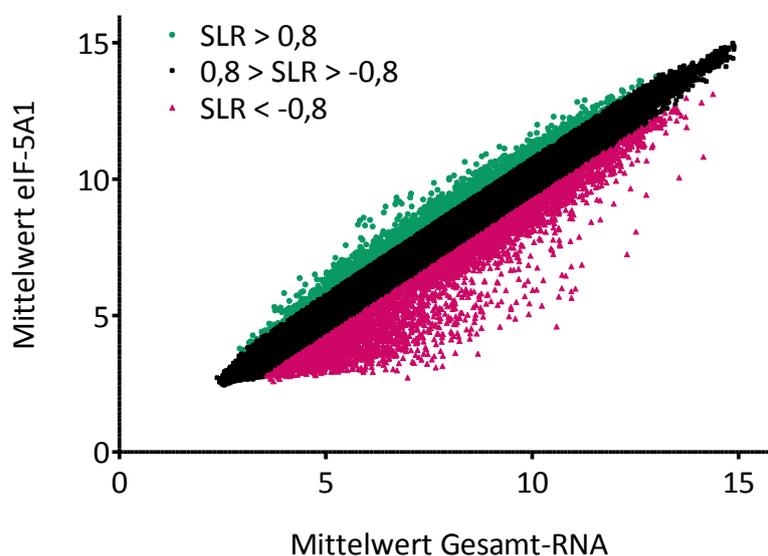
**Abbildung 3-38: Bei der Ribonukleoprotein-Immunopräzipitation erhaltene RNA-Mengen.** A) Per Messung am Nanodrop konnte die koprazipitierte RNA kontrolliert und quantifiziert werden. B) Aus jeweils sechs bis zehn unabhängigen RIP-Ansätzen wurde die durchschnittliche RNA-Ausbeute für jedes HA-markierte Protein bestimmt. Die über eGFP-abgeschätzte unspezifische RNA-Bindung lag bei 10% bezogen auf eIF-5A1 und eIF-5A2. Während die beiden Isoformen etwa gleich viel RNA aufreinigten, kam es bei den K50R-Mutanten zu einer deutlich reduzierten RNA-Koprazipitation. Die Deletionsmutante zeigte dagegen keine Reduktion in der RNA-Menge. Signifikante Abweichungen gegenüber eIF-5A1 sind mit \* gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

Die RIP-Ergebnisse zeigten, dass mit den verschiedenen eIF-5A-Proteinen RNAs spezifisch kopräzipitiert werden konnten, wobei die Hypusin-Modifikation eine wichtige Rolle spielte, ihr Verlust resultierte in einer stark reduzierten Kopräzipitation von RNA.

### 3.4.3 Identifizierung potentieller mRNA-Interaktionspartner

Um die mit den verschiedenen eIF-5A-Proteinen kopräzipitierte RNA nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ miteinander vergleichen zu können, wurde diese per *Microarray* analysiert. Hierfür wurde jeweils dieselbe RNA-Menge (100 ng) eingesetzt und Unterschiede zur Gesamt-RNA von eIF-5A1-HA-exprimierenden Zellen berechnet.

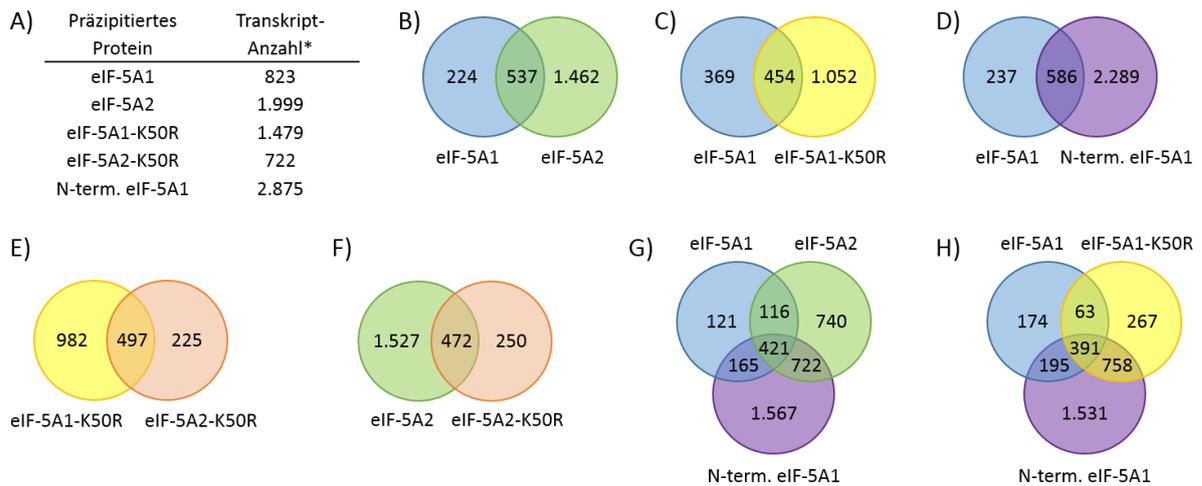
Wie in Abbildung 3-39 am Beispiel von eIF-5A1 gezeigt, war nach der RNA-Kopräzipitation eine spezifische Gruppe von Transkripten im Vergleich zur Gesamt-RNA deutlich angereichert (5,6% der 45.101 untersuchten Transkripte), während viele Transkripte im Vergleich zur Gesamt-RNA erniedrigt waren oder nur eine leichte Veränderung zeigten.



**Abbildung 3-39: *Microarray*-Analyse der durch Ribonukleoprotein-Immunopräzipitation erhaltenen RNA.** Die mit eIF-5A1-HA kopräzipitierte RNA wurde per *Microarray* mit der Gesamt-RNA der Zellen verglichen. Von den 45.101 untersuchten Transkripten waren 5,6% nach eIF-5A1-HA-Kopräzipitation angereichert (grün) und lagen über der gesetzten Anreicherungsschwelle ( $SLR \geq 0,8$ ). SLR: *Signal Log Ratio*.

Für die weitere Analyse wurden nur Transkripte verwendet, die im T-Test signifikant verändert waren und über der gesetzten Anreicherungsschwelle (*Signal Log Ratio*  $\geq 0,8$ ) lagen. Die 100 jeweils am stärksten angereicherten Transkripte sind im Anhang unter 5.3 aufgelistet. Um

Treffer zu minimieren, die auf einer veränderten RNA-Expression durch die eingeführte Expression von HA-markierten eIF-5A-Proteinen basierte, wurde die Gesamt-RNA aus eIF-5A1-HA-exprimierenden Zellen isoliert. Der optimale Vergleich bestand daher zwischen eIF-5A1 und Gesamt-RNA, die weitere Auswertung wurde vor allem auf diesen Vergleich bezogen. Insbesondere bei der N-terminalen eIF-5A1-Domäne kam es zu einer massiven Anreicherung weiterer Transkripte.



**Abbildung 3-40: Übereinstimmungen zwischen den angereicherten Transkripten.** A) Die Tabelle gibt die Anzahl signifikant angereicherter Transkripte über der Anreicherungsschwelle ( $SLR \geq 0,8$ ) für das jeweilige zur RIP verwendete Protein wieder. Die 100 jeweils am stärksten angereicherten Transkripte sind unter 5.3 aufgeführt. B-H) Überschneidungen zwischen den in den verschiedenen Ansätzen gefundenen signifikant angereicherten Transkripten. SLR: *Signal Log Ratio*. \*: Gegenüber der Gesamt-RNA signifikant angereichert ( $p < 0,05$ ).

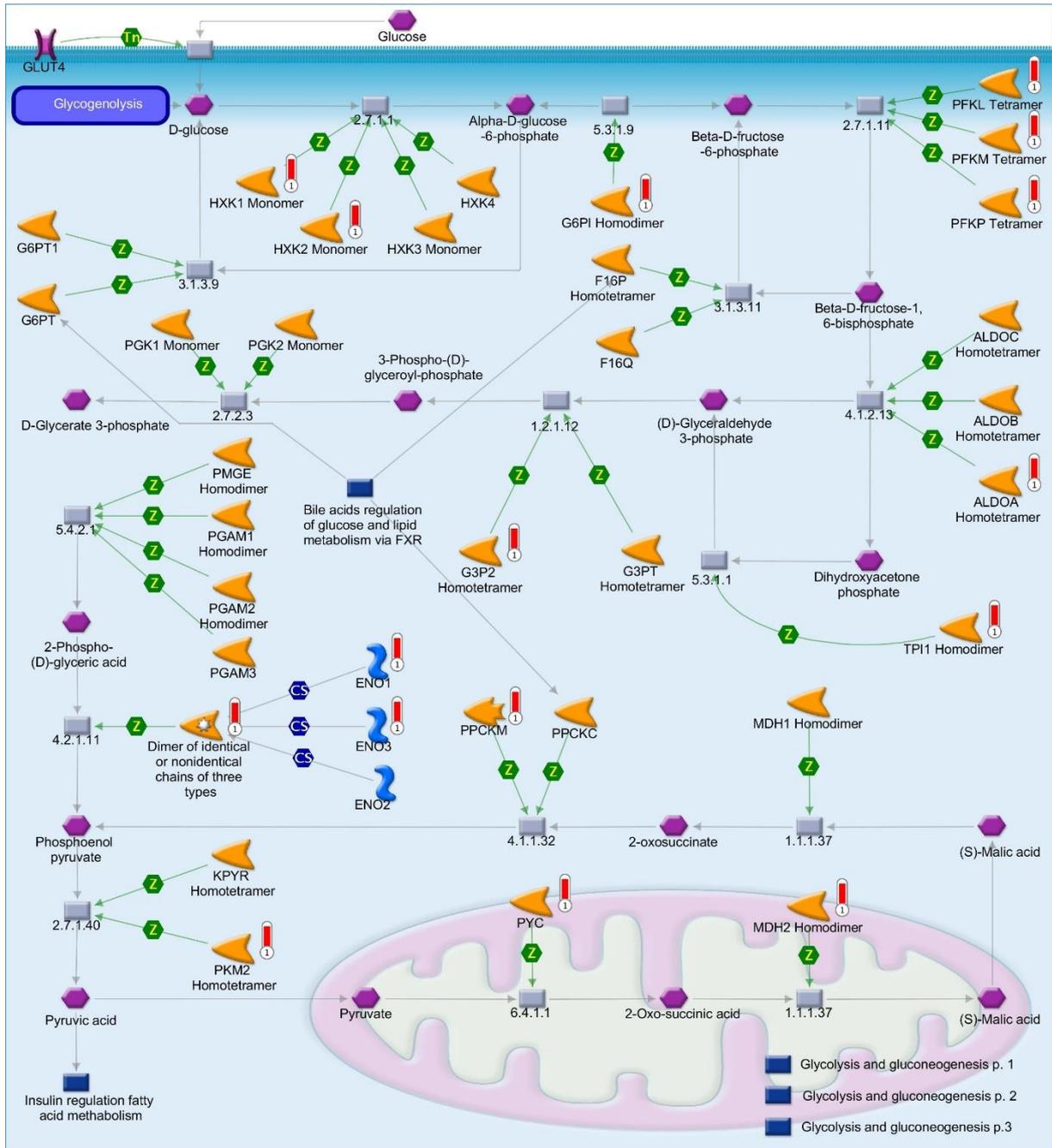
Für eIF-5A1 wurden 823 gegenüber der Kontrolle signifikant angereicherte Transkripte oberhalb der Anreicherungsschwelle detektiert. Davon wurden 65% Isoform-unabhängig mit eIF-5A1 und eIF-5A2 kopräzipitiert und 35% Isoform-spezifisch nur mit eIF-5A1. Dagegen wurden 71% der eIF-5A1-Transkripte auch mit der N-terminalen Domäne aufgereinigt, 51% sowohl mit eIF-5A2 als auch der N-terminalen Domäne zusammen (Abbildung 3-40). Nur 55% der eIF-5A1-Transkripte wurden auch mit der K50R-Mutante erhalten. Insgesamt 24% der Transkripte wurden mit eIF-5A1 und der N-terminalen Domäne, nicht aber mit der K50R-Mutante gefunden, 48% mit allen drei Proteinen.

Die Transkripte wurden mit verschiedenen Algorithmen auf gemeinsame Eigenschaften untersucht. Eine Cluster-Analyse über die *Gene Ontology*-Annotationen der mit eIF-5A1 oder eIF-5A2 kopräzipitierten Transkripte ergab, dass Transkripte aus der Kategorie „Metabolische Prozesse“ sowie „Zelluläre Prozesse“ stark angereichert waren (Abbildung 3-41).



**Abbildung 3-41: Gene Ontology- und KEGG-Pathway-Analyse der kopräzipitierten RNA.** A) Innerhalb der Gruppe bei der Kopräzipitation mit eIF-5A1 oder eIF-5A2 isolierten RNA wurden vor allem Transkripte aus den Kategorien „Metabolische Prozesse“ und „Zelluläre Prozesse“ gefunden. B-C) Sowohl bei der Kopräzipitation mit eIF-5A1 (B) als auch eIF-5A2 (C) waren viele metabolische Stoffwechselwege angereichert, unter diesen befanden sich auch zentrale Bestandteile des Energiestoffwechsels wie der Glykolyse/Glukoneogenese und des Zitratzyklus.

Neben verschiedenen metabolischen Prozessen konnte in der KEGG- und GeneGO-Pathway-Analyse eine Anreicherung von zentralen Energiestoffwechselprozessen wie dem Zitratzyklus und der Glykolyse/Glukoneogenese (Abbildung 3-42) festgestellt werden.



**Abbildung 3-42: Angereicherte Transkripte der Glykolyse/Glukoneogenese.** Bei der Kopräzipitation mit eIF-5A1 oder eIF-5A2 wurden viele Transkripte identifiziert, die per GeneGo-Pathway-Analyse der Glykolyse/Glukoneogenese zugeordnet werden konnten. Mit eIF-5A2 kopräzipitierte mRNAs sind mit einer roten Markierung gekennzeichnet.

Bei den GeneGO- und Biocarta-Pathway-Analysen zeigte sich eine Isoform-spezifische Anreicherung von *DNA Damage Pathways*. So waren bei der Kopräzipitation mit eIF-5A2 der ATM-ATR- und der BRCA1/2-Signalweg angereichert (Abbildung 3-43). Mit eIF-5A1 wurden die entsprechenden Transkripte dagegen größtenteils nicht angereichert.



**Abbildung 3-43: Isoform-spezifische Anreicherung von DNA Damage Pathways mit eIF-5A2.** Die GeneGO- und Biocarta-Pathway-Analyse der mit eIF-5A2 aufgereinigten mRNAs ergaben eine Anreicherung des ATM-ATR- (A) und des BRCA1/2-Signalwegs (B). Mit eIF-5A2 koprizipitierte mRNAs sind mit einer roten Ausrufezeichen-ähnlichen Markierung gekennzeichnet.

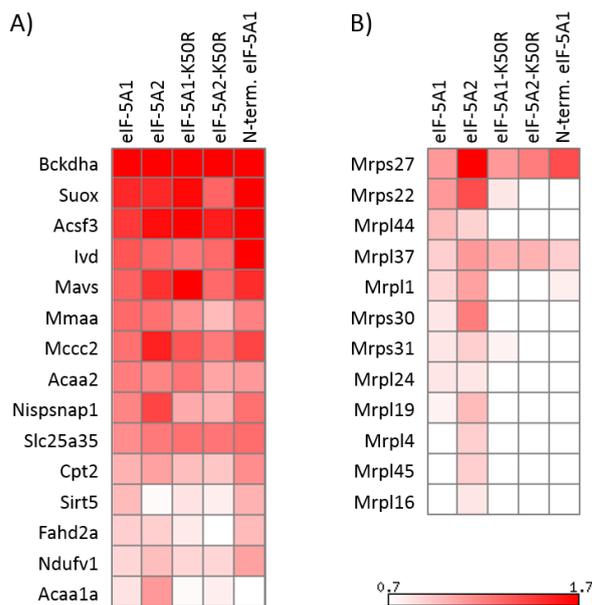
Für die genauere Transkript-Analyse wurden die Hypusin-unabhängig mit den K50R-Mutanten aufgereinigten Transkripte von den mit eIF-5A1 bzw. eIF-5A2 isolierten Transkripten subtrahiert und nur die Hypusin-abhängigen Transkripte weiter untersucht. Bei der *Gene Ontology*-Analyse zeigte sich, dass die korrespondierenden Proteine der Mehrheit der identifizierten Transkripte in Organellen lokalisiert sind (Abbildung 3-44).



**Abbildung 3-44: Lokalisation und Struktur motive der korrespondierenden Proteine von Hypusin-abhängig koprizipitierten Transkripten.** A) Die *Gene Ontology*-Analyse der ausschließlich Hypusin-abhängig aufgereinigten Transkripte wies darauf hin, dass knapp 60% der korrespondierenden Proteine der identifizierten Transkripte in Organellen lokalisiert sind. B-C) Innerhalb der Gruppe der Hypusin-abhängig mit eIF-5A1 (B) oder eIF-5A2 (C) aufgereinigten Transkripte befanden sich verstärkt solche, deren Produkte das mitochondriale Transitpeptid oder WD-Repeat-Domänen besitzen (*Up-Seq-Feature-Analyse*). Dargestellt sind die 15 am stärksten angereicherten Struktur motive.

Bei der Proteinstruktur-Analyse (Abbildung 3-44 B und C) zeigte sich zudem eine Anreicherung von Transkripten, deren Produkte das mitochondriale Transitpeptid enthalten. Aus diesem

Grund wurde die Anreicherung von nukleär kodierten Transkripten, die mitochondriale Proteine kodieren, genauer analysiert. In Abbildung 3-45 ist ein Teil der angereicherten Transkripte für mitochondriale Proteine aufgeführt. Während die Transkripte für mitochondriale ribosomale Proteine mit den eIF-5A-Proteinen stärker koprizipitiert wurden als mit den eIF-5A-Mutanten, war bei den Transkripten für andere mitochondriale Proteine fast kein Unterschied zwischen den Wildtyp-Proteinen und Mutanten sichtbar.



**Abbildung 3-45: Signifikant angereicherte Transkripte, die mitochondriale Proteine kodieren (Auswahl).** Bei der Koprizipitation mit eIF-5A-Proteinen wurde eine Reihe von Transkripten, die mitochondriale Proteine (*Mps*) oder mitochondriale ribosomale Proteine (*Mrps*) kodieren, signifikant angereichert. Während sich die *Signal Log Ratio* für die *Mps* (A) kaum zwischen eIF-5A und den eIF-5A-Mutanten unterschied, wurden die *Mrps* (B) von den eIF-5A-Wildtyp-Proteinen deutlich besser aufgereinigt als von den eIF-5A-Mutanten. *Bckdha*: branched chain ketoacid dehydrogenase E1, alpha polypeptide, *Suox*: sulfite oxidase, *Acsf3*: acyl-CoA synthetase family member 3, *Ivd*: isovaleryl coenzyme A dehydrogenase, *Mavs*: mitochondrial antiviral signaling protein, *Mmaa*: methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) type A, *Mccc2*: methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 2 (beta), *Acaa2*: acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase), *Nipsnap1*: 4-nitrophenylphosphatase domain and non-neuronal SNAP25-like protein homolog 1 (*C. elegans*), *Slc25a35*: solute carrier family 25, member 35, *Cpt2*: carnitine palmitoyltransferase 2, *Sirt5*: sirtuin 5 (silent mating type information regulation 2 homolog) 5 (*S. cerevisiae*), *Fahd2a*: fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 2A, *Ndufv1*: NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1, *Acaa1a*: acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1A.

In einer kürzlich erschienenen Publikation wurde eIF-5A als Translationselongationsfaktor beschrieben, der die Translation von Proteinen mit vier und mehr konsekutiven Prolinresten fördert<sup>25</sup>. Daher wurde untersucht, ob Transkripte für Proteine mit konsekutiven Prolin-Resten angereichert waren. Zunächst wurden alle Mausproteine mit konsekutiven Prolin-Resten identifiziert und mit den beim RIP-Chip signifikant angereicherten Transkripten

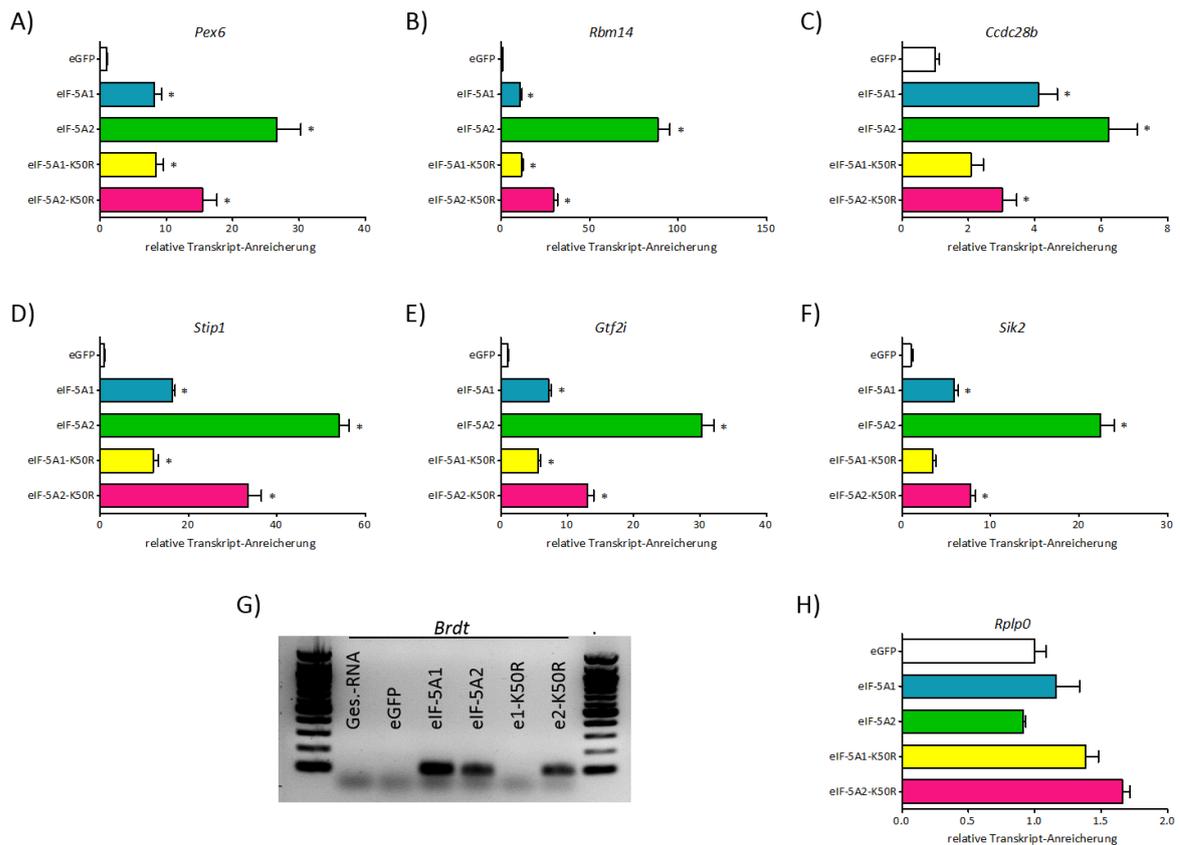
verglichen. Dabei war der Anteil von Transkripten für Proteine mit mehr als vier konsekutiven Prolinresten minimal höher als statistisch erwartet.

Dagegen war ein anderes Protein-Strukturmotiv verstärkt innerhalb der korrespondierenden Proteine der Hypusin-abhängig aufgereinigten Transkripte vertreten (Up-Seq-Feature-Analyse). Isoform-unspezifisch ließen sich Transkripte für Produkte mit *WD-Repeat*-Domänen aufreinigen. Dabei waren alle sieben *WD-Repeat*-Domänen (1 – 7) der *WD40*-Proteine vertreten (Abbildung 3-44 B-C). Ein Sequenzmotiv innerhalb der kopräzipitierten RNAs konnte dagegen weder mit dem DRIM- noch FIRE-Algorithmus identifiziert werden.

Die *Microarray*-Analyse der mit eIF-5A-Proteinen kopräzipitierten mRNAs ergab eine signifikante Anreicherung einer Gruppe von Transkripten. Einige dieser Transkripte wurden von allen eIF-5A-Proteinen aufgereinigt, andere Isoform-spezifisch oder Hypusin-abhängig. Vermehrt kopräzipitiert wurden Transkripte, deren Produkte bei metabolischen und zellulären Prozessen, insbesondere dem Energiestoffwechsel, eine Rolle spielen. Eine große Anzahl von Transkripten kodiert Proteine, die in Organellen wie dem Mitochondrium lokalisiert sind und zum Teil das mitochondriale Transit-Peptid enthalten. Während keine RNA-Sequenzmotive gefunden werden konnten und Transkripte für Proteine mit konsekutiven Prolin-Resten nur minimal angereichert waren, wurde eine Anreicherung von Transkripten für Proteine mit *WD-Repeat*-Domänen festgestellt. Mit eIF-5A2 konnte zusätzlich eine Anreicherung von *DNA Damage Pathways* beobachtet werden.

#### 3.4.4 Validierung potentieller mRNA-Interaktionspartner

Um die *Microarray*-Ergebnisse zu validieren, wurde die Anreicherung einiger Transkripte in einem unabhängigen Satz von RIPs per qPCR überprüft und mit der durch eGFP unspezifisch aufgereinigten RNA verglichen. Dazu wurden einerseits Kandidaten mit einer starken Anreicherung gegenüber der Gesamt-RNA (*Pex6*, *Rbm14*, *Ccdc28b*) sowie Kandidaten mit sieben bis 15 konsekutiven Prolinresten (*Stip1*, *Gtf2i*, *Sik2*, *Brdt*) untersucht. Bei allen getesteten Kandidaten konnte in der qPCR eine deutliche Anreicherung gegenüber der Hintergrundkontrolle festgestellt werden (Abbildung 3-46).



**Abbildung 3-46: Validierung der Microarray-Ergebnisse.** A-F) Nach erneuter RIP mit den verschiedenen eIF-5A-Proteinen wurde die Anreicherung einiger im Microarray gefundener Transkripte per qPCR überprüft. Als Kontrolle für die qPCR-Reaktion wurde Gesamt-RNA verwendet. Die Ergebnisse wurden dann auf die durch eGFP-unspezifisch aufgereinigte RNA normiert. Dabei konnte eine signifikante Anreicherung der *Pex6*-, *Rbm14*- und *Ccdc28b*-mRNA (A-C) sowie der für Proteine mit vielen konsekutiven Prolinresten kodierenden mRNAs *Stip1*, *Gtf2i* und *Sik2* (D-F) gefunden werden. G) Auch die *Brdt*-mRNA, die ein Protein mit 15 konsekutiven Prolin-Resten kodiert, war in den RIP-Ansätzen angereichert, während sie weder im eGFP-RIP-Ansatz noch in der Gesamt-RNA detektiert werden konnte. H) Die Anreicherung dieser Transkripte war spezifisch und kein genereller Effekt, da es zu keiner Anreicherung der Housekeeping Gene-mRNA von *Rplp0* kam. *Pex6*: peroxisomal biogenesis factor 6), *Rbm14*: RNA binding motif protein 14, *Ccdc28b*: coiled coil domain containing 28B, *Stip1*: stress induced phosphoprotein 1, *Sik2*: salt inducible kinase 2, *Gtf2i*: general transcription factor Iii, *Brdt*: Bromodomain testis-specific protein, *Rplp0*: ribosomal protein large P0. Signifikante Abweichungen gegenüber der Hintergrundkontrolle sind mit \* gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

Um auszuschließen, dass es zu einer generellen Anreicherung von mRNAs gekommen war oder die qPCR dieser Proben besser funktionierte als bei der Hintergrundkontrolle, wurde auch das Housekeeping Gene *Rplp0* getestet (Abbildung 3-46 H). Hier konnte keine Anreicherung in den mit eIF-5A-präzipitierten Ansätzen gefunden und damit gezeigt werden, dass die Anreicherung der untersuchten Kandidaten-Transkripten spezifisch war.

Mittels qPCR konnte die Anreicherung spezifischer Transkripte bei der RIP mit eIF-5A-Proteinen bestätigt werden. Die untersuchten Transkripte zeigten eine signifikante Erhöhung

gegenüber der Hintergrundkontrolle. Die Spezifität dieser Anreicherung konnte durch den Vergleich mit einem *Housekeeping Gene* gezeigt werden.

## 4 Diskussion

Posttranslationale Modifikationen (PTMs) von Proteinen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Proteinfunktionen, indem sie die Aktivität, Lokalisation oder Interaktion mit anderen Molekülen regulieren können (zusammengefasst in<sup>2</sup>). Durch ihre Dynamik, Kombinationsmöglichkeiten und teilweise Reversibilität ergibt sich daraus eine feinabgestimmte Regulationsmöglichkeit der zellulären Aktivität. Unter den über 200 bekannten PTMs befinden sich neben den häufiger vorkommenden auch drei einzigartige Modifikationen, die jeweils nur in einem an der Translations-Elongation beteiligten Protein vorkommen. Zu diesen gehört neben der Ethanolamin-Phosphoglycerol-Modifikation des eukaryotischen Elongationsfaktors 1A (eEF-1A) und der Diphthamid-Modifikation des eukaryotischen Elongationsfaktors 2 (eEF-2) die Hypusin-Modifikation von eIF-5A<sup>4</sup>.

Obwohl eIF-5A und seine Hypusin-Modifikation essentiell für die zelluläre Proliferation sind, ist die jeweilige Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt. Da sie zudem bei der Entstehung von Tumorerkrankungen, Diabetes und bei der HIV-Infektion eine wichtige Rolle spielen, stellt die Hypusin-Modifikation eine aussichtsreiche neue Zielstruktur für die Entwicklung von Therapieverfahren dar<sup>50,62,65,68,96</sup>. Um detailliertere Kenntnis über die Bedeutung der Hypusin-Modifikation im Säugerorganismus sowie über die molekularen Grundlagen seiner Funktion zu erhalten, wurden in dieser Arbeit konditionale *Knockout*-Mausmodelle für die Hypusin-Modifikation etabliert und analysiert sowie interagierende mRNAs identifiziert. Die dabei gewonnenen Daten liefern eine Vielzahl von Ansatzpunkten für weitere Untersuchungen, die nun u. a. mithilfe der generierten Mausmodelle möglich sind.

## 4.1 Das DHS-Enzym ist essentiell für die Viabilität von Säugern

### 4.1.1 Der konstitutive *Dhs-Knockout* führt zu embryonaler Letalität

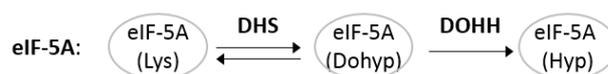
In der vorliegenden Arbeit konnte die erste konditionale *Knockout*-Mauslinie für das *Dhs*-Gen generiert werden (siehe 3.1). In dieser Linie liegt das *Dhs*-Gen ubiquitär in gefloxter Form vor, wobei diese Modifikation keinerlei Beeinträchtigung zeigt. Durch entsprechende Verpaarungen mit Cre-Deleter-Mäusen lässt sich der größte Teil des *Dhs*-Gens entfernen, so dass der vollständige DHS-Verlust im Säugerorganismus untersucht werden kann.

Während an der Generierung dieser Linie gearbeitet wurde, wurde ein konstitutiver *Dhs-Knockout* in Mäusen publiziert<sup>51,118</sup>. Diese Arbeiten weisen jedoch mit einem gemischten Hintergrund und einem nicht-konditionalen Design zwei entscheidende Nachteile auf, so dass sich mit dieser Mauslinie bei embryonaler Letalität des *Dhs-Knockouts* die Rolle des *Dhs*-Gens weder nach der Embryonalentwicklung noch in spezifischen Geweben untersuchen lässt.

In der Tat konnte mit der erfolgreich etablierten konditionalen *Dhs*-Mauslinie erstmals im reinen C57BL/6-Hintergrund die embryonale Letalität des konstitutiven *Dhs-Knockouts* beobachtet werden (siehe 3.2.2). Dies bestätigt die Ergebnisse aus dem gemischten Hintergrund, in dem die embryonale Letalität bereits auf ein sehr frühes Stadium datiert werden konnte (zwischen E3,5 und E7,5)<sup>51,118</sup>. Zusammen mit den Beobachtungen, dass auch der konstitutive *Knockout* sowohl des *Eif-5a1*<sup>118</sup> als auch des *Dohh*-Gens<sup>97</sup> in einem frühen Stadium der murinen Embryonalentwicklung letal ist, legen die Ergebnisse nahe, dass vollständig hypusiniertes eIF-5A eine bedeutende Rolle während der frühen

Embryonalentwicklung von Säugetieren spielt.

Diese Ergebnisse passen gut zu der Beobachtung, dass in Eukaryoten die Bedeutung der vollständigen Hypusin-Modifikation von ein- zu



<i>S. cerevisiae</i>	×	×	-
<i>C. elegans</i>	×	×	×
<i>M. musculus</i>	×	×	×

**Abbildung 4-1: Essentielle Bedeutung des Hypusin-Systems in Eukaryoten.** Während die Inaktivierung des *Dohh*-Homologs in *S. cerevisiae* vital ist, ist in höheren Eukaryoten zusätzlich zum *Eif-5a*- und *Dhs*-Gen auch das *Dohh*-Gen essentiell (×).

mehrzelligen Organismen weiter zunimmt (Abbildung 4-1). Während bereits in *S. cerevisiae* die Deletion sowohl der *Eif-5a*-Homologe *TIF51A* und *TIF51B*<sup>28</sup> als auch des *Dhs*-Homologs *DYS1*<sup>29,30</sup> letal ist, führt die Inaktivierung des *Dohh*-Homologs *LIA1* in *S. cerevisiae* nur zu einer leichten Einschränkung des Wachstums<sup>17,31</sup>. Daraus lässt sich schließen, dass das Deoxyhypusin-haltige eIF-5A-Intermediat in einzelligen Eukaryoten alle essentiellen Funktionen von eIF-5A erfüllen kann. Schon in *C. elegans*<sup>32,33</sup> und *D. melanogaster*<sup>34,35</sup> ist dagegen auch das *Dohh*-Gen essentiell. Dies lässt vermuten, dass eIF-5A im Laufe der Entwicklung hin zu multizellulären Eukaryoten weitere essentielle Funktionen übernommen hat, für die die vollständige Hypusin-Modifikation benötigt wird, oder dass in höheren Eukaryoten eine stärkere Regulierung der eIF-5A-Aktivität benötigt wird.

Während aktuelle Untersuchungen über die funktionelle Bedeutung von posttranslationalen Protein-Modifikationen feststellten, dass nur ein kleiner Teil der Modifikationsstellen speziesübergreifend konserviert ist und eine signifikante biologische Bedeutung besitzt, haben konservierte Modifikationsstellen dagegen eine hohe regulatorische Relevanz<sup>124,125</sup>. Möglicherweise war die Hypusin-Modifikation in einer früheren Zeit eine verbreitete Modifikation<sup>4</sup>. Während die Hypusin-Modifikation anderer Proteine scheinbar aufgrund mangelnder Unverzichtbarkeit nicht konserviert wurde, muss dagegen die Bedeutung der Hypusin-Modifikation von eIF-5A so groß sein, dass es sich lohnt, diesen extrem aufwändigen Modifikationsweg mit zwei, nur für die Modifikation eines einzigen Proteins benötigten Enzymen aufrechtzuerhalten.

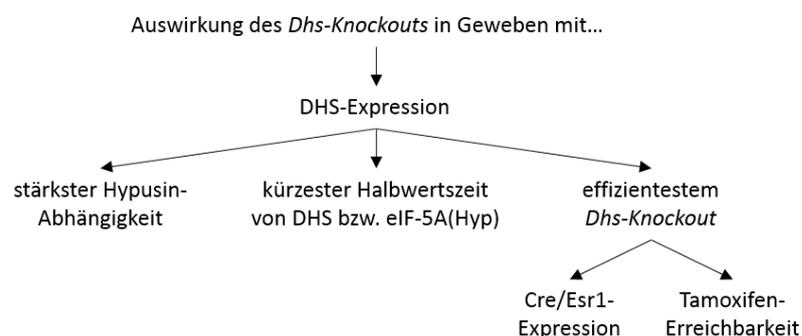
Mit der hier vorgestellten konditionalen *Dhs*-Mauslinie ist es nun in Verbindung mit einer Vielzahl an gut charakterisierten *Cre-Deleter*-Mäusen trotz der embryonalen Letalität möglich, die Bedeutung der Hypusin-Modifikation in diversen spezifischen Zelltypen oder zu einem bestimmten Zeitpunkt zu untersuchen. Beispielsweise könnte über Verpaarung mit der vom *Jackson Laboratory* erhältlichen Mauslinie B6.Tg(Ins2-cre/ERT)1Dam/J ein *Dhs-Knockout* in den Inselzellen des Pankreas erreicht werden und so die Rolle der Hypusin-Modifikation bei der Entstehung von Diabetes weiter untersucht werden. Zudem ermöglichte das konditionale Design, aus der generierten Mauslinie ein induzierbares *in vitro*-Modell für den *Dhs-Knockout* zu etablieren, so dass nun der vollständige DHS-Funktionsverlust auch in Zellkultur untersucht und dadurch die Anzahl an Tierversuchen reduziert werden kann. Die embryonale Letalität des *Dhs*-KOs kombiniert mit der vielfältigen Anwendbarkeit der konditionalen *Dhs*-KO-Linie

rechtfertigt also die im Vergleich zu Zinkfinger-<sup>126</sup> und TALE-Nukelasen<sup>127</sup> aufwändige Herstellungs-Strategie, da sie immer noch den Königsweg für konditionale Mutationen im Mausmodell darstellt.

#### 4.1.2 Das DHS-Enzym ist auch nach der Embryonalentwicklung essentiell

Nicht nur in der Embryonalentwicklung spielt das *Dhs*-Gen eine entscheidende Rolle. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die DHS-Funktion auch in juvenilen Mäusen essentiell ist (siehe 3.2.5). Die Wichtigkeit von eIF-5A und seiner Hypusin-Modifikation auch in adulten Geweben wurde zuvor durch die ubiquitäre Expression aller beteiligten Gene und die starken Auswirkungen von Hypusinierungs-Inhibitoren in Zellkultur<sup>11,12</sup> vorausgesagt.

Bei einem ubiquitär exprimierten Gen führt sein induzierter *Knockout* zuerst dort zu einem Phänotyp, wo sein Genprodukt die entscheidendste Rolle spielt, wo die Halbwertszeit des restlichen funktionellen Proteins am kürzesten ist und wo der *Knockout* am effizientesten stattfindet (Abbildung 4-2). Aufgrund der essentiellen Bedeutung von Hypusin für die zelluläre Proliferation kommen dafür fast alle Gewebe in Frage, möglicherweise sind aber stark proliferierende oder sich differenzierende Zelltypen stärker von hypusiniertem eIF-5A abhängig<sup>36,56</sup>.



**Abbildung 4-2: Faktoren, die die Auswirkung des induzierten *Dhs*-*Knockouts* bestimmen.** Neben der Expression von DHS sind die Hypusin-Abhängigkeit, die Halbwertszeit von hypusiniertem eIF-5A und die Effizienz des *Knockouts* in den verschiedenen Geweben entscheidend für die Auswirkung des *Dhs*-KOs.

Daten über die Halbwertszeit von DHS liegen bisher nicht vor, die Halbwertszeit von hypusiniertem eIF-5A ist gewebsspezifisch sehr unterschiedlich. Während in vielen

eukaryotischen Zellen eine Halbwertszeit von 20 Stunden und mehr beobachtet werden konnte<sup>128-130</sup>, beträgt diese beispielsweise in den Inselzellen des Pankreas nur etwa sechs Stunden<sup>50</sup>. Gewebe mit einer vergleichsweise kurzen Halbwertszeit wären also schneller vom *Dhs-Knockout* betroffen. Allerdings ist es denkbar, dass die Halbwertszeit von hypusiniertem eIF-5A oder DHS unter bestimmten Bedingungen verändert werden kann<sup>131</sup>, so dass Gewebe mit einer besonderen Abhängigkeit von hypusiniertem eIF-5A sich möglicherweise vorübergehend schützen könnten.

Für die Effizienz der durch Tamoxifen induzierten Cre-basierten Gendeletion ist zum einen die basale Expression der Cre-Rekombinase entscheidend, die maßgeblich vom verwendeten Promotor abhängt. Da die Cre-Rekombinase erst aktiv werden kann, wenn der fusionierte Östrogenrezeptor 4-Hydroxytamoxifen gebunden hat, ist auch die Erreichbarkeit des Gewebes durch Tamoxifen für die Ausführung der Gen-Deletion entscheidend.

Der aus dem *Immediate-early*-Verstärker von CMV und dem  $\beta$ -Aktin-Promotor aus Hühnern bestehende chimäre CAG-Promotor erlaubt eine weit verbreitete Expression des Cre/Esr1-Fusionsproteins, allerdings gilt dies beispielsweise nicht für die Leber<sup>101</sup>. Durch die gute Gewebegängigkeit von Tamoxifen und erfolgreiche Überwindung der Blut-Hirnschranke<sup>101</sup> ist davon auszugehen, dass der aktive Metabolit 4-Hydroxytamoxifen die meisten Gewebe erreichen kann. Vor allem in gut vaskularisierten Organen wie dem Herz, aber auch in Niere, Lunge, Pankreas, Darm und verschiedenen Gehirnbereichen kann jeweils in verschiedensten Zelltypen eine Cre-basierte Deletion beobachtet werden<sup>101</sup>. Auch die in dieser Arbeit gezeigte induzierte Deletion des *Dhs*-Gens verhielt sich entsprechend. In der Leber konnte ebenfalls keine Deletion detektiert werden, während in allen anderen untersuchten Organen bereits fünf Tage nach oraler Tamoxifengabe das deletierte Allel nachweisbar war (siehe Abbildung 3-21). Innerhalb der sehr kurzen Zeitspanne bis zum Ende der Versuche (fünf bis 14 Tage) konnte noch keine 100% Deletion des *Dhs*-Gens in den untersuchten Organen festgestellt werden. Zwar kann auch mit der oralen Gabe von Tamoxifen übers Futter eine der i. p.-Injektion vergleichbare Gen-Deletion erzielt werden<sup>132</sup>, allerdings werden dazu teilweise drei Wochen benötigt<sup>132,133</sup>. Unter *in vitro*-Bedingungen konnte in den generierten *Dhs*-MEFs durch 4-Hydroxytamoxifen in weniger als 48 Stunden eine vollständige Deletion des *Dhs*-Gens mit zeitnaher Abnahme der *Dhs*-Expression und der Hypusin-Modifikation von eIF-5A erzielt und damit die mögliche Effizienz des Systems aufgezeigt werden (siehe 3.2.4).

Da der induzierte *Dhs-Knockout* extrem schnell und zu einem Zeitpunkt, an dem die Gen-Deletion in den untersuchten Organen noch unvollständig ist, Letalität verursacht, hat möglicherweise schon die veränderte *Dhs*-Expression eine letale Wirkung. Wahrscheinlicher aber ist, dass der *Dhs-Knockout* in einigen sehr wichtigen Zelltypen ähnlich effizient wie in den MEFs erfolgt und so zur frühen Letalität des *Dhs-Knockouts* führt. Zusammengenommen lässt sich also feststellen, dass die Letalität des *Dhs-Knockouts* vermutlich von einem oder mehreren Zelltypen verursacht wird, die entweder besonders abhängig von einem konstanten *Dhs*-Expressionslevel sind oder die besonders abhängig von hypusiniertem eIF-5A und seiner Neusynthese sind und in denen zusätzlich der *Knockout* effizienter als in den untersuchten Organen erfolgt.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass der *Dhs-Knockout* in wenigen Zellen ausreicht, um Letalität auch in adulten Mäusen hervorzurufen, wurde durch die Durchlässigkeit des Tamoxifen-induzierbaren Systems erhalten. *Dhs<sup>p/p</sup>;CAG-cre/Esr1<sup>+</sup>*-Mäuse starben im Alter von ungefähr 16 Wochen, kein Tier dieses Genotyps wurde älter als 19 Wochen (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt trat dagegen bei Tieren mit *Dhs<sup>p/p</sup>*-Genotyp nicht auf, das bisher älteste Tier dieses Genotyps ist inzwischen 36 Wochen alt. Auch *Dhs<sup>+p</sup>;CAG-cre/Esr1<sup>+</sup>*-Tiere waren nicht betroffen. In den gestorbenen Tieren ist es vermutlich in einzelnen Zellen zu einer Tamoxifen-unabhängigen Rekombination gekommen, die bereits für die verwendete CAG-cre/Esr1-Linie beschrieben wurde<sup>101</sup>. Während in Embryonen an E9,5 weniger als 0,1% rekombinierte Zellen beobachtet wurden, ist unklar wie viele Zellen mit Tamoxifen-unabhängiger Rekombination im Laufe der Entwicklung akkumulieren. Jedenfalls reicht dieser Anteil an Zellen mit *Dhs*-Deletion offensichtlich aus, um Letalität in adulten Mäusen zu verursachen.

Bei einem ubiquitär wichtigen Gen wie *Dhs* ist es schwierig, die genaue Letalitätsursache seines *Knockouts* festzustellen. Die *Dhs*-Expressionsanalysen verschiedener Organe legten nahe, dass in diesen durch den noch unvollständigen *Dhs-Knockout* und eine vermehrte *Dhs*-mRNA-Expression noch keine verminderte DHS-Aktivität spürbar sein dürfte. Allerdings waren bei der Untersuchung Organe nur als Ganzes beurteilbar und es ließ sich nicht unterscheiden, ob es in einigen Zelltypen schon zu einem effektiven KO gekommen war. Die mangelnde Qualität der erhältlichen DHS-spezifischen Antikörper lässt eine immunhistochemische Beurteilung nicht zu. In einer histologischen Untersuchung von Leber, Milz, Niere, Knochenmark, Herz, Darm, Lunge, Pankreas, Knochen und Muskel konnte in den meisten

Organen (unter dem Vorbehalt der histologischen Sichtbarkeit) keine Ursache für den starken Phänotyp gefunden werden.

Vermutlich verursacht der *Dhs*-KO eine Störung der blutbildenden Zellen im Knochenmark (siehe Abbildung 3-23). Eine Abnahme dieser Zellen ist am vermehrten Fettanteil im Knochenmark sichtbar. Im peripheren Blut manifestiert sich eine Störung des Knochenmarks allgemein zuerst durch eine Störung der Thrombozyten oder Leukozyten, die eine deutlich kürzere Halbwertszeit als rote Blutkörperchen haben. In den KO-Tieren weisen Blutungen in der Niere auf eine solche Störung mit einer verminderten Blutgerinnung hin. Mäuse haben mit  $900 - 2000 \times 10^9$  Thrombozyten/L eine sehr hohe Anzahl zirkulierender Thrombozyten im Blut (Mensch:  $150 - 350 \times 10^9$  Thrombozyten/L). Die kernlosen Thrombozyten entstehen im Knochenmark durch Abschnürung aus Megakaryozyten. Ihre Lebensdauer beträgt bei Mäusen vier bis fünf Tage (zusammengefasst in<sup>134</sup>). Könnten durch den *Dhs-Knockout* keine Thrombozyten mehr nachgebildet werden, wäre die Thrombozytenanzahl schon etwa zwei Tage nach vollständig erfolgtem *Knockout* halbiert. Die akute Letalität könnte dann durch Mikroblutungen in verschiedenen lebenswichtigen Organen wie der Niere oder dem Gehirn hervorgerufen worden sein, die beispielsweise zu Nierenversagen führen und die Schnelligkeit der *Dhs-Knockout* verursachten Letalität erklären. Um Belege für diese Vermutungen zu finden, sind die Anfertigung eines Blutausriches und die genauere Analyse des Knochenmarks, insbesondere der Megakaryozytopoese geplant. Des Weiteren soll das Blutbild nach Hinweisen auf Nierenversagen wie beispielsweise dem Anstieg von harnpflichtigen Stoffen wie Kreatinin untersucht werden. Durch Verwendung eines Hämatopoese- und eines Nieren-spezifischen *Knockout*-Modells könnte dann untersucht werden, ob der starke Phänotyp des *Dhs-Knockouts* von Knochenmarkszellen, von der Niere oder von einem Zusammenspiel aus beidem verursacht wird.

#### 4.1.3 Der DHS-Verlust hat stärkere Auswirkungen als der DOHH-Verlust

Auch der induzierte *Knockout* des zweiten Hypusinierungsenzyms *Dohh* führte in juvenilen Mäusen schnell zu einem letalen Phänotyp<sup>97</sup>. Auf Organebene zeigten sich je nach Individuum unterschiedliche histologische Auffälligkeiten wie Einblutungen im Darm oder starke

Lebernekrosen, die wie beim *Dhs*-KO auf eine Blutgerinnungsstörung mit resultierenden Organschädigungen als Letalitätsursache hinweisen (unveröffentlichte Beobachtungen aus dem Labor Balabanov).

Allerdings trat die durch den induzierten *Knockout* verursachte Letalität bei der *Dohh*-Mauslinie erst nach drei bis fünf Wochen auf, während *Dhs*-KO-Tiere bereits zwischen dem 5. und 14. Tag starben. Auch führte die Tamoxifen-unabhängige Rekombination, die in einem geringen Anteil von Zellen bei Verpaarung mit der CAG-cre/*Esr1*-Mauslinie auftritt<sup>101</sup>, nicht zum Tod der *Dohh*<sup>p/p</sup>;CAG-cre/*Esr1*<sup>+</sup>-Tiere. Während die meisten *Dhs*<sup>p/p</sup>;CAG-cre/*Esr1*<sup>+</sup>-Mäuse

**Tabelle 4-1: Vergleich des *Dhs*- und *Dohh*-Knockouts.** Sowohl das *Dhs*- als auch das *Dohh*-Gen sind während und nach der Embryonalentwicklung essentiell, der KO des *Dhs*-Gens wirkt sich dabei schneller und stärker aus.

	<i>Dhs</i>	<i>Dohh</i>
Heterozygoter KO	Viabel, fertil	Viabel, fertil
Homozygoter KO	Embryonal letal <E8,5	Embryonal letal <E9,5
Induzierter KO	Letal d5 – d14	Letal d20 – d35
Spontaner KO	Letal w16 – w19	Viabel (w47)

im Alter von ungefähr 16 Wochen verstarben und maximal 19 Wochen alt wurden, zeigte sich bei den *Dohh*-Tieren keine solch erhöhte Mortalität. Die ältesten *Dohh*<sup>p/p</sup>;CAG-cre/*Esr1*<sup>+</sup>-Tiere sind inzwischen 47 Wochen alt (unveröffentlichte Beobachtungen aus dem Labor Balabanov).

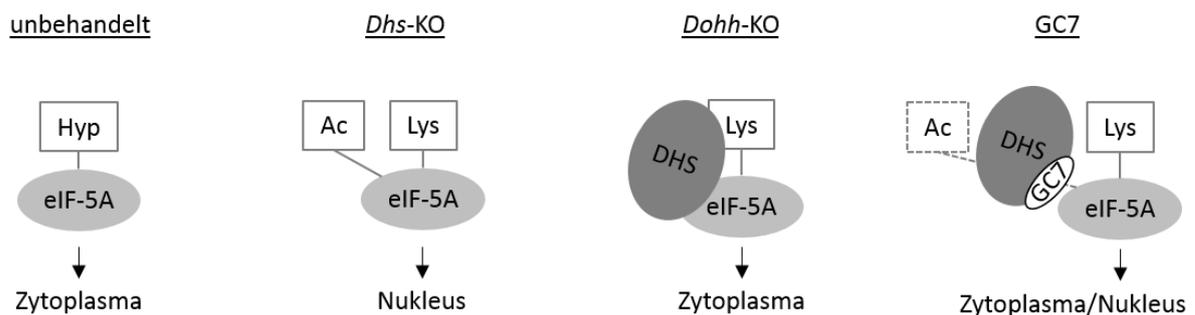
In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Verlust des ersten

Hypusinerungsenzyms DHS eine deutlich schnellere und stärkere Auswirkung auf das Überleben der Tiere hat als der *Dohh*-KO (Tabelle 4-1). Daher lässt sich vermuten, dass DHS das Schlüsselenzym für die Hypusin-Synthese darstellt mit einer stärker regulierten Expression und möglicherweise einer kürzeren Halbwertszeit. Denkbar ist auch, dass beim *Dohh*-KO das Deoxyhypusin-haltige eIF-5A-Intermediat einige der essentiellen Funktionen von eIF-5A ausführen kann, so dass sich der Verlust der DOHH in juvenilen Tieren erst nach längerer Dauer zeigt und in adulten Mäusen offensichtlich einige Zellen ohne DOHH-Enzym tolerierbar sind, während dies nicht für den DHS-Verlust gilt. Auch in *D. melanogaster* zeigt der DOHH-Verlust einen milderen Phänotyp als der Verlust des eIF-5A-Proteins<sup>35</sup>. Eine andere Erklärungsmöglichkeit könnte eine zusätzliche Hypusin-unabhängige Funktion der DHS sein, die ebenfalls durch den KO inhibiert oder verändert wird (siehe auch 4.1.5).

Bei der Aufklärung des Unterschieds zwischen *Dhs*- und *Dohh*-Knockout spielen auch die verschiedenen eIF-5A-Modifikationsformen eine Rolle. Während beim *Knockout* des ersten

Hypusinerungsenzyms *Dhs* kein Schritt der Hypusin-Modifikation stattfinden kann und nur der Lysin-haltige eIF-5A-Vorläufer in den Zellen gebildet wird, erlaubt der *Knockout* des zweiten Hypusinerungsenzyms *Dohh* die Bildung des Deoxyhypusin-haltigen eIF-5A-Intermediates. Aufgrund der Reversibilität des ersten, DHS-vermittelten Schritts und der offensichtlich geringen Stabilität des Intermediats liegt aber auch beim *Dohh-Knockout* vor allem der Lysin-haltige eIF-5A-Vorläufer in der Zelle vor<sup>33</sup>. Die beim *Dhs*- und beim *Dohh*-KO angereicherten Lysin-haltigen eIF-5A-Vorläuferproteine unterscheiden sich allerdings. Der *Dhs*-KO führt zu einem saureren eIF-5A-Vorläufer (siehe Abbildung 3-22), der sich vermutlich durch eine Acetylierung an Lys<sup>47</sup> vom durch den *Dohh*-KO<sup>97</sup> angereicherten eIF-5A-Vorläufer unterscheidet. Eine massenspektrometrische Überprüfung der Modifikation ist geplant. Bei der Verwendung des DHS-Inhibitors GC7 werden dagegen beide eIF-5A-Vorläuferformen angereichert (siehe Abbildung 3-19).

Die Acetylierung bestimmter Lysin-Reste gilt als dynamischer Regulationsmechanismus der zellulären eIF-5A-Aktivität und gewährleistet trotz der hohen Halbwertszeit von eIF-5A und der Irreversibilität der Hypusin-Modifikation eine schnelle und reversible Regulationsmöglichkeit<sup>13,14</sup>. Der durch die Acetylierung verursachte Verlust der essentiellen basischen Ladung an Lys<sup>47</sup> führt zur Inaktivität der acetylierten eIF-5A-Form<sup>135</sup> und zu ihrer Anreicherung im Nukleus. Hypusinerung an Lys<sup>50</sup> und Acetylierung von Lys<sup>47</sup> schließen sich dabei gegenseitig aus, vermutlich durch sterische Effekte der in enger Nachbarschaft auf der flexiblen Hypusin-Schleife liegenden Reste<sup>14</sup>.



**Abbildung 4-3: Auswirkung des *Dhs*- oder *Dohh*-Knockouts sowie des DHS-Inhibitors GC7 auf die Hypusin-Modifikation und die zelluläre Lokalisation von eIF-5A.** Während in unbehandelten Zellen überwiegend Hypusin-haltiges eIF-5A (Hyp) vorliegt, wird beim *Dhs-Knockout* vor allem der vermutlich acetylierte eIF-5A-Vorläufer (Ac+Lys) angereichert, beim *Dohh-Knockout* dagegen vor allem der nicht-acetylierte eIF-5A-Vorläufer (Lys). Da die Acetylierung eine nukleäre Lokalisation verursacht, unterscheidet sich die Lokalisation der beiden eIF-5A-Vorläufer. Der DHS-Inhibitor GC7 führt zur Anreicherung beider eIF-5A-Vorläuferformen.

Vermutlich verhindert die beim *Dohh*-KO weiter stattfindende Bindung von DHS an eIF-5A(Lys) dessen Acetylierung (Abbildung 4-3). Möglicherweise kann auch durch das Spermidin-Analog GC7 inhibiertes DHS weiter an eIF-5A(Lys) binden und es so teilweise vor der Acetylierung an Lys<sup>47</sup> schützen. Dahingegen ist beim *Dhs*-KO eIF-5A(Lys) frei zugänglich für Acetyltransferasen und kann durch die folgende Lokalisierung im Nukleus zudem keine möglicherweise Hypusin-unabhängigen Funktionen mehr im Zytoplasma ausüben. Dagegen könnte unhypusiniertes eIF-5A beim *Dohh*-KO aufgrund der fehlenden Acetylierung möglicherweise noch solche Funktionen ausüben und dies könnte eine weitere Erklärung für die weniger schnelle Letalität des *Dohh*-Knockouts sein.

Die Unterschiede des *Dhs*- und *Dohh*-Knockouts lassen sich möglicherweise auch darüber erklären, dass acetyliertes eIF-5A andere Bindungseigenschaften besitzt und daher mit anderen Proteinen interagieren kann. Beispielsweise dient acetyliertes Lysin als Andockstelle für Proteine mit Bromodomäne<sup>136</sup>, außerdem wird die basische Ladung von Lysin durch Acetylierung neutralisiert und die Bildung von Wasserstoffbrücken erschwert<sup>137</sup>. Das Vorhandensein der *in vivo*- und *in vitro*-Modelle für den *Dhs*- und *Dohh*-Knockout kann nun durch weitere vergleichende Experimente zur Aufklärung der Funktion der verschiedenen eIF-5A-Formen beitragen.

#### 4.1.4 Der DHS-Verlust löst einen Kompensationsmechanismus aus

Im Gegensatz zum starken Phänotyp des homozygoten *Dhs*-Knockouts ist der heterozygote *Dhs*-KO sowohl im, in dieser Arbeit gezeigten, reinen als auch im gemischten Hintergrund<sup>51</sup> unauffällig und zeigt keinen Gendosis-Effekt (siehe 3.2.1). Auch der heterozygote *Eif-5a1*<sup>-118</sup> und der heterozygote *Dohh*-Knockout<sup>33</sup> sind trotz des starken Phänotyps des homozygoten Knockouts unauffällig.

Daher stellt sich die Frage, ob eine erniedrigte DHS-Enzymmenge oder eine verringerte Menge an hypusiniertem eIF-5A ausreicht oder ob es einen Mechanismus zur Anpassung der *Dhs*- und *Eif-5a1*-Expression gibt. Während im gemischten Hintergrund eine Haploinsuffizienz des *Dhs*-Gens beschrieben wurde, die bei gleichbleibender eIF-5A-Menge zu einer um 50% reduzierten *Dhs*-Expression und Hypusin-Modifikation führte<sup>51</sup>, konnte in dieser Arbeit im reinen

Hintergrund ein *Feedback*- und Kompensationsmechanismus beobachtet werden, der einen möglichen Gendosis-Effekt des heterozygoten *Dhs*-KOs maskiert (siehe 3.2.3). In den meisten heterozygoten Geweben wurde deutlich mehr als die Hälfte an *Dhs*-mRNA exprimiert. Auch die *Dohh*- und *Eif-5a1*-Expression war in den meisten Geweben erhöht. Dadurch konnte die Hypusin-Modifikation von eIF-5A größtenteils aufrechterhalten werden, was vermutlich die Unauffälligkeit des heterozygoten *Dhs*-Knockouts hervorruft. Ähnliche Effekte konnten in heterozygot und homozygot geflochten MEFs und Mäusen nach KO-Induktion beobachtet werden.

Wodurch dieser Kompensationsmechanismus genau ausgelöst wird, ist unklar. Zelluläre Sensoren könnten durch verschiedene Mechanismen aktiviert werden wie z. B. einer reduzierten DHS-Menge, einem Mangel an hypusiniertem eIF-5A, einem Vorhandensein von acetyliertem, unhypusinierten eIF-5A oder einem Molekül, das im Signalweg stromabwärts von hypusiniertem eIF-5A liegt oder normalerweise durch dessen Aktivität beeinflusst wird. Auch veränderte Mengen an freiem Hypusin aus dem Abbau von eIF-5A könnten an der Signalübertragung beteiligt sein und möglicherweise durch Sekretion eine Veränderung in anderen Zellen auslösen.

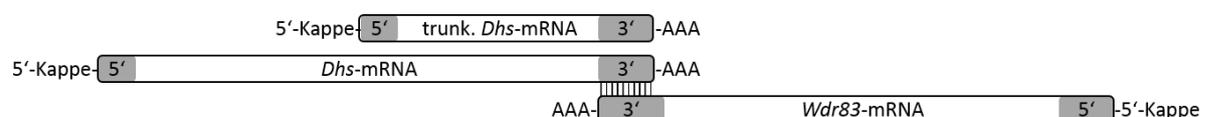
Die beobachteten Effekte wurden jedenfalls nicht von der konditionalen Modifikation des *Dhs*-Gens oder vom Cre-Transgen verursacht, da sich die Expression in MEFs vor der KO-Induktion nicht von der Wildtyp-Kontrolle unterscheidet (siehe Abbildung 3-18). Möglicherweise löst die verkürzte *Dhs*-mRNA oder ein eventuell entstehendes deletiertes DHS-Protein eine veränderte *Dhs*-Expression aus. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass alle Effekte darauf zurückzuführen sind, da auch ohne mutiertes *Dhs*-Gen ähnliche Effekte auftraten. So konnte beim *Knockout* von *Dohh* in *D. melanogaster*<sup>35</sup> und in der Maus<sup>33</sup> eine Hochregulation der eIF-5A-Expression beobachtet werden. Daher lässt sich schließen, dass die Signalübermittlung am wahrscheinlichsten über eIF-5A oder ein stromabwärts liegendes Molekül stattfindet. Im Folgenden könnten Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die dann zur vermehrten Transkription des *Dhs*-, *Dohh*- und *Eif-5a1*-Gens führen. Vermutlich enthalten die Promotoren dieser Gene also Bindungsstellen für die gleichen spezifischen Transkriptionsfaktoren. Es ist auch denkbar, dass die *Dhs*-, *Dohh*- und *Eif-5a1*-mRNA ein post-transkriptionales Operon<sup>138</sup> bilden und ihre Prozessierung, Lokalisierung, Translation oder Degradation gemeinsam durch ein mRNA-bindendes Protein reguliert wird.

Das Vorhandensein von *Feedback*- und Kompensationsmechanismen unterstreicht nochmals die Bedeutung der Hypusin-Modifikation. Während beim *Knockout* wichtiger Gene oft eine Kompensation durch andere Mitglieder derselben Genfamilie mit redundanter Funktion beobachtet wird<sup>139-141</sup>, kann hier nur ein möglicher Gendosis-Effekt durch die verstärkte Expression des gleichen Gens kompensiert werden, wozu ein funktionelles Allel existieren muss.

#### 4.1.5 Auch die Expression des *Wdr83*-Gens ist vom *Dhs-Knockout* betroffen

Bei der Generierung eines *Knockouts* durch gezielte Rekombination treten normalerweise keine *off-target*-Effekte auf. Allerdings werden einige Bereiche des Genoms zur Expression von mehr als einem Gen benötigt wie im Fall von überlappenden Genen<sup>142</sup>. Außerdem können nicht-kodierende Bereiche als regulatorische Elemente weit entfernter Gene funktionieren<sup>143</sup>.

Für das *Dhs*-Gen ist bereits bekannt, dass seine 3'-UTR mit dem des *Wdr83*-Gens überlappt und sich im humanen System beide mRNAs durch gegenseitige Stabilisation bidirektional regulieren<sup>117</sup>. Daher erfolgte das Design des *Dhs*-KOs so, dass keine Bereiche verändert wurden, die auch zum *Wdr83*-Gen gehörten und dass weiterhin eine verkürzte *Dhs*-mRNA exprimiert werden konnte, die die zur RNA-Duplexbildung benötigte 3'-UTR enthält (Abbildung 4-4).



**Abbildung 4-4: Duplexbildung zwischen der 3'-UTR der *Dhs*- und *Wdr83*-mRNA.** Auch die verkürzte *Dhs*-mRNA enthält den zur *Wdr83*-mRNA komplementären Bereich.

Die durch den Kompensationsmechanismus (siehe 4.1.5) hervorgerufene Hochregulation der *Dhs*-Expression beeinflusst nun allerdings auch die *Wdr83*-Expression (siehe 3.2.6). Die Menge an *Wdr83*-mRNA ist in Organen mit heterozygotem *Dhs*-KO ebenfalls erhöht, vermutlich wird dies aber nicht durch eine verstärkte Transkription, sondern durch eine erhöhte Stabilität der *Wdr83*-mRNA verursacht. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Komplexbildung mit der *Dhs*-mRNA Schutz vor dem Abbau durch das Exosom bietet und miRNA-Bindungsstellen

maskiert<sup>117</sup>. Die schwächere Korrelation der *Wdr83*-Expression mit der Expression der verkürzten *Dhs*-mRNA im Vergleich zur Wildtyp-*Dhs*-mRNA deutet darauf hin, dass dieser Stabilisierungseffekt bei Komplexbildung mit der vollständigen *Dhs*-mRNA stärker ausgeprägt ist.

Da die Überlappung des *Wdr83*- und *Dhs*-Gens in Eukaryoten konserviert ist<sup>117</sup>, scheint die koordinierte Regulation beider Gene eine funktionelle Bedeutung zu haben. Das bisher wenig untersuchte Protein WDR83 agiert als Gerüstprotein für multimere Proteinkomplexe und nimmt dadurch beispielsweise an der Regulation der Signaltransduktion über den ERK-MAPK-Signalweg<sup>144</sup> und über die Interaktion mit PHD3 an der Regulation von HIF-1<sup>145</sup> teil, und ist an der Polarisierung von Epithelzellen beteiligt<sup>146</sup>. Eine koordinierte Expression des *Wdr83*- und *Dhs*-Gens wäre dann sinnvoll, wenn beide Proteine an demselben oder an verwandten Prozessen teilnähmen, wenn beispielsweise WDR83 direkt als Gerüstprotein für die DHS-vermittelte Hypusin-Modifikation von eIF-5A dienen würde oder beide Proteine am selben Entwicklungsprozess beteiligt wären.

Falls es tatsächlich auf Protein-Ebene zu einer verstärkten WDR83-Expression kommt, ist davon auszugehen, dass auch innerhalb der Signaltransduktionskette stromabwärts von WDR83 gelegene Moleküle verändert sind. So könnte es zu einer verstärkten Aktivierung des ERK-MAPK-Signalwegs kommen oder zu einer veränderten Expression von HIF-1. Die aus dem verstärkten ERK-MAPK-Signalweg resultierende Wirkung auf Proliferation und Differenzierung wirkt damit vermutlich einem *Dhs-Knockout* entgegen und könnte einen weiteren Grund für das Ausbleiben eines Gendosis-Effektes beim heterozygoten *Dhs*-KO darstellen.

## 4.2 Das *Eif-5a2*-Gen ist nicht grundsätzlich essentiell

### 4.2.1 Der *Eif-5a2-Knockout* ist viabel, aber möglicherweise semi-letal bei Böcken

Mit der konditionalen *Eif-5a2*-Mauslinie<sup>98</sup> konnte in dieser Arbeit erstmals der Verlust des *Eif-5a2*-Gens im Säugerorganismus untersucht werden. Dabei konnte im reinen C57BL/6-Hintergrund gezeigt werden, dass Mäuse sowohl mit heterozygotem als auch homozygotem Verlust des *Eif-5a2*-Gens lebensfähig sind (siehe 3.3). Die Isoform eIF-5A2 ist also im Gegensatz zur Isoform eIF-5A1 nicht essentiell.

Bisher konnte keine Beeinträchtigung der lebenden *Eif-5a2-Knockout*-Tiere festgestellt werden. Da die ältesten Tiere mit homozygotem bzw. heterozygotem *Eif-5a2-Knockout* erst 20 bzw. 30 Wochen alt sind, ist es denkbar, dass sich der Verlust des *Eif-5a2*-Gens erst in höherem Alter bemerkbar machen könnte. Möglicherweise spielt eIF-5A2 nur unter bestimmten Stressbedingungen eine Rolle oder eIF-5A1 kann den eIF-5A2-Verlust in den meisten Situationen kompensieren, so dass eIF-5A2 nur bei ganz bestimmten Bedingungen essentiell ist (vergleiche 4.2.3).

Bislang existieren wenige Publikationen, die einen *Knockdown* von eIF-5A2 in Zellkultur untersucht haben. Gegen eIF-5A2 gerichtete siRNA führt in hepatozellulären Karzinomzellen zu einer reduzierten Proliferation<sup>69</sup> und einer reduzierten Motilität<sup>76,147</sup>. Diese Ergebnisse wurden allerdings mit transformierten Zellen erhalten, die im Gegensatz zu den meisten murinen Zellen eine starke eIF-5A2-Expression aufweisen, so dass die Übertragbarkeit auf nicht-transformierte Zellen unklar ist.

Chen und Mitarbeiter beschreiben die Auswirkungen einer eIF-5A2-Überexpression in Mäusen, die zu einem beschleunigten Alterungsprozess (mit verminderter Wachstumsrate, verkürzter Lebensspanne und Osteoporose) ohne zelluläre Seneszenz, aber mit erhöhter p53-abhängiger chromosomaler Instabilität führt<sup>148</sup>. Ähnliche oder gegenteilige Auswirkungen konnten beim *Eif-5a2*-KO bisher nicht beobachtet werden (Tabelle 4-2). Falls für die genannten Effekte das Vorhandensein von eIF-5A2 entscheidend ist, sollten in den *Eif-5a2*-KO-Mäusen gegenteilige Auswirkungen sichtbar sein. Falls dagegen das eIF-5A2-Level entscheidend ist, sollten die *Eif-5a2*-KO-Tiere einen ähnlichen Phänotyp zeigen. Allerdings

wurden die publizierten Auswirkungen der eIF-5A2-Überexpression in nur zwei *Founder*-Linien untersucht und der Einfluss der Hypusinierung von eIF-5A2 vernachlässigt. Nur ein Teil des überexprimierten eIF-5A2-Proteins wurde in diesem Experiment hypusiniert, so dass die beobachteten Effekte auch durch nicht-hypusiniertes eIF-5A2 ausgelöst worden sein könnten, das möglicherweise ähnlich wie das vermutlich pro-apoptotisch wirkende unhyposinierte eIF-5A1<sup>61</sup> anderweitige Effekte haben könnte. Außerdem könnte die Expression von eIF-5A2 auch die Hypusin-Modifikation von eIF-5A1 kompetitiv reduzieren, so dass der exakte Auslöser für den beobachteten Phänotyp der eIF-5A2-Überexpression unklar ist.

**Tabelle 4-2: Auswirkungen von eIF-5A2-Überexpression bzw. –*Knockdown* und *Eif-5a2-Knockout*.** Während *in vitro* der eIF-5A2-*Knockdown* partiell das Gegenteil der eIF-5A2-Überexpression zeigt, sind im Mausmodell bei der eIF-5A2-Überexpression im Gegensatz zum *Eif-5a2-Knockout* keine geschlechtsspezifischen Effekte sichtbar.

	eIF-5A2-Überexpression	eIF-5A2- <i>Knockdown</i> bzw. <i>Eif-5a2-Knockout</i>
<i>In vitro</i>	Beschleunigtes Wachstum von MEFs unter niedrig-Serum-Bedingungen	Reduzierte Proliferation und Motilität von Tumorzellen
<i>In vivo</i>	Beschleunigte Alterung, chromosomale Instabilität	Beeinträchtigung der Bock-Entwicklung, Gewichtssteigerung bei Weibchen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass beim *Eif-5a2-KO* insgesamt deutlich weniger Böcke mit heterozygotem und homozygotem *Eif-5a2-KO* geboren wurden als statistisch erwartet (siehe 3.3.3 und 3.3.4). Das Geschlechterverhältnis kann sich bei Nagetieren zu weniger Böcken hin verschieben, wenn sich das Muttertier in einem schlechteren Zustand befindet (bezogen auf Futterzufuhr, Stress etc.) (zusammengefasst in<sup>149</sup>). Um auszuschließen, dass das deletierte *Eif-5a2*-Allel in irgendeiner Form Stress für das Weibchen bedeutet, müsste man ausschließlich Wildtyp-Weibchen mit KO-Böcken verpaaren und untersuchen, ob die festgestellten Unterschiede beim Geschlechterverhältnis weiterhin vorhanden sind. Vermutlich liegt die Ursache aber nicht bei dem Muttertier, da das Geschlechterverhältnis nur innerhalb der KO-Nachkommen und nicht innerhalb der Wildtyp-Nachkommen verschoben ist. Daher ist eher von einer selektiven Beeinträchtigung, entweder der Y-Chromosom-haltigen Spermien mit deletiertem *Eif-5a2*-Gen oder der Embryonalentwicklung der KO-Böcke auszugehen. So könnte das KO-Allel zu einer verlangsamten embryonalen Entwicklung oder einer stärkeren Anfälligkeit gegenüber Stress führen, so dass es zu einer verstärkten Resorption dieser Embryonen kommt. Da sich männliche und weibliche Mausembryonen erst ab E10,5 unterscheiden<sup>150</sup> und keine tot

geborenen Embryonen gefunden wurden, findet die Resorption der männlichen KO-Embryonen möglicherweise kurz nach der geschlechtsspezifischen Differenzierung statt. Um diesen möglicherweise semi-letalen Phänotyp genauer zu charakterisieren, müsste die Genotyp- und Geschlechterverteilung an einer größeren Tierzahl sowie zu verschiedenen Zeitpunkten in der Embryonalentwicklung untersucht werden.

Warum der Verlust des *Eif-5a2*-Gens eine Beeinträchtigung von nur männlichen Embryonen darstellt, in überlebenden Böcken aber keinerlei Veränderung gegenüber Wildtyp-Kontrolltieren zeigt, ist völlig unklar. Aufgrund der Geschlechtsspezifität der Beeinträchtigung und da *Eif-5a2* vor allem im Testis exprimiert wird, könnte die frühe Testis-Entwicklung eine Rolle spielen. Interessanterweise wurde im Muskel von adulten Böcken eine gegenüber Weibchen erhöhte Expression von Genen des Polyamin-Metabolismus gefunden<sup>151</sup>. Auch dies deutet darauf hin, dass Polyamine und möglicherweise hypusiniertes eIF-5A eine größere Rolle in Böcken spielen.

Eine weitere in dieser Arbeit dargestellte Beobachtung beim *Eif-5a2-Knockout* war die verstärkte Gewichtszunahme der hetero- und homozygoten *Eif-5a2*-Weibchen. Durch die Geschlechtsspezifität könnte dies ein Hinweis auf ein Zusammenspiel der Hypusin-Modifikation mit anabol- oder katabol-wirkenden Sexualhormonen sein. Ein anderer Grund für die verstärkte Gewichtszunahme könnte in verminderter Körperaktivität bestehen, was möglicherweise ebenfalls von Hormonen beeinflusst worden sein kann. Dies würde bedeuten, dass die Hormonproduktion oder -regulation in den *Eif-5a2*-KO-Tieren verändert sein müsste, möglicherweise spielen dabei in der Hypophyse gebildete Hormone eine Rolle. Dass eIF-5A2 vor allem im adulten Gehirn exprimiert wird<sup>39</sup>, könnte die verzögerte Ausbildung dieses Phänotyps erklären.

#### 4.2.2 Die *Eif-5a2-Knockout*-Mäuse sind fertil

Da die Polyamin-Level im Testis stark reguliert werden und wichtig für die Fertilität von Säugern sind (zusammengefasst in<sup>152</sup>) und da eIF-5A2 vor allem im Testis exprimiert wird<sup>39</sup>, stellt sich die Frage, ob eIF-5A2 eine Rolle bei der Fortpflanzung spielt.

In *C. elegans* ist das eIF-5A2 Homolog IFF-1 für die Keimzellproliferation und Gametogenese essentiell<sup>153</sup>. In einem *Screening* von humanen Individuen mit Azoo- oder Oligospermie wurden vereinzelt Mutationen des *Eif-5a2*-Gens festgestellt, deren Bedeutung allerdings unklar ist<sup>154</sup>. Auch die Identifizierung von *Brdt*, dessen Genprodukt bei der Regulation der Spermatogenese mitwirkt, als potentiell mRNA-Interaktionspartner von eIF-5A in der durchgeführten RIP-Chip-Analyse, liefert eine weitere Verbindung zur Reproduktion.

Erste Ergebnisse mit der *Eif-5a2*-Mauslinie zeigten jedoch, dass sowohl homozygote KO-Böcke als auch -Weibchen in der Lage sind, mit Wildtyp-Tieren lebensfähige Nachkommen zu zeugen. Ob die Fertilität oder Fekundität dabei eingeschränkt sind, lässt sich zurzeit aufgrund der geringen Anzahl an Verpaarungen nicht ableiten. Eine Analyse der Wurfgröße und der Anzahl von Würfen pro Zeit bei einer größeren Anzahl von Verpaarungen sowie die histologische Analyse des Testis könnten weiteren Aufschluss geben. Auch ist es denkbar, dass ein *Eif-5a2*-KO-verursachtes Defizit durch das Wildtyp-Elternteil kompensiert wird, beispielsweise durch die uterine Umgebung der Wildtyp-Mutter. Um dies auszuschließen, werden aktuell homozygote KO-Weibchen und -Böcke miteinander verpaart.

Möglicherweise kann eIF-5A1 in den *Eif-5a2*-KO-Tieren eine basale Funktion von eIF-5A2 bei der Reproduktion übernehmen und so die Fortpflanzung sicherstellen, während eIF-5A2 nur für die Optimierung der Reproduktion eine Rolle spielt. Oder die Hypusin-Modifikation könnte vielmehr der entscheidende Faktor für die Fertilität sein. Dies konnte bisher aufgrund der durch den *Dhs*- oder *Dohh*-KO verursachten Letalität nicht untersucht werden. Die generierten konditionalen *Dhs*- und *Dohh*-KO-Mauslinien in Verbindung mit einer *Cre-Deleter*-Linie, die zur induzierbaren und Testis-spezifischen<sup>155</sup> *Dhs*- oder *Dohh*-Deletion führt, erlauben nun diese Untersuchung. Andererseits ist es auch denkbar, dass Polyamine ausschließlich eine Hypusin-unabhängige Funktion bei der Reproduktion ausüben, allerdings ist dies aufgrund der vorwiegenden Expression von eIF-5A2 im Testis unwahrscheinlich.

#### 4.2.3 Das *Eif-5a2*-Gen muss einen Vorteil bringen

Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen des *Eif-5a2-Knockouts* im Säugermodell zeigt sich, dass der Verlust des *Eif-5a2*-Gens keine besondere Beeinträchtigung darstellt. Dagegen ist seine Expression mit Tumorerkrankungen und Metastasierung verbunden und *Eif-5a2* als

Onkogen postuliert<sup>71,80</sup>, so dass der Verlust dieses Gens möglicherweise sogar vorteilhaft ist. Eine reduzierte Tumoranfälligkeit der *Eif-5a2*-KO-Tiere muss allerdings experimentell noch bestätigt werden. Dies könnte durch Einkreuzen einer Mauslinie, die aufgrund einer genetischen Veränderung vermehrt Tumoren bildet, untersucht werden. Beispielsweise könnte die Anfälligkeit für hepatozelluläre Karzinome, bei denen häufig eine eIF-5A2-Überexpression zu beobachten ist<sup>76</sup>, durch Einkreuzen einer *c-myc* überexprimierenden Mauslinie<sup>156</sup> untersucht werden.

Insgesamt stellt sich also die Frage, welche funktionelle Bedeutung das *Eif-5a2*-Gen hat. Die Gene der beiden eIF-5A-Isoformen sind vermutlich durch Genduplikation entstanden<sup>157</sup>. Sichtbar ist dies besonders an der fast identischen Exonstruktur; die UTRs und Intronlängen unterscheiden sich dagegen sehr. Damit nach einer Genduplikation beide Kopien im Genom konserviert werden, muss entweder die erhöhte Gen-Dosis von Vorteil sein oder die Funktion beider Kopien divergiert sein. Denkbar sind dabei u. a. eine Neofunktionalisierung, eine Subfunktionalisierung oder ein Schutzmechanismus vor zerstörerischen Mutationen (zusammengefasst in<sup>158</sup>). Für eIF-5A könnten alle drei Möglichkeiten in Betracht kommen (Tabelle 4-3).

**Tabelle 4-3: Erklärungsmöglichkeiten für die Konservierung einer *Eif-5a*-Genduplikation.** Genduplikationen werden im Genom konserviert, wenn die Verdopplung einen Vorteil darstellt, beispielsweise durch Sub- oder Neofunktionalisierung beider Kopien oder in Form eines Schutzmechanismus.

Subfunktionalisierung	Neofunktionalisierung	Schutzmechanismus
Organspezifisches Expressionsmuster von eIF-5A2	Testis- und Gehirn-spezifische Funktion von eIF-5A2 denkbar	Schutzfunktion für Testis und Gehirn denkbar

Die Subfunktionalisierung, bei der die Expression oder die Proteinfunktion unter beiden Kopien aufgeteilt ist, scheint zumindest bei *S. cerevisiae* zuzutreffen, bei der beide Isoformen revers in Abhängigkeit von der Sauerstoffverfügbarkeit exprimiert werden<sup>38</sup>. Die sehr verschiedenen UTRs der beiden Säuger-Isoformen legen eine unterschiedliche Regulation, beispielsweise durch miRNAs, nahe. Auch die Neofunktionalisierung, bei der eine Kopie weiterhin die bisherigen Funktionen erfüllt und die andere Kopie eine neue Funktion übernimmt, ist für eIF-5A denkbar. Allerdings konnte diese neue, möglicherweise gewebsspezifische Funktion bisher noch nicht identifiziert werden. Isoform-spezifische

Interaktionspartner auf mRNA- (vergleiche 4.3.5) und Proteinebene<sup>159</sup> liefern jedoch Hinweise für eine abweichende Funktion von eIF-5A2.

Vorstellbar ist auch, dass die zweite Kopie einen Schutzmechanismus vor Mutationen des essentiellen *Eif-5a1*-Gens bietet, so dass beim eIF-5A1-Verlust eIF-5A2 dessen Funktion kompensieren kann. Während in *S. cerevisiae* beide eIF-5A-Isoformen funktionell identisch sind<sup>37</sup> und beide humanen Isoformen das Wachstum von eIF-5A-defizienten Hefe-Zellen komplementieren können<sup>40</sup>, konnte in Säuger-Zellen bisher keine funktionelle Identität der Isoformen gezeigt werden. Im *Eif-5a1*-KO-Mausmodell<sup>118</sup> konnte eIF-5A1 nicht von eIF-5A2 ersetzt werden. Dies spricht gegen eine funktionelle Identität beider Isoformen, möglicherweise wird dies aber auch durch die fehlende eIF-5A2-Expression in den meisten Geweben<sup>40</sup> erklärt. Durch einen Testis- und Gehirn-spezifischen *Eif-5a1-Knockout* oder durch eine Kombination von *Eif-5a1-Knockout* und eIF-5A2-Überexpression könnte überprüft werden, ob die Isoformen funktionell identisch sind. Falls es sich also doch um einen Schutzmechanismus handelt, gilt dieser vermutlich nur für Testis und Gehirn, die möglicherweise besonders stark von eIF-5A abhängen. Die gewebsspezifische eIF-5A2-Expression könnte damit eine Balance zwischen Schutzmechanismus und Anfälligkeit für Tumorentstehung darstellen.

Zusammengenommen spricht die Kombination aus hoher Konservierung des *Eif-5a2*-Gens zusammen mit dem nicht-offensichtlichen Phänotyp des eIF-5A2-Verlustes dafür, dass eIF-5A2 entweder eine Rolle in spezifischen Situationen innehat, die bisher nicht untersucht wurden, oder dass eIF-5A2 an der Optimierung biologischer Prozesse, beispielsweise der Reproduktion, beteiligt ist, so dass Tiere mit eIF-5A2-Verlust unter natürlichen Bedingungen evolutionär benachteiligt wären.

## 4.3 Die mRNA-Interaktionspartner von eIF-5A tragen zum Verständnis seiner Funktion bei

### 4.3.1 Mit der RIP-Chip-Analyse wurden mögliche mRNA-Interaktionspartner identifiziert

Mit der RIP-Chip Methode wurde genomweit nach neuen mRNA-Interaktionspartnern von eIF-5A in NIH-3T3-Zellen gesucht und eine deutliche Anreicherung einer Gruppe von mRNAs erzielt. Da eIF-5A mit Ribosomen interagiert<sup>121</sup> wie auch an der Kopräzipitation der 18S- und 28S-rRNA sichtbar war, handelt es sich bei diesen Transkripten sowohl um direkt an eIF-5A gebundene mRNAs als auch um indirekt gebundene Ribosomen-assoziierte mRNAs (siehe 3.4.1). Letztere stellen dabei wie in der Ribotag-Methode<sup>160</sup> eine Momentaufnahme der gerade aktiv translatierten mRNAs einer Zelle dar. Im Gegensatz zu Methoden wie der systematischen Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (SELEX)<sup>92</sup>, die artifizielle RNA-Sequenzen verwenden, handelt es sich bei diesen Interaktionen um im zellulären Kontext gebildete, also physiologisch relevante Interaktionen. Dies bedingt allerdings, dass nur zu diesem Zeitpunkt exprimierte mRNAs auf eine Interaktion getestet werden könnten. Die HA-Epitop-Markierung der zu präzipitierenden Proteine ermöglichte eine Isoform- und Mutanten-spezifische mRNA-Kopräzipitation. Die unspezifische mRNA-Anreicherung war dabei gering. Während beispielsweise zytosolische ribosomale Proteine nicht angereichert wurden, konnten mitochondriale ribosomale Proteine spezifisch kopräzipitiert werden. Die hohe Sensitivität der Methode zeigte sich in der Detektion sehr schwach exprimierter mRNAs wie beispielsweise der *Brdt*-mRNA (siehe 3.4.4).

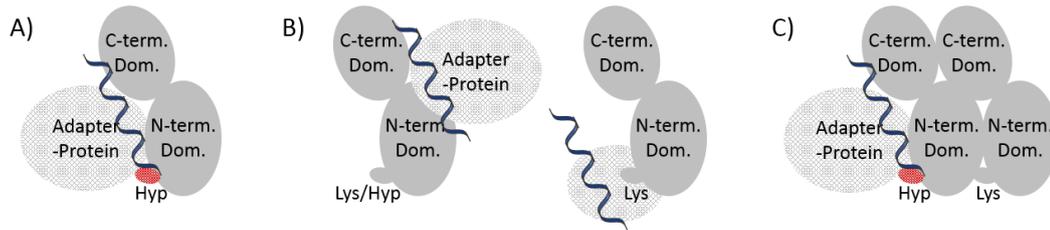
Allerdings muss anschließend die biologische Relevanz der eIF-5A-mRNA-Interaktionen untersucht werden. Hierzu wurde bereits ein shRNA-vermittelter *Knockdown* von eIF-5A etabliert, um über eine differentielle Gelelektrophorese (DIGE) Proteine zu identifizieren, mit deren mRNA eIF-5A nicht nur interagiert, sondern deren Translation tatsächlich auch durch eIF-5A beeinflusst wird und die auch beim *Knockout* des *Dhs*-Gens im Mausmodell eine Rolle spielen könnten. Mit der RIP-Chip-Analyse sollten damit die molekularen Grundlagen der eIF-5A-Funktion untersucht werden. Wichtige Aspekte bei diesen Analysen bestanden auch

darin, Unterschiede zwischen den beiden Isoformen sowie zwischen den hypusinierten und nicht-hypusinierten eIF-5A-Proteinen zu identifizieren.

#### 4.3.2 Die eIF-5A-mRNA-Interaktionen sind größtenteils Hypusin-abhängig

Bei der Ribonukleoprotein-Immunopräzipitation konnte eine starke Hypusin-Abhängigkeit der eIF-5A-mRNA-Interaktionen festgestellt werden (siehe 3.4.2). Etwa 60% der Interaktionen fanden Hypusin-abhängig statt. Die Hypusin-Abhängigkeit der Interaktion kann dabei entweder auf eine direkte Interaktion zwischen hypusiniertem eIF-5A und mRNA oder auf eine indirekte Bindung über einen Hypusin-abhängigen Protein-Interaktionspartner mit mRNA-Bindungsaktivität<sup>159</sup> zurückzuführen sein.

Die mit den K50R-Mutanten koprizipitierten mRNAs sind neben einer tatsächlich Hypusin-unabhängigen eIF-5A-mRNA-Interaktion möglicherweise auch auf eine partielle Dimerbildung zwischen endogenem eIF-5A1 und den HA-markierten eIF-5A-K50R-Mutanten zurückzuführen, über die so auch Hypusin-abhängige mRNAs koprizipitiert werden könnten. Während für eIF-5A-Proteine von höheren Eukaryoten keine Daten vorliegen, dimerisiert eIF-5A in *S. cerevisiae*, dabei ist allerdings strittig, ob bei der Dimerisierung neben der RNA-Abhängigkeit auch eine Hypusin-Abhängigkeit besteht<sup>44,161</sup>. Falls keine oder nur eine partielle Hypusin-Abhängigkeit vorliegt, könnten sich also Mischdimere bilden und auch durch die K50R-Mutanten Hypusin-abhängige mRNAs angereichert werden (Abbildung 4-5). Die Anreicherung dieser mRNAs sollte allerdings verglichen mit Wildtyp-eIF-5A wesentlich schwächer sein. Da aber aus technischen Gründen dieselben RNA-Mengen für die *Microarray*-Analyse eingesetzt werden müssen, also im Fall der K50R-Mutanten Material aus mehreren RIPs, werden quantitative Unterschiede zwischen Wildtyp-eIF-5A und Mutanten größtenteils nivelliert. Aufgrund der essentiellen Bedeutung der Hypusin-Modifikation lassen sich die K50R-Mutanten jedoch *in vivo* nicht ohne das Vorhandensein von endogenem eIF-5A1 untersuchen, so dass nur Versuche außerhalb des zellulären Kontextes den Einfluss von Mischdimeren ausschließen können.



**Abbildung 4-5: Hypusin-abhängige und -unabhängige mRNA-Interaktionspartner von eIF-5A.** A) Hypusin-abhängige mRNA-Interaktionspartner werden entweder direkt oder indirekt über ein Adapter-Protein an eIF-5A gebunden. B) Neben Hypusin-unabhängigen mRNA-Interaktionspartnern können über ein acetyliertes Lysin(50) bindende Adapter-Proteine Lysin-spezifische mRNA-Interaktionspartner gebunden werden. C) Während Hypusin-abhängige mRNA-Interaktionspartner nicht von den Lysin(50)-haltigen eIF-5A-K50R-Mutanten gebunden werden können, kann es möglicherweise dennoch über eine Mischdimerbildung aus Mutante und endogenem eIF-5A1 zu ihrer Aufreinigung kommen.

Dass die *Microarray*-Ergebnisse neben gemeinsamen Interaktionspartnern auch zusätzliche mRNAs für die K50R-Mutanten aufweisen, lässt sich durch den Anteil von acetylierten K50R-Mutanten mit einer veränderten Ladung und damit veränderten Bindungseigenschaften für mRNAs und Adapterproteine erklären. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ergibt sich durch den Einfluss der Hypusin-Modifikation auf die Lokalisierung des eIF-5A-Proteins<sup>162</sup>. Unhypusiniertes eIF-5A befindet sich im Gegensatz zu hypusiniertem eIF-5A auch im Nukleus und kann so in Kontakt mit anderen Interaktionspartnern kommen als hypusiniertes eIF-5A.

Bisher ist die mRNA-bindende Domäne im eIF-5A-Protein noch nicht genau identifiziert. Da einige Hypusin-abhängige mRNA-Bindungen beschrieben wurden<sup>123</sup> und auch in der RIP eine starke Hypusin-Abhängigkeit gefunden wurde, scheint der in der N-terminalen Domäne enthaltene Hypusin-Rest an der mRNA-Bindung beteiligt zu sein. Andererseits ähnelt die C-terminale Domäne einem bakteriellen Oligonukleotid-Bindungs-Motiv von *cold shock* Proteinen und kommt daher auch für die mRNA-Bindung infrage<sup>135</sup>.

Die RIP-Chip-Untersuchung zeigte zudem, dass mit der N-terminalen eIF-5A1-Domäne 71% der eIF-5A1-Transkripte gebunden werden können. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die direkte mRNA-Bindung über die N-terminale Domäne erfolgt und durch den Verlust der C-terminalen Domäne die über diese Domäne indirekt gebundenen mRNAs wegfallen. Aufgrund der fehlenden Unterscheidung zwischen direkter und indirekter mRNA-Bindung lässt sich dies allerdings nicht beweisen, sondern müsste beispielsweise mit isolierten rekombinanten Proteinen nachgewiesen werden. Die N-terminale eIF-5A1-Domäne interagiert, verglichen mit dem gesamten eIF-5A1-Protein, zudem mit einer Vielzahl

---

zusätzlicher mRNAs, was vermutlich auf dem deutlich basischeren isoelektrischen Punkt der isolierten N-terminalen Domäne basiert.

### 4.3.3 Die Bindung der mRNA-Interaktionspartner erfolgt vermutlich Struktur-abhängig

Im Gegensatz zu den mit der SELEX-Methode gefundenen artifiziellen RNA-Sequenzen<sup>123</sup> konnten in den mit der RIP-Chip-Methode angereicherten Transkripten keine RNA-Sequenzmotive gefunden werden. Entweder liegt das an einer Überdeckung durch indirekt-gebundene mRNAs oder die mRNA-Interaktionen von eIF-5A sind nicht Sequenz-, sondern Struktur-abhängig. Auch in einer Affinitätsaufreinigung mit anschließender *Differential Display*-PCR wurden für eIF-5A ausschließlich mRNAs gefunden, die komplexe Haarnadel-Strukturen bilden können<sup>120</sup>.

Kürzlich wurde eine Translations-fördernde Wirkung von eIF-5A speziell für mRNAs, die Proteine mit vier oder mehr konsekutiven Prolin-Resten kodieren, festgestellt<sup>25</sup>. In der RIP-Chip-Analyse zeigte sich nur eine leichte Anreicherung von entsprechenden Transkripten. Möglicherweise wurden unter den vorliegenden Bedingungen insgesamt nur wenige Prolin-reiche Proteine exprimiert, da diese wie in Bakterien vermutlich vor allem in spezifischen Situationen benötigt werden<sup>59,60</sup>, so dass es nicht zu einer stärkeren Anreicherung solcher Transkripte kommen konnte. Außerdem scheinen auch weitere Faktoren an der Translation Prolin-reicher Proteine beteiligt zu sein, da auch die Deletion des bakteriellen eIF-5A-Homologs EF-P in *Salmonella* nicht zu einer Herunterregulation aller Prolin-reichen Proteine führt<sup>163</sup>. Da die Translations-fördernde Wirkung von eIF-5A auf mRNAs für Prolin-reiche Proteine nicht vom Codon oder dem Kontext in der mRNA, sondern vom Prolinrest im naszierenden Protein abhängt<sup>164</sup>, ist auch hier nicht von einem Sequenzmotiv auszugehen. Denkbar ist, dass diese mRNAs ein Strukturmotiv besitzen, über das eIF-5A an sie bindet, oder dass eIF-5A pausierende Ribosomen erkennt.

Die Translation von mRNAs für Prolin-reiche Proteine stellt vermutlich nicht die einzige Situation am Ribosom dar, bei der eIF-5A benötigt wird. Neben konsekutiven Prolin-Resten<sup>165</sup> können auch Sekundärstrukturen in der mRNA, die Verwendung von seltenen Codons oder

positiv geladene Aminosäuren im entstehenden Protein die Translation verlangsamen<sup>166</sup>. Für das bakterielle eIF-5A-Homolog EF-P wurden bereits weitere Aminosäure-Motive entdeckt, deren Translation gefördert wird<sup>163</sup>. Auch die RIP-Chip-Analyse liefert einen Hinweis auf eine weitere Gruppe von Transkripten, deren Translation eIF-5A fördern könnte (siehe 3.4.3). Angereichert wurden WD-Repeat-Proteine, die meist sieben jeweils aus etwa 40 Aminosäuren bestehende WD40-Domänen besitzen, die sich zu einer 7-blättrigen  $\beta$ -Propeller-Struktur falten<sup>167</sup>. Auch hier ist aufgrund der geringen Konservierung auf Sequenzebene<sup>167</sup> nicht von einem RNA-Sequenzmotiv auszugehen, sondern ein Strukturmotiv bzw. die Erkennung von pausierenden Ribosomen durch eIF-5A denkbar.

Struktur motive zu finden ist wesentlich komplexer, da die RNA-Struktur nicht eindeutig aus der RNA-Sequenz vorhergesagt werden kann<sup>168</sup>. Über PAR-Clip, eine neuere Methode, bei der durch die vorherige Vernetzung von interagierendem Protein und mRNA in der mRNA T-zu-C-Mutationen an der vernetzten Position eingefügt werden, lässt sich die Bindungsstelle innerhalb der RNA durch Sequenzierung identifizieren<sup>94</sup>. Daher sollten sich mit dieser Methode Sequenz- oder Struktur motive einfacher finden lassen. Eventuell gefundene Motive könnten dann über Deletionsmutanten im *RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay* (REMSA) überprüft werden.

#### 4.3.4 Die mRNA-Interaktionspartner weisen auf eine Funktion von eIF-5A in metabolischen Prozessen hin

Durch die RIP-Chip-Analyse sollten neue Hinweise auf weitere Funktionen von eIF-5A erhalten werden. Da bei einer Hochdurchsatzmethode wie der *Microarray*-Analyse eine Vielzahl von Transkripten auf einmal analysiert werden kann, kann durch das Auffinden von Gruppen ähnlicher Transkripte leichter ein Rückschluss auf die funktionale Bedeutung erhalten werden.

Ein Großteil der koprizipitierten Transkripte fiel dabei in die Kategorie der metabolischen Prozesse (siehe 3.4.3). Angereichert wurden vor allem solche Transkripte, deren Proteinprodukte zentrale Bedeutung im Energiestoffwechsel haben. Dies legt die Vermutung nahe, dass eIF-5A die Translation von mRNAs für metabolische Prozesse und zelluläre Energiegewinnung reguliert. Dies würde zur essentiellen Rolle von eIF-5A bei der zellulären

Proliferation passen, da stark proliferierende Zellen mehr Energie und metabolische Produkte benötigen. Auch die Phänotypen der *Knockout*-Modelle passen zu diesen Daten. Bei einer Deletion des bakteriellen eIF-5A-Homologs EF-P in *Salmonella* sind vor allem metabolische Gene herunterreguliert<sup>163</sup>. In *D. melanogaster* löst der Verlust von hypusiniertem eIF-5A neben einer verkleinerten Zellgröße und Wachstumsdefekten trotz Nährstoffzufuhr Autophagie im Fettkörper der Larven aus, so dass von einer dauerhaften *Starvation Response* (Hungerstoffwechsel) auszugehen ist<sup>35</sup>. Auch der hier beschriebene induzierte KO des *Dhs*- oder *Dohh*-Gens in Mäusen deutet mit der starken Körpergewichtsabnahme und Letalität ohne große histologische Auffälligkeiten eher auf einen Wachstumsdefekt als auf Zellsterben durch Apoptose oder Nekrose hin.

Generell können metabolische Reaktionen in komplexen Organismen auf zellulärer Ebene durch allosterische Effekte oder durch posttranslationale Modifikationen der benötigten Enzyme sowie durch Kontrolle ihrer Transkription, Stabilität und Translation reguliert werden<sup>169</sup>. Aufgrund der bekannten Beteiligung von eIF-5A an der Translations-Elongation<sup>43</sup>, ist es denkbar, dass eIF-5A metabolische Reaktionen durch Förderung der Translation entsprechender mRNAs regulieren und so den Metabolismus an die zelluläre Proliferation anpassen kann.

Neben der Translations-fördernden Wirkung könnte eIF-5A mit seiner Ribosomen- und mRNA-Bindungsaktivität auch eine Rolle bei der Lokalisierung von mRNAs an spezifische Ribosomen spielen. In der RIP-Chip-Analyse zeigte sich eine Anreicherung von Proteinen mit mitochondrialer Lokalisation und/oder mitochondrialem Transit-Peptid (siehe Abbildung 3-44 und Abbildung 3-45). Nur sehr wenige mitochondriale Proteine werden von der mitochondrialen DNA kodiert und an den mitochondrialen Ribosomen translatiert. Die meisten mitochondrialen Proteine sind im Nukleus kodiert, werden im Zytoplasma translatiert und posttranslational ins Mitochondrium transportiert<sup>170</sup>. Es wird angenommen, dass zumindest einige Proteine nicht post-, sondern kotranslational ins Mitochondrium transloziert werden. Ihre Translation erfolgt dazu an spezialisierten Ribosomen, die mit der äußeren Mitochondrien-Membran assoziiert sind<sup>171</sup>. eIF-5A könnte die entsprechenden mRNAs zu diesen speziellen Ribosomen rekrutieren und so den Transport ihrer Genprodukte ins Mitochondrium gewährleisten. Ob eIF-5A auch an der Translation innerhalb der Mitochondrien beteiligt ist, ließ sich mit dem verwendeten *Microarray* nicht testen. Da aber

in einer eIF-5A-Protein-Interaktionspartnersuche<sup>159</sup> keine mitochondrialen ribosomalen Proteine identifiziert wurden, ist nicht davon auszugehen.

Da Mitochondrien durch oxidative Phosphorylierung 90% der zellulären Energie produzieren, zudem an der Häm-Biosynthese und dem Urea-Zyklus beteiligt sind und bei Apoptose eine Rolle spielen<sup>170</sup>, würde sich eine Störung der mitochondrialen Funktion dramatisch äußern. Eine Beteiligung von hypusiniertem eIF-5A an der abgestimmten Mitochondrien-Funktion ist gut denkbar, denn für die von eIF-5A-abhängige zelluläre Proliferation wird Energie benötigt. Falls die mRNA-Lokalisationsfunktion von eIF-5A Hypusin-abhängig ist, sollte man auch in den *Dhs*- und *Dohh*-KO-Mausmodellen, besonders in Organen mit hohem Energieverbrauch (Gehirn, Nervensystem, Herz, Skelettmuskulatur), Defekte sehen. Dieses könnte beispielsweise durch einen erhöhten Laktat Spiegel oder durch *Ragged-Red-Fibers* bei der Färbung einer nicht-fixierten Muskelbiopsie nachgewiesen werden<sup>172</sup>.

Eine Rolle von eIF-5A und Hypusin in der Regulation von metabolischen Prozessen und der Energiegewinnung kann auch die häufig beobachtete Überexpression von eIF-5A oder den Hypusinierungsenzymen bei Tumorerkrankungen<sup>65,68,71</sup> erklären. Denn die Anpassung des zellulären Metabolismus an die durch die erhöhte Proliferation veränderten Anforderungen (erhöhter Energieverbrauch und Makromolekülbedarf, vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies) ist ein wichtiges Kriterium für das Tumorwachstum<sup>173</sup>. So konnte beispielsweise schon vor fast einem Jahrhundert von Otto Warburg in Tumoren eine Umstellung in der ATP-Gewinnung von oxidativer Phosphorylierung hin zur Glykolyse festgestellt werden<sup>174,175</sup>. Signaltransduktionswege, die in Tumoren durch genetische Mutationen beispielsweise des *Myc*-Gens betroffen sind sowie die Mikroumgebung des Tumors haben oft einen Einfluss auf den Tumorzell-Metabolismus<sup>173</sup>. Auch hypusiniertes eIF-5A könnte über diesen Weg zum Tumorwachstum beitragen.

#### 4.3.5 Die eIF-5A2-spezifischen mRNA-Interaktionspartner liefern eine Verbindung zu seiner tumorigenen Wirkung

Die beiden eIF-5A-Isoformen eIF-5A1 und eIF-5A2 interagieren überwiegend mit den gleichen mRNAs, haben aber wie auf Proteinebene<sup>159</sup> auch Isoform-spezifische mRNA-

Interaktionspartner. Dies lässt sich durch die große strukturelle Ähnlichkeit - 82% Aminosäure-Identität - beider Proteine erklären. Unterschiede zwischen beiden Isoformen befinden sich vor allem in der C-terminalen Domäne des Proteins<sup>176</sup>. Da beide Domänen für die größtmögliche mRNA-Interaktion benötigt werden (siehe 4.3.2), ist es denkbar, dass gemeinsame Interaktionspartner über die N-terminale Domäne gebunden werden, während die Interaktion mit Isoform-spezifischen Interaktionspartnern über die C-terminale Domäne, möglicherweise indirekt über Adapter-Proteine, erfolgt. Während die gemeinsamen Interaktionspartner vermutlich für eine in Eukaryoten konservierte Funktion von eIF-5A wichtig sind, könnten die Isoform-spezifischen mRNAs bei einer spezialisierten Funktion der Isoformen eine Rolle spielen.

In der RIP-Chip-Analyse exklusiv mit eIF-5A2 aufgereinigte mRNAs können dabei zum einen von einer Isoform-spezifischen mRNA-Interaktion herrühren. Andererseits besteht aber auch die Möglichkeit, dass diese mRNAs erst durch die ektope Expression von eIF-5A2 in den NIH-3T3-Zellen exprimiert wurden, so dass eIF-5A2 nun im Gegensatz zu eIF-5A1 mit ihnen interagieren kann.

Unter den eIF-5A2-spezifischen mRNA-Interaktionspartnern sind Komponenten des *DNA Damage Pathways* angereichert (siehe Abbildung 3-43). So wurden vermehrt mRNAs des ATM-ATR- und des BRCA1/2-Signalwegs identifiziert. Viele dieser kopräzipitierten mRNAs kodieren Tumorsuppressoren (BRCA1/BARD1, P53, CHK2, DDB2, MSH2, MLH1). Aufgrund der tumorigenen Wirkung von eIF-5A2<sup>71,80</sup> ist daher nicht von einer Translations-fördernden Wirkung durch eIF-5A2 auszugehen. Möglicherweise hat eIF-5A2 eine deregulierende oder unterdrückende Wirkung auf die Expression dieser Tumorsuppressoren, beispielsweise in dem es die kodierenden mRNAs an falschen Orten lokalisiert, die Bindung wichtiger Interaktionspartner verhindert oder ihre Translation inhibiert. Dies könnte auch die chromosomale Instabilität in eIF-5A2-überexprimierenden Mäusen<sup>148</sup> und die onkogene Wirkung der eIF-5A2-Expression<sup>71,80</sup> erklären.

## 4.4 Fazit: Die Hypusin-Modifikation hat eine extrem hohe biologische Relevanz

Vor dem Hintergrund der bereits publizierten Untersuchungen zeigen die hier erhobenen Ergebnisse, dass die Hypusin-Modifikation von eIF-5A hochrelevant für eukaryotisches Leben ist. Die große biologische Bedeutung dieser Modifikation wird an verschiedensten Aspekten deutlich. Die Hypusin-Modifikation ist von einzelligen Eukaryoten bis zu Säugern evolutionär hoch konserviert und die Bedeutung der vollständigen Hypusin-Modifikation nimmt im Lauf der Evolution weiter zu, obwohl der Aufwand mit zwei nur für die Modifikation eines einzigen Proteins benötigten Enzymen sehr hoch ist. Eine Inaktivierung des *Eif-5a1*-, *Dhs*- oder *Dohh*-Gens hat dramatische Auswirkungen, bei einem heterozygoten Verlust verhindert ein Kompensationsmechanismus das Auftreten eines Gendosis-Effektes. Das nur in Testis und Gehirn exprimierte *Eif-5a2*-Gen ist dagegen nicht essentiell.

Mit den in der RIP-Chip-Analyse identifizierten mRNA-Interaktionspartnern lässt sich die essentielle Rolle von eIF-5A weiter erklären. Die Genprodukte der mRNA-Interaktionspartner sind überwiegend an metabolischen Prozessen und wichtigen Schritten der zellulären Energiegewinnung beteiligt. Besonders proliferierende Zellen sind demnach stark auf eIF-5A angewiesen.

In höheren Eukaryoten gibt es trotz der essentiellen Bedeutung von hypusiniertem eIF-5A keine redundanten Proteine oder Kompensation für den vollständigen Verlust, so dass die Hypusin-Modifikation eine Achillesferse für zelluläre Proliferation darstellt. Der Grund hierfür sowie für die starke Regulierung der eIF-5A-Aktivität besteht vermutlich darin, eine Überaktivität von eIF-5A, und damit unkontrolliertes Zellwachstum, zu verhindern. Der Zusammenhang von hypusiniertem eIF-5A mit der Tumorentwicklung lässt sich über seine mRNA-Interaktionspartner besser verstehen. Denn die Veränderung des zellulären Metabolismus ist ein entscheidendes Charakteristikum von Tumorzellen, die sich dadurch den veränderten Anforderungen anzupassen vermögen. Hypusiniertes eIF-5A könnte dabei einen Schalter für eine Reihe von metabolischen Prozessen darstellen, dessen Überaktivität die Tumorentstehung fördert, so dass eIF-5A und seine Hypusin-Modifikation eine potentiell wichtige Zielstruktur für neue Therapien darstellen.

## 4.5 Konsequenz: Die Inhibierung der Hypusin-Modifikation hat ein großes therapeutisches Potential

Da das Hypusin-System mit drei essentiellen Elementen (eIF-5A1, DHS, DOHH) und einem primär nicht-essentiellen Element (eIF-5A2) in Säugern mit der Entstehung verschiedener Krankheiten (Krebs, Diabetes, HIV) in Zusammenhang gebracht wird, stellt es eine gute Zielstruktur für neue Therapieansätze dar. Aufgrund der einzigartigen Hypusin-Modifikation von eIF-5A ergeben sich mehrere Möglichkeiten. Einerseits könnte ein *Knockdown* von eIF-5A angestrebt werden, andererseits könnte die Hypusinierung von eIF-5A verhindert werden. Hierbei bieten sich Inhibitoren der Hypusinierungsenzyme DHS oder DOHH an, aber auch Enzyme der Polyaminsynthese könnten inhibiert werden, letzteres hätte allerdings auch Hypusin-unabhängige Auswirkungen.

Während beim *Knockdown* von eIF-5A die von eIF-5A ausgeübten Funktionen nicht mehr erfüllt werden können, kommt es bei der Inhibierung der Hypusinierung zusätzlich zum Auftreten von unhyposiniertem, zum Teil acetyliertem eIF-5A, das möglicherweise eine Rolle bei der Apoptose-Induktion<sup>61</sup> spielt und daher therapeutisch wünschenswert ist. Denkbar ist auch eine Kombination beider Eingreifwege<sup>23</sup> wie bei der klinischen Studie (Phase 1b/2a) von Patienten mit multiplen Myelom<sup>62,177</sup>. Bei Erkrankungen, bei denen bekannt ist, wodurch eIF-5A zum Krankheitsbild beiträgt, beispielsweise bei Diabetes über den nukleären Export der iNOS-kodierenden mRNA, bieten sich weitere Möglichkeiten zur Intervention, die stromabwärts von hypusiniertem eIF-5A erfolgen könnten, beispielsweise über RNA-Interferenz vermitteltes *Silencing* der entsprechenden mRNA.

Wegen der essentiellen Bedeutung von eIF-5A und seiner Hypusin-Modifikation sind alle Zellen auf dessen Funktionalität angewiesen, so dass sich auch Tumorzellen oder Parasiten gut inhibieren lassen sollten. Problematisch ist dabei, dass die Hemmung unspezifisch ist und auch gesunde Zellen beeinträchtigt werden, so dass starke Nebenwirkungen zu erwarten sind. Daher müssen verschiedene Wege in Betracht gezogen werden, um die Spezifität der Hypusinierungs-Inhibition zu erhöhen.

- 
- Bei parasitären Erkrankungen wie Malaria lassen sich kleine Unterschiede in der Struktur der Hypusinierungsenzyme zwischen Parasiten und höheren Eukaryoten ausnutzen<sup>178</sup>, um Inhibitoren zu entwickeln, die eine höhere Affinität für die parasitären Enzyme besitzen. Genauso könnten Unterschiede zwischen eIF-5A und seinem bakteriellen Homolog EF-P ausgenutzt werden, um neue antimikrobielle Substanzen zu entwickeln.
  - Durch die spezifische Einbringung oder Aktivierung von Hypusinierungs-Inhibitoren in die Zielzellen (Tumorzellen, infizierte Zellen etc.) könnte die ungewünschte Wirkung auf gesunde Zellen minimiert werden. Bei der Gabe von Inhibitoren müsste dies über eine Kopplung beispielsweise an Aptamere<sup>179</sup>, die Oberflächenmarker der veränderten Zellen erkennen, erfolgen. Bei gentherapeutischen Verfahren könnte die Zellspezifität durch Promotoren erfolgen, so dass die Expression beispielsweise zellspezifisch in infizierten Zellen aktiviert wird.
  - Zellen mit erhöhter Proliferation wie beispielsweise Tumorzellen sollten stärker von hypusiniertem eIF-5A abhängen als Normalzellen, so dass sich diese mit einer submaximalen Hemmung der Hypusinsynthese bevorzugt treffen lassen. Allerdings würden dabei wie bei anderen Chemotherapien vermutlich alle stark proliferierenden Zellen getroffen. Durch den beschriebenen Kompensationsmechanismus könnten sich normalen Zellen vermutlich schützen, allerdings könnte die submaximale Inhibierung aufgrund dieses Kompensationsmechanismus möglicherweise nicht ausreichend sein.
  - Da Hinweise vorliegen, dass eIF-5A vermutlich besonders in Stress-Situationen benötigt wird<sup>59,60</sup>, könnten die veränderten Zellen mit einem Medikament vorgeschädigt werden, um eine höhere Wirkung der Hypusinierungs-Inhibitoren zu erreichen.
  - Aus den *Knockout*-Daten in Mäusen lässt sich schließen, dass eine Inhibierung der DOHH vermutlich mildere Auswirkungen hat als die Hemmung der DHS, so dass weniger gravierende Nebenwirkungen, möglicherweise aber auch eine geringere Effektivität zu erwarten sind. Bei der unspezifischen generellen Gabe wären daher aufgrund der vermutlich geringeren Nebenwirkungen DOHH-Inhibitoren sinnvoller. Bei der Zell-spezifischen Applikation wäre dagegen die DHS-Inhibition vorteilhafter.

- Aufgrund der im Mausmodell gezeigten nicht-essentiellen Bedeutung von eIF-5A2 zusammen mit der Überexpression gerade dieser Isoform in vielen Tumorzellen, wäre eIF-5A2 die optimale Zielstruktur für eine Tumorthherapie, so dass es wünschenswert wäre, spezifisch eIF-5A2 und seine Hypusin-Modifikation zu inhibieren. Über RNA-Interferenz könnte ein Isoform-spezifischer *Knockdown* erfolgen, da eIF-5A1 und eIF-5A2 besonders in der 3'-UTR viele Unterschiede aufweisen. Auf Proteinebene gestaltet sich die Isoform-spezifische Hemmung aufgrund der Ähnlichkeit der Isoformen insbesondere um die Hypusin-Schleife schwieriger, so dass es kaum möglich sein sollte, geeignete Unterschiede bei der Bindung der Hypusinierungsenzyme an die beiden eIF-5A-Isoformen zu finden. Allerdings könnte eine Isoform-spezifische Inhibierung von eIF-5A2 über eine kompetitive Inhibition von essentiellen Isoform-spezifischen Interaktionspartnern erfolgen.

## 5 Anhang

### 5.1 Abkürzungsverzeichnis

4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
Ac-	Acetyl-
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAC	Künstliches bakterielles Chromosom
BSA	Rinder-Serumalbumin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CAG	Zusammengesetzter Promotor aus dem <i>Immediate-early</i> -Verstärker von CMV und dem $\beta$ -Aktin-Promotor aus Hühnern
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Zytomegalie-Virus
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>Dhs</i>	Deoxyhypusin-Synthase (murines Gen)
DHS	Deoxyhypusin-Synthase (Protein)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>Dohh</i>	Deoxyhypusin-Hydroxylase (murines Gen)
DOHH	Deoxyhypusin-Hydroxylase (Protein)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E	Embryonaler Tag
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-P	Translations-Elongationsfaktor P

---

eGFP	verbessertes grünfluoreszierendes Protein
<i>Eif-5a</i>	eukaryotischer Initiationsfaktor 5A (murines Gen)
eIF-5A	eukaryotischer Initiationsfaktor 5A (Protein)
ERK	Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
ES	embryonale Stammzelle
Esr	Östrogen-Rezeptor
FCS	Fetales Kälber-Serum
FRT	Erkennungs-Sequenz für die Flp-Rekombinase
fwd	vorwärts
GAPDH	Glycerolaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC7	N <sup>1</sup> -Guanyl-1,7-diaminoheptan
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
Hyp	Hypusin
KO	<i>Knockout</i>
loxP	Erkennungs-Sequenz für die Cre-Rekombinase
<i>M(r)p</i>	mitochondriale (ribosomale) Proteine (murine Gene)
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MEFs	murine embryonale Fibroblasten
mRNA	Boten-RNA
MSCV	murines Stammzell-Virus
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
p. c.	Nach der Empfängnis
P-/A-/E-Stelle	Peptidyl-/Aminoacyl-/Exit-Stelle
PAR-CLIP	Quervernetzung und Immunpräzipitation verstärkt durch ein Photoaktivierbares Ribonukleosid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
PTM	Posttranslationale Modifikation
puro	Puromycin-Resistenzgen
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

rev	rückwärts
RIP	Ribonukleoprotein-Immunopräzipitation
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLR	<i>Signal Log Ratio</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UTR	Untranslatierte Region

## 5.2 Literaturverzeichnis

1. Jensen ON. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(6):391-403.
2. Deribe YL, Pawson T, Dikic I. Post-translational modifications in signal integration. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17(6):666-672.
3. Seo J, Lee KJ. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J Biochem Mol Biol.* 2004;37(1):35-44.
4. Greganova E, Altmann M, Bütikofer P. Unique modifications of translation elongation factors. *FEBS J.* 2011;278(15):2613-2624.
5. 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.* 1971;244(3):523-531.
6. Cooper HL, Park MH, Folk JE, Safer B, Braverman R. Identification of the hypusine-containing protein hy<sup>+</sup> as translation initiation factor eIF-4D. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(7):1854-1857.
7. Park MH, Cooper HL, Folk JE. The biosynthesis of protein-bound hypusine (N epsilon - (4-amino-2-hydroxybutyl)lysine). Lysine as the amino acid precursor and the intermediate role of deoxyhypusine (N epsilon -(4-aminobutyl)lysine). *J Biol Chem.* 1982;257(12):7217-7222.
8. Park M. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *J Biochem (Tokyo).* 2006;139(2):161-169.
9. Bosch J, Hol WGJ, Structural Genomics of Pathogenic Protzoa Consortium. Structural Analysis of Leishmania mexicana eukaryotic initiation factor 5a. PDB ID: 1XTD. 2004.
10. Park MH, Nishimura K, Zanelli CF, Valentini SR. Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids.* 2010;38(2):491-500.
11. Park M, Wolff E, Lee Y, Folk J. Antiproliferative effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase. Inhibition of growth of Chinese hamster ovary cells by guanyl diamines. *J Biol Chem.* 1994;269(45):27827-27832.
12. Hanauske-Abel HM, Park MH, Hanauske AR, Popowicz AM, Lalande M, Folk JE. Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1221(2):115-124.
13. Lee SB, Park JH, Folk JE, et al. Inactivation of eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A) by specific acetylation of its hypusine residue by spermidine/spermine acetyltransferase 1 (SSAT1). *Biochem J.* 2011;433(1):205-213.
14. Ishfaq M, Maeta K, Maeda S, Natsume T, Ito A, Yoshida M. Acetylation regulates subcellular localization of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *FEBS Lett.* 2012;586(19):3236-3241.
15. Abbruzzese A, Park M, Folk J. Deoxyhypusine hydroxylase from rat testis. Partial purification and characterization. *J Biol Chem.* 1986;261(7):3085-3089.
16. Joe YA, Wolff EC, Park MH. Cloning and expression of human deoxyhypusine synthase cDNA. Structure-function studies with the recombinant enzyme and mutant proteins. *J Biol Chem.* 1995;270(38):22386-22392.

17. Park JH, Aravind L, Wolff EC, Kaevel J, Kim YS, Park MH. Molecular cloning, expression, and structural prediction of deoxyhypusine hydroxylase: a HEAT-repeat-containing metalloenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(1):51-56.
18. Umland TC, Wolff EC, Park MH, Davies DR. 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*. 2004;279(27):28697-28705.
19. Wolff EC, Folk JE, Park MH. Enzyme-substrate intermediate formation at lysine 329 of human deoxyhypusine synthase. *J Biol Chem*. 1997;272(25):15865-15871.
20. Wolff E, Kang K, Kim Y, Park M. Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification. *Amino Acids*. 2007.
21. Park JH, Wolff EC, Folk JE, Park MH. Reversal of the deoxyhypusine synthesis reaction. Generation of spermidine or homospermidine from deoxyhypusine by deoxyhypusine synthase. *J Biol Chem*. 2003;278(35):32683-32691.
22. Lee CH, Um PY, Park MH. Structure-function studies of human deoxyhypusine synthase: identification of amino acid residues critical for the binding of spermidine and NAD. *Biochem J*. 2001;355(Pt 3):841-849.
23. Clement PM, Hanauske-Abel HM, Wolff EC, Kleinman HK, Park MH. The antifungal drug ciclopirox inhibits deoxyhypusine and proline hydroxylation, endothelial cell growth and angiogenesis in vitro. *Int J Cancer*. 2002;100(4):491-498.
24. Hanawa-Suetsugu K, Sekine S, Sakai H, et al. Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(26):9595-9600.
25. Gutierrez E, Shin BS, Woolstenhulme CJ, et al. eIF5A Promotes Translation of Polyproline Motifs. *Mol Cell*. 2013.
26. Park JH, Johansson HE, Aoki H, et al. Post-translational modification by  $\beta$ -lysylation is required for activity of *Escherichia coli* elongation factor P (EF-P). *J Biol Chem*. 2012;287(4):2579-2590.
27. Jansson BP, Malandrin L, Johansson HE. Cell cycle arrest in archaea by the hypusination inhibitor N(1)-guanyl-1,7-diaminoheptane. *J Bacteriol*. 2000;182(4):1158-1161.
28. Schnier J, Schwelberger HG, Smit-McBride Z, Kang HA, Hershey JW. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1991;11(6):3105-3114.
29. Sasaki K, Abid MR, Miyazaki M. Deoxyhypusine synthase gene is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 1996;384(2):151-154.
30. Park MH, Joe YA, Kang KR. Deoxyhypusine synthase activity is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1998;273(3):1677-1683.
31. Thompson GM, Cano VS, Valentini SR. Mapping eIF5A binding sites for Dys1 and Lia1: in vivo evidence for regulation of eIF5A hypusination. *FEBS Lett*. 2003;555(3):464-468.
32. Maeda I, Kohara Y, Yamamoto M, Sugimoto A. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol*. 2001;11(3):171-176.
33. Sievert H, Pällmann N, Miller KK, et al. EIF5A hypusination by DOHH regulates translation initiation and is crucial for embryonic development and oncogenic transformation. Manuscript submitted for publication.2013.
34. Spradling A, Stern D, Beaton A, et al. The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics*. 1999;153(1):135-177.

35. Patel P, Costa-Mattioli M, Schulze K, Bellen H. The *Drosophila* deoxyhypusine hydroxylase homologue nero and its target eIF5A are required for cell growth and the regulation of autophagy. *J Cell Biol.* 2009;185(7):1181-1194.
36. Parreiras-e-Silva LT, Luchessi AD, Reis RI, et al. Evidences of a role for eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in mouse embryogenesis and cell differentiation. *J Cell Physiol.* 2010;225(2):500-505.
37. Magdolen V, Klier H, Wöhl T, et al. The function of the hypusine-containing proteins of yeast and other eukaryotes is well conserved. *Mol Gen Genet.* 1994;244(6):646-652.
38. Schwelberger HG, Kang HA, Hershey JW. Translation initiation factor eIF-5A expressed from either of two yeast genes or from human cDNA. Functional identity under aerobic and anaerobic conditions. *J Biol Chem.* 1993;268(19):14018-14025.
39. Jenkins ZA, Haag PG, Johansson HE. Human eIF5A2 on chromosome 3q25-q27 is a phylogenetically conserved vertebrate variant of eukaryotic translation initiation factor 5A with tissue-specific expression. *Genomics.* 2001;71(1):101-109.
40. Clement PM, Henderson CA, Jenkins ZA, et al. Identification and characterization of eukaryotic initiation factor 5A-2. *Eur J Biochem.* 2003;270(21):4254-4263.
41. Benne R, Hershey J. The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem.* 1978;253(9):3078-3087.
42. Gregio A, Cano V, Avaca J, Valentini S, Zanelli C. eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;380(4):785-790.
43. Saini P, Eyler D, Green R, Dever T. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature.* 2009;459(7243):118-121.
44. Dias CA, Garcia W, Zanelli CF, Valentini SR. eIF5A dimerizes not only in vitro but also in vivo and its molecular envelope is similar to the EF-P monomer. *Amino Acids.* 2013;44(2):631-644.
45. Doerfel LK, Rodnina MV. Elongation factor P: Function and effects on bacterial fitness. *Biopolymers.* 2013.
46. Rosorius O, Reichart B, Kratzer F, Heger P, Dabauvalle MC, Hauber J. Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J Cell Sci.* 1999;112 ( Pt 14):2369-2380.
47. Lipowsky G, Bischoff FR, Schwarzmaier P, et al. Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *Embo J.* 2000;19(16):4362-4371.
48. Ruhl M, Himmelspach M, Bahr GM, 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.* 1993;123(6 Pt 1):1309-1320.
49. Bevec D, Jaksche H, Oft M, et al. Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. *Science.* 1996;271(5257):1858-1860.
50. Maier B, Ogihara T, Trace AP, et al. The unique hypusine modification of eIF5A promotes islet beta cell inflammation and dysfunction in mice. *J Clin Invest.* 2010;120(6):2156-2170.
51. Templin AT, Maier B, Nishiki Y, Tersey SA, Mirmira RG. Deoxyhypusine synthase haploinsufficiency attenuates acute cytokine signaling. *Cell Cycle.* 2011;10(7):1043-1049.
52. Moore CC, Martin EN, Lee G, et al. Eukaryotic translation initiation factor 5A small interference RNA-liposome complexes reduce inflammation and increase survival in murine models of severe sepsis and acute lung injury. *J Infect Dis.* 2008;198(9):1407-1414.

53. Kang HA, Hershey JW. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1994;269(6):3934-3940.
54. Zanelli CF, Valentini SR. Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant. *Genetics*. 2005;171(4):1571-1581.
55. Chatterjee I, Gross SR, Kinzy TG, Chen KY. Rapid depletion of mutant eukaryotic initiation factor 5A at restrictive temperature reveals connections to actin cytoskeleton and cell cycle progression. *Mol Genet Genomics*. 2006;275(3):264-276.
56. Dihazi H, Dihazi GH, Jahn O, et al. Multipotent adult germline stem cells and embryonic stem cells functional proteomics revealed an important role of eukaryotic initiation factor 5A (Eif5a) in stem cell differentiation. *J Proteome Res*. 2011;10(4):1962-1973.
57. Schrader R, Young C, Kozian D, Hoffmann R, Lottspeich F. Temperature-sensitive eIF5A mutant accumulates transcripts targeted to the nonsense-mediated decay pathway. *J Biol Chem*. 2006;281(46):35336-35346.
58. Zuk D, Jacobson A. A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. *Embo J*. 1998;17(10):2914-2925.
59. Robbins RD, Tersey SA, Ogihara T, 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;285(51):39943-39952.
60. Li CH, Ohn T, Ivanov P, Tisdale S, Anderson P. eIF5A promotes translation elongation, polysome disassembly and stress granule assembly. *PLoS One*. 2010;5(4):e9942.
61. Taylor CA, Sun Z, Cliche DO, 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*. 2007;313(3):437-449.
62. Taylor CA, Liu Z, Tang TC, et al. Modulation of eIF5A expression using SNS01 nanoparticles inhibits NF- $\kappa$ B activity and tumor growth in murine models of multiple myeloma. *Mol Ther*. 2012;20(7):1305-1314.
63. Sun Z, Cheng Z, Taylor CA, McConkey BJ, Thompson JE. Apoptosis induction by eIF5A1 involves activation of the intrinsic mitochondrial pathway. *J Cell Physiol*. 2010;223(3):798-809.
64. Chen G, Gharib TG, Thomas DG, et al. Proteomic analysis of eIF-5A in lung adenocarcinomas. *Proteomics*. 2003;3(4):496-504.
65. Balabanov S, Gontarewicz A, Ziegler P, et al. Hypusination of eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A): a novel therapeutic target in BCR-ABL-positive leukemias identified by a proteomics approach. *Blood*. 2007;109(4):1701-1711.
66. F Lam F, Jankova L, Dent OF, et al. Identification of distinctive protein expression patterns in colorectal adenoma. *Proteomics Clin Appl*. 2010;4(1):60-70.
67. Tunca B, Tezcan G, Cecener G, et al. Overexpression of CK20, MAP3K8 and EIF5A correlates with poor prognosis in early-onset colorectal cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013;139(4):691-702.
68. Preukschas M, Hagel C, Schulte A, et al. Expression of eukaryotic initiation factor 5A and hypusine forming enzymes in glioblastoma patient samples: implications for new targeted therapies. *PLoS One*. 2012;7(8):e43468.
69. Lee NP, Tsang FH, Shek FH, et al. Prognostic significance and therapeutic potential of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2010;127(4):968-976.

70. Guan XY, Sham JS, Tang TC, Fang Y, Huo KK, Yang JM. Isolation of a novel candidate oncogene within a frequently amplified region at 3q26 in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2001;61(9):3806-3809.
71. Guan XY, Fung JM, Ma NF, et al. Oncogenic role of eIF-5A2 in the development of ovarian cancer. *Cancer Res.* 2004;64(12):4197-4200.
72. Yang G, Xie D, Liu J, 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.* 2009;112(2):314-318.
73. Xie D, Ma N, Pan Z, et al. Overexpression of EIF-5A2 is associated with metastasis of human colorectal carcinoma. *Hum Pathol.* 2008;39(1):80-86.
74. Chen W, Luo J, Hua 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.* 2009;18(2):400-408.
75. Luo J, Hua W, Rao H, et al. Overexpression of EIF-5A2 predicts tumor recurrence and progression in pTa/pT1 urothelial carcinoma of the bladder. *Cancer Sci.* 2009;100(5):896-902.
76. Tang DJ, Dong SS, Ma NF, et al. Overexpression of eukaryotic initiation factor 5A2 enhances cell motility and promotes tumor metastasis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2010;51(4):1255-1263.
77. He LR, Zhao HY, Li BK, et al. Overexpression of eIF5A-2 is an adverse prognostic marker of survival in stage I non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer.* 2011;129(1):143-150.
78. Marchet A, Mocellin S, Belluco C, et al. Gene expression profile of primary gastric cancer: towards the prediction of lymph node status. *Ann Surg Oncol.* 2007;14(3):1058-1064.
79. Kolligs FT. An alternative way for epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer via EIF5A2? *Gut.* 2012;61(4):473-474.
80. Zender L, Xue W, Zuber J, et al. An oncogenomics-based in vivo RNAi screen identifies tumor suppressors in liver cancer. *Cell.* 2008;135(5):852-864.
81. Jasiulionis M, Luchessi A, Moreira A, et al. Inhibition of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) hypusination impairs melanoma growth. *Cell Biochem Funct.* 2007;25(1):109-114.
82. Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 2002;420(6915):520-562.
83. Capecchi MR. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* 1989;5(3):70-76.
84. Kühn R, Schwenk F. Conditional knockout mice. *Methods Mol Biol.* 2003;209:159-185.
85. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, Bujard H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science.* 1995;268(5218):1766-1769.
86. Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;237(3):752-757.
87. Zhang Y, Riesterer C, Ayrall AM, Sablitzky F, Littlewood TD, Reth M. Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(4):543-548.
88. Moore MJ. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science.* 2005;309(5740):1514-1518.

89. Keene JD. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet.* 2007;8(7):533-543.
90. Walker SC, Scott FH, Srisawat C, Engelke DR. RNA affinity tags for the rapid purification and investigation of RNAs and RNA-protein complexes. *Methods Mol Biol.* 2008;488:23-40.
91. Zeng F, Peritz T, Kannanayakal TJ, et al. A protocol for PAIR: PNA-assisted identification of RNA binding proteins in living cells. *Nat Protoc.* 2006;1(2):920-927.
92. Lorenz C, von Pelchrzim F, Schroeder R. Genomic systematic evolution of ligands by exponential enrichment (Genomic SELEX) for the identification of protein-binding RNAs independent of their expression levels. *Nat Protoc.* 2006;1(5):2204-2212.
93. Keene JD, Komisarow JM, Friedersdorf MB. RIP-Chip: the isolation and identification of mRNAs, microRNAs and protein components of ribonucleoprotein complexes from cell extracts. *Nat Protoc.* 2006;1(1):302-307.
94. Hafner M, Landthaler M, Burger L, et al. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell.* 2010;141(1):129-141.
95. Gagnon KT, Maxwell ES. Electrophoretic mobility shift assay for characterizing RNA-protein interaction. *Methods Mol Biol.* 2011;703:275-291.
96. Hauber I, Bevec D, Heukeshoven J, et al. Identification of cellular deoxyhypusine synthase as a novel target for antiretroviral therapy. *J Clin Invest.* 2005;115(1):76-85.
97. Sievert H. *Untersuchungen zum Verständnis der biologischen Funktion des eukaryotischen Initiationsfaktors 5A (eIF-5A) und dessen Hypusinmodifikation:* Fachbereich Biologie, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Universität Hamburg; 2013.
98. Preukschas M. *Die Deoxyhypusin-Synthase als ein mögliches Ziel für die Behandlung von Glioblastoma multiforme und die Rolle des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors eIF-5A2 in vivo:* Fachbereich Biologie, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Universität Hamburg; 2013.
99. Rodríguez CI, Buchholz F, Galloway J, et al. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet.* 2000;25(2):139-140.
100. Schwenk F, Baron U, Rajewsky K. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res.* 1995;23(24):5080-5081.
101. Hayashi S, McMahon AP. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol.* 2002;244(2):305-318.
102. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(12):6640-6645.
103. Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual.* Third ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003.
104. Shamir R, Maron-Katz A, Tanay A, et al. EXPANDER--an integrative program suite for microarray data analysis. *BMC Bioinformatics.* 2005;6:232.
105. Huang dW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44-57.
106. Huang dW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(1):1-13.

107. Berriz GF, Beaver JE, Cenik C, Tasan M, Roth FP. Next generation software for functional trend analysis. *Bioinformatics*. 2009;25(22):3043-3044.
108. Consortium U. Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D43-47.
109. Eden E, Lipson D, Yogev S, Yakhini Z. Discovering motifs in ranked lists of DNA sequences. *PLoS Comput Biol*. 2007;3(3):e39.
110. Elemento O, Slonim N, Tavazoie S. A universal framework for regulatory element discovery across all genomes and data types. *Mol Cell*. 2007;28(2):337-350.
111. Naber U, Friedrich RE, Glatzel M, Mautner VF, Hagel C. Podoplanin and CD34 in peripheral nerve sheath tumours: focus on neurofibromatosis 1-associated atypical neurofibroma. *J Neurooncol*. 2011;103(2):239-245.
112. Meguro R, Asano Y, Odagiri S, Li C, Iwatsuki H, Shoumura K. Nonheme-iron histochemistry for light and electron microscopy: a historical, theoretical and technical review. *Arch Histol Cytol*. 2007;70(1):1-19.
113. Wolff EC, Park MH, Folk JE. Cleavage of spermidine as the first step in deoxyhypusine synthesis. The role of NAD. *J Biol Chem*. 1990;265(9):4793-4799.
114. Pettitt SJ, Liang Q, Rairdan XY, et al. Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nat Methods*. 2009;6(7):493-495.
115. Park MH. The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). Purification of eIF-4D and its precursors and comparison of their activities. *J Biol Chem*. 1989;264(31):18531-18535.
116. Hyvönen MT, Keinänen TA, Khomutov M, et al. Effects of novel C-methylated spermidine analogs on cell growth via hypusination of eukaryotic translation initiation factor 5A. *Amino Acids*. 2012;42(2-3):685-695.
117. Su WY, Li JT, Cui Y, et al. Bidirectional regulation between WDR83 and its natural antisense transcript DHPS in gastric cancer. *Cell Res*. 2012;22(9):1374-1389.
118. Nishimura K, Lee SB, Park JH, Park MH. Essential role of eIF5A-1 and deoxyhypusine synthase in mouse embryonic development. *Amino Acids*. 2012;42(2-3):703-710.
119. Liu YP, Nemeroff M, Yan YP, Chen KY. Interaction of eukaryotic initiation factor 5A with the human immunodeficiency virus type 1 Rev response element RNA and U6 snRNA requires deoxyhypusine or hypusine modification. *Biol Signals*. 1997;6(3):166-174.
120. Xu A, Jao DL, Chen KY. Identification of mRNA that binds to eukaryotic initiation factor 5A by affinity co-purification and differential display. *Biochem J*. 2004;384(Pt 3):585-590.
121. Jao DL, Chen KY. Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *J Cell Biochem*. 2006;97(3):583-598.
122. Parreiras ESLT, Gomes MD, Oliveira EB, Costa-Neto CM. The N-terminal region of eukaryotic translation initiation factor 5A signals to nuclear localization of the protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;362(2):393-398.
123. Xu A, Chen KY. Hypusine is required for a sequence-specific interaction of eukaryotic initiation factor 5A with postsystematic evolution of ligands by exponential enrichment RNA. *J Biol Chem*. 2001;276(4):2555-2561.
124. Beltrao P, Albanèse V, Kenner LR, et al. Systematic functional prioritization of protein posttranslational modifications. *Cell*. 2012;150(2):413-425.
125. Landry CR, Levy ED, Michnick SW. Weak functional constraints on phosphoproteomes. *Trends Genet*. 2009;25(5):193-197.

126. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet.* 2010;11(9):636-646.
127. Li T, Huang S, Zhao X, et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(14):6315-6325.
128. Gerner EW, Mamont PS, Bernhardt A, Siat M. Post-translational modification of the protein-synthesis initiation factor eIF-4D by spermidine in rat hepatoma cells. *Biochem J.* 1986;239(2):379-386.
129. Torrelío BM, Paz MA, Gallop PM. The formation and stability of the hypusine containing protein in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;145(3):1335-1341.
130. Nishimura K, Murozumi K, Shirahata A, Park MH, Kashiwagi K, Igarashi K. Independent roles of eIF5A and polyamines in cell proliferation. *Biochem J.* 2005;385(Pt 3):779-785.
131. Gosslau A, Jao DL, Butler R, Liu AY, Chen KY. Thermal killing of human colon cancer cells is associated with the loss of eukaryotic initiation factor 5A. *J Cell Physiol.* 2009;219(2):485-493.
132. Andersson KB, Winer LH, Mørk HK, Molkenin JD, Jaisser F. Tamoxifen administration routes and dosage for inducible Cre-mediated gene disruption in mouse hearts. *Transgenic Res.* 2010;19(4):715-725.
133. Göthert JR, Gustin SE, Hall MA, et al. In vivo fate-tracing studies using the Scl stem cell enhancer: embryonic hematopoietic stem cells significantly contribute to adult hematopoiesis. *Blood.* 2005;105(7):2724-2732.
134. Hedrich HJ. *The Laboratory Mouse.* 2nd ed. London: Academic Press/Elsevier; 2012.
135. Cano V, Jeon G, Johansson H, et al. Mutational analyses of human eIF5A-1--identification of amino acid residues critical for eIF5A activity and hypusine modification. *FEBS J.* 2008;275(1):44-58.
136. Yang XJ. Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays.* 2004;26(10):1076-1087.
137. Yang XJ. The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(3):959-976.
138. Hogan DJ, Riordan DP, Gerber AP, Herschlag D, Brown PO. Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biol.* 2008;6(10):e255.
139. Marschang P, Brich J, Weeber EJ, et al. Normal development and fertility of knockout mice lacking the tumor suppressor gene LRP1b suggest functional compensation by LRP1. *Mol Cell Biol.* 2004;24(9):3782-3793.
140. Donovan SL, Schweers B, Martins R, Johnson D, Dyer MA. Compensation by tumor suppressor genes during retinal development in mice and humans. *BMC Biol.* 2006;4:14.
141. Barbaric I, Miller G, Dear TN. Appearances can be deceiving: phenotypes of knockout mice. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2007;6(2):91-103.
142. Veeramachaneni V, Makalowski W, Galdzicki M, Sood R, Makalowska I. Mammalian overlapping genes: the comparative perspective. *Genome Res.* 2004;14(2):280-286.
143. Maston GA, Evans SK, Green MR. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2006;7:29-59.
144. Vomastek T, Schaeffer HJ, Tarcsafalvi A, Smolkin ME, Bissonette EA, Weber MJ. Modular construction of a signaling scaffold: MORG1 interacts with components of the

- ERK cascade and links ERK signaling to specific agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(18):6981-6986.
145. Hopfer U, Hopfer H, Jablonski K, Stahl RA, Wolf G. The novel WD-repeat protein Morg1 acts as a molecular scaffold for hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 3 (PHD3). *J Biol Chem*. 2006;281(13):8645-8655.
  146. Hayase J, Kamakura S, Iwakiri Y, et al. The WD40 protein Morg1 facilitates Par6-aPKC binding to Crb3 for apical identity in epithelial cells. *J Cell Biol*. 2013;200(5):635-650.
  147. Zhu W, Cai MY, Tong ZT, et al. Overexpression of EIF5A2 promotes colorectal carcinoma cell aggressiveness by upregulating MTA1 through C-myc to induce epithelial-mesenchymal transition. *Gut*. 2012;61(4):562-575.
  148. Chen M, Huang JD, Deng HK, et al. Overexpression of eIF-5A2 in mice causes accelerated organismal aging by increasing chromosome instability. *BMC Cancer*. 2011;11:199.
  149. Rosenfeld CS, Roberts RM. Maternal diet and other factors affecting offspring sex ratio: a review. *Biol Reprod*. 2004;71(4):1063-1070.
  150. Swain A, Lovell-Badge R. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes Dev*. 1999;13(7):755-767.
  151. Yang X, Schadt EE, Wang S, et al. Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice. *Genome Res*. 2006;16(8):995-1004.
  152. Lefèvre PL, Palin MF, Murphy BD. Polyamines on the reproductive landscape. *Endocr Rev*. 2011;32(5):694-712.
  153. Hanazawa M, Kawasaki I, Kunitomo H, et al. The *Caenorhabditis elegans* eukaryotic initiation factor 5A homologue, IFF-1, is required for germ cell proliferation, gametogenesis and localization of the P-granule component PGL-1. *Mech Dev*. 2004;121(3):213-224.
  154. Christensen GL, Ivanov IP, Atkins JF, Mielnik A, Schlegel PN, Carrell DT. Screening the SPO11 and EIF5A2 genes in a population of infertile men. *Fertil Steril*. 2005;84(3):758-760.
  155. Smith L. Good planning and serendipity: exploiting the Cre/Lox system in the testis. *Reproduction*. 2011;141(2):151-161.
  156. Sandgren EP, Quaife CJ, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster RL. Oncogene-induced liver neoplasia in transgenic mice. *Oncogene*. 1989;4(6):715-724.
  157. Kang HA, Schwelberger HG, Hershey JW. The two genes encoding protein synthesis initiation factor eIF-5A in *Saccharomyces cerevisiae* are members of a duplicated gene cluster. *Mol Gen Genet*. 1992;233(3):487-490.
  158. Mazet F, Shimeld SM. Gene duplication and divergence in the early evolution of vertebrates. *Curr Opin Genet Dev*. 2002;12(4):393-396.
  159. Sievert H, Venz S, Platas-Barradas O, et al. Protein-protein-interaction network organization of the hypusine modification system. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11(11):1289-1305.
  160. Sanz E, Yang L, Su T, Morris DR, McKnight GS, Amieux PS. Cell-type-specific isolation of ribosome-associated mRNA from complex tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(33):13939-13944.
  161. Gentz PM, Blatch GL, Dorrington RA. Dimerization of the yeast eukaryotic translation initiation factor 5A requires hypusine and is RNA dependent. *FEBS J*. 2009;276(3):695-706.

162. Lee S, Park J, Kaevel J, Sramkova M, Weigert R, Park M. The effect of hypusine modification on the intracellular localization of eIF5A. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;383(4):497-502.
163. Hersch SJ, Wang M, Zou SB, et al. Divergent protein motifs direct elongation factor P-mediated translational regulation in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *MBio.* 2013;4(2):e00180-00113.
164. Ude S, Lassak J, Starosta AL, Kraxenberger T, Wilson DN, Jung K. Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. *Science.* 2013;339(6115):82-85.
165. Pavlov MY, Watts RE, Tan Z, Cornish VW, Ehrenberg M, Forster AC. Slow peptide bond formation by proline and other N-alkylamino acids in translation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(1):50-54.
166. Charneski CA, Hurst LD. Positively charged residues are the major determinants of ribosomal velocity. *PLoS Biol.* 2013;11(3):e1001508.
167. Stirnimann CU, Petsalaki E, Russell RB, Müller CW. WD40 proteins propel cellular networks. *Trends Biochem Sci.* 2010;35(10):565-574.
168. Schroeder SJ. Advances in RNA structure prediction from sequence: new tools for generating hypotheses about viral RNA structure-function relationships. *J Virol.* 2009;83(13):6326-6334.
169. Metallo CM, Vander Heiden MG. Understanding metabolic regulation and its influence on cell physiology. *Mol Cell.* 2013;49(3):388-398.
170. Christian BE, Spremulli LL. Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1819(9-10):1035-1054.
171. Weis BL, Schleiff E, Zerges W. Protein targeting to subcellular organelles via mRNA localization. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(2):260-273.
172. Siciliano G, Volpi L, Piazza S, Ricci G, Mancuso M, Murri L. Functional diagnostics in mitochondrial diseases. *Biosci Rep.* 2007;27(1-3):53-67.
173. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(2):85-95.
174. Warburg O, Wind F, Negelein E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol.* 1927;8(6):519-530.
175. WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123(3191):309-314.
176. Tong Y, Park I, Hong BS, Nedyalkova L, Tempel W, Park HW. Crystal structure of human eIF5A1: insight into functional similarity of human eIF5A1 and eIF5A2. *Proteins.* 2009;75(4):1040-1045.
177. Safety and Tolerability Study of SNS01-T in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma, Mantle Cell Lymphoma, or Diffuse Large B Cell Lymphoma. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01435720?spons=Senesco&rank=1>; 2013.
178. Atemnkeng VA, Pink M, Schmitz-Spanke S, et al. Deoxyhypusine hydroxylase from *Plasmodium vivax*, the neglected human malaria parasite: molecular cloning, expression and specific inhibition by the 5-LOX inhibitor zileuton. *PLoS One.* 2013;8(3):e58318.
179. Zhou J, Rossi JJ. Cell-specific aptamer-mediated targeted drug delivery. *Oligonucleotides.* 2011;21(1):1-10.

## 5.3 Per RIP-Chip identifizierte Transkripte (Auszug)

In den folgenden Tabellen sind die beim RIP-Chip für die verschiedenen eIF-5A-Proteine erhaltenen Transkripte dargestellt. Die Tabellen geben jeweils die Unterschiede zur Gesamt-RNA von eIF-5A1-HA exprimierenden Zellen wieder. Dabei sind jeweils die 100 Transkripte mit dem höchsten signifikanten *Signal Log Ratio*-Wert aufgeführt.

### 5.3.1 RIP-Chip-Daten für eIF-5A1

Affymetrix Sonden Set ID	Mittelwert Basisgruppe	Mittelwert Testgruppe	p-Wert	<i>Signal Log Ratio</i>	Gensymbol
1459840_s_at	5,8278	8,4845	0,0047	<b>2,7</b>	Ccdc28b
1418752_at	5,9513	8,3017	0,0058	<b>2,4</b>	Aldh3a1
1452937_s_at	5,4843	7,5836	0,0096	<b>2,1</b>	Ccdc28b
1434333_a_at	4,3706	6,3769	0,0079	<b>2,0</b>	Prkd2
1449591_at	7,0823	9,0010	0,0007	<b>1,9</b>	Casp4
1416647_at	7,7133	9,6134	0,0004	<b>1,9</b>	Bckdha
1452583_s_at	5,2333	7,1230	0,0006	<b>1,9</b>	Galm
1422327_s_at	5,8924	7,7768	0,0056	<b>1,9</b>	G6pd2 /// G6pdx
1450976_at	8,4661	10,2776	0,0030	<b>1,8</b>	Ndrp1
1422478_a_at	6,9875	8,7169	0,0006	<b>1,7</b>	Acsc2
1424078_s_at	8,2955	10,0133	0,0001	<b>1,7</b>	Pex6
1431292_a_at	7,5337	9,2446	0,0042	<b>1,7</b>	Twf2
1426427_at	6,3963	8,0908	0,0006	<b>1,7</b>	Ttll1
1415945_at	9,9504	11,6424	0,0091	<b>1,7</b>	Mcm5
1451226_at	8,3579	10,0187	0,0018	<b>1,7</b>	Pex6
1430543_at	6,6807	8,3392	0,0029	<b>1,7</b>	Clip3
1435681_s_at	5,3887	7,0458	0,0015	<b>1,7</b>	Ddx49
1417716_at	8,5715	10,1968	0,0015	<b>1,6</b>	Got2
1426063_a_at	5,9805	7,6050	0,0047	<b>1,6</b>	Gem
1415977_at	7,7364	9,3478	0,0034	<b>1,6</b>	Isyna1
1448121_at	7,5100	9,1209	0,0005	<b>1,6</b>	Wbp2
1419198_at	6,3689	7,9597	0,0051	<b>1,6</b>	Cbx8
1448644_at	8,8507	10,4356	0,0061	<b>1,6</b>	Pef1
1450957_a_at	10,1136	11,6974	0,0087	<b>1,6</b>	Sqstm1
1418175_at	7,3024	8,8801	0,0015	<b>1,6</b>	Vdr
1456937_at	5,4504	7,0186	0,0013	<b>1,6</b>	Cdh26
1448907_at	7,6684	9,2355	0,0004	<b>1,6</b>	Thop1
1431189_a_at	5,0214	6,5880	0,0048	<b>1,6</b>	Fahd2a
1434628_a_at	3,7542	5,3205	0,0037	<b>1,6</b>	Rhpn2
1448267_at	6,1565	7,7213	0,0007	<b>1,6</b>	Stx5a
1460396_at	8,3251	9,8785	0,0009	<b>1,6</b>	Ddx54
1415677_at	9,1039	10,6552	0,0056	<b>1,6</b>	Dhrs1

1460641_a_at	7,1345	8,6844	0,0003	1,5	Rbm42
1417793_at	4,7867	6,3305	0,0028	1,5	Irgm2
1445897_s_at	9,8868	11,4286	0,0003	1,5	Ifi35
1415750_at	7,7602	9,3007	0,0001	1,5	Tbl3
1453768_a_at	5,6418	7,1821	0,0081	1,5	Fam110a
1433708_at	9,3209	10,8591	0,0041	1,5	Srp68
1451339_at	5,7350	7,2699	0,0051	1,5	Suox
1428612_at	6,4517	7,9858	0,0009	1,5	Atg7
1432472_a_at	5,7526	7,2792	0,0053	1,5	Mccc2
1428750_at	9,6226	11,1399	0,0094	1,5	Cdc42ep2
1426774_at	5,0168	6,5322	0,0010	1,5	Parp12
1448324_at	10,7460	12,2610	0,0021	1,5	Rnps1
1428915_at	6,3089	7,8221	0,0016	1,5	Sirt5
1419883_s_at	7,5527	9,0582	0,0009	1,5	Atp6v1b2
1415739_at	9,3553	10,8604	0,0004	1,5	Rbm42
1451176_at	7,1586	8,6571	0,0084	1,5	Mavs
1423165_a_at	8,2692	9,7672	0,0019	1,5	Mta2
1422601_at	6,8341	8,3210	0,0006	1,5	Serpib9
1426534_a_at	7,9928	9,4766	0,0019	1,5	Arfgap3
1415774_at	8,1470	9,6173	0,0033	1,5	Elp2
1424651_at	6,8434	8,3134	0,0014	1,5	Acsc3
1420543_at	5,3538	6,8233	0,0038	1,5	Dnajc28
1435256_at	7,8418	9,3085	0,0083	1,5	Clip3
1460362_at	8,7670	10,2313	0,0019	1,5	2410001C21Rik
1421976_at	5,1394	6,6035	0,0033	1,5	Mmp19
1441727_s_at	5,2853	6,7479	0,0066	1,5	Zfp467
1419763_at	4,4032	5,8571	0,0056	1,5	Nkap
1459151_x_at	7,4739	8,9267	0,0003	1,5	Ifi35
1418965_at	8,2419	9,6880	0,0015	1,4	Nosip
1460279_a_at	7,1481	8,5932	0,0029	1,4	Gtf2i
1455467_at	5,2966	6,7407	0,0075	1,4	Fam188b
1426942_at	5,7053	7,1484	0,0037	1,4	Aim1
1421977_at	6,3285	7,7659	0,0043	1,4	Mmp19
1416200_at	4,2947	5,7307	0,0077	1,4	Ii33
1454840_at	6,6998	8,1303	0,0018	1,4	Mccc2
1439440_x_at	9,7669	11,1950	0,0013	1,4	Twif2
1436833_x_at	8,3451	9,7730	0,0072	1,4	Ttll1
1417692_at	9,0964	10,5200	0,0002	1,4	Drg2
1416137_at	7,9723	9,3873	0,0065	1,4	Anxa7
1431428_a_at	7,6676	9,0822	0,0009	1,4	Nosip
1418238_at	8,7756	10,1901	0,0040	1,4	Ivd
1420953_at	7,3249	8,7392	0,0000	1,4	Add1
1422479_at	6,6468	8,0608	0,0002	1,4	Acsc2
1448350_at	8,0510	9,4498	0,0023	1,4	Asl
1437835_a_at	6,7568	8,1529	0,0013	1,4	0610011L14Rik
1452226_at	8,7111	10,1066	0,0084	1,4	Rcc2

1424617_at	7,8140	9,2095	0,0002	<b>1,4</b>	Ifi35
1433433_at	9,0994	10,4926	0,0062	<b>1,4</b>	Myst2
1460189_at	6,9487	8,3410	0,0035	<b>1,4</b>	Dcaf11
1417220_at	8,5808	9,9705	0,0060	<b>1,4</b>	Fah
1434133_s_at	5,9537	7,3399	0,0062	<b>1,4</b>	Dcaf8
1443841_x_at	3,8261	5,2119	0,0074	<b>1,4</b>	Uap1l1
1416756_at	8,9601	10,3452	0,0001	<b>1,4</b>	Dnajb1
1417976_at	7,5471	8,9288	0,0033	<b>1,4</b>	Ada
1451149_at	8,6311	10,0047	0,0082	<b>1,4</b>	Pgm2
1421720_a_at	6,1702	7,5361	0,0034	<b>1,4</b>	Dtx2
1417243_at	9,8116	11,1716	0,0002	<b>1,4</b>	Fam192a
1450082_s_at	6,1590	7,5180	0,0083	<b>1,4</b>	Etv5
1429001_at	8,4374	9,7949	0,0012	<b>1,4</b>	Pir
1416127_a_at	9,4556	10,8115	0,0009	<b>1,4</b>	Dnpep
1428895_at	6,5049	7,8589	0,0020	<b>1,4</b>	Rftn2
1416356_at	8,6579	10,0099	0,0010	<b>1,4</b>	Gmpr2
1422550_a_at	6,5510	7,9016	0,0011	<b>1,4</b>	Mtap6
1428364_at	8,0373	9,3835	0,0042	<b>1,3</b>	Scnm1
1434114_at	8,3493	9,6946	0,0054	<b>1,3</b>	Rexo4
1416821_at	6,3669	7,7107	0,0012	<b>1,3</b>	Dgcr14
1451207_at	8,9018	10,2438	0,0009	<b>1,3</b>	Cbara1

### 5.3.2 RIP-Chip-Daten für eIF-5A2

<b>Affymetrix Sonden Set ID</b>	<b>Mittelwert Basisgruppe</b>	<b>Mittelwert Testgruppe</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Signal Log Ratio</b>	<b>Gensymbol</b>
1432517_a_at	5,4842	8,6365	0,0040	<b>3,2</b>	Nnmt
1448562_at	6,6430	9,7777	0,0076	<b>3,1</b>	Upp1
1460238_at	7,9061	10,8473	0,0001	<b>2,9</b>	Msln
1422573_at	6,2019	8,9615	0,0007	<b>2,8</b>	Ampd3
1416554_at	9,6873	12,3602	0,0004	<b>2,7</b>	Pdlim1
1420537_at	5,0270	7,6812	0,0090	<b>2,7</b>	Kctd4
1452003_at	6,1364	8,6659	0,0006	<b>2,5</b>	Rbm14
1450569_a_at	7,9986	10,4956	0,0052	<b>2,5</b>	Rbm14
1450241_a_at	6,3096	8,7921	0,0061	<b>2,5</b>	Evi2a
1434628_a_at	3,7542	6,2277	0,0070	<b>2,5</b>	Rhpn2
1415978_at	5,7856	8,2349	0,0013	<b>2,4</b>	Tubb3
1422327_s_at	5,8924	8,3404	0,0035	<b>2,4</b>	G6pd2 /// G6pdx
1419589_at	4,9992	7,4397	0,0093	<b>2,4</b>	Cd93
1418761_at	7,7689	10,1984	0,0077	<b>2,4</b>	Igf2bp1
1454789_x_at	9,3287	11,7313	0,0085	<b>2,4</b>	Prpf6
1415977_at	7,7364	10,1145	0,0006	<b>2,4</b>	Isyna1
1456480_at	3,6646	6,0424	0,0011	<b>2,4</b>	Fry
1451274_at	8,8238	11,1907	0,0099	<b>2,4</b>	Ogdh
1416749_at	7,1279	9,4916	0,0027	<b>2,4</b>	Htra1

1425326_at	9,2266	11,5649	0,0006	<b>2,3</b>	Acly
1431292_a_at	7,5337	9,8657	0,0000	<b>2,3</b>	Twf2
1437032_x_at	8,6524	10,9822	0,0043	<b>2,3</b>	Rbm14
1426747_at	8,1435	10,4711	0,0052	<b>2,3</b>	Abcf3
1426423_at	9,0693	11,3966	0,0035	<b>2,3</b>	Shmt2
1417936_at	5,4342	7,7500	0,0007	<b>2,3</b>	Ccl9
1459840_s_at	5,8278	8,1305	0,0002	<b>2,3</b>	Ccdc28b
1451111_at	7,3689	9,6497	0,0010	<b>2,3</b>	Nup133
1436502_at	5,0785	7,3513	0,0056	<b>2,3</b>	Mtus1
1456046_at	5,6568	7,9267	0,0006	<b>2,3</b>	Cd93
1418726_a_at	5,9403	8,2093	0,0007	<b>2,3</b>	Tnnt2
1417951_at	8,6488	10,9146	0,0004	<b>2,3</b>	Eno3
1417292_at	4,8522	7,0847	0,0023	<b>2,2</b>	Ifi47
1423946_at	8,2055	10,4372	0,0029	<b>2,2</b>	Pdlim2
1452672_at	8,6424	10,8720	0,0008	<b>2,2</b>	Thoc5
1415750_at	7,7602	9,9836	0,0030	<b>2,2</b>	Tbl3
1452429_s_at	7,8193	10,0360	0,0046	<b>2,2</b>	Abcf1
1437835_a_at	6,7568	8,9490	0,0001	<b>2,2</b>	0610011L14Rik
1448658_at	8,7521	10,9241	0,0039	<b>2,2</b>	Sart1
1450379_at	6,8776	9,0470	0,0008	<b>2,2</b>	Msn
1455257_at	4,9411	7,0806	0,0056	<b>2,1</b>	Itgb3
1451365_at	7,2674	9,4037	0,0006	<b>2,1</b>	Rbm19
1416647_at	7,7133	9,8226	0,0003	<b>2,1</b>	Bckdha
1426427_at	6,3963	8,5050	0,0001	<b>2,1</b>	Ttll1
1426657_s_at	10,4702	12,5783	0,0019	<b>2,1</b>	Gm8096 /// Phgdh
1416383_a_at	6,9741	9,0814	0,0036	<b>2,1</b>	Pcx
1423600_a_at	7,0303	9,1245	0,0100	<b>2,1</b>	Tcof1
1428899_at	4,5066	6,5987	0,0098	<b>2,1</b>	Tmem182
1436501_at	5,5743	7,6539	0,0031	<b>2,1</b>	Mtus1
1415945_at	9,9504	12,0192	0,0040	<b>2,1</b>	Mcm5
1425902_a_at	7,0708	9,1272	0,0055	<b>2,1</b>	Nfkb2
1417692_at	9,0964	11,1507	0,0023	<b>2,1</b>	Drg2
1417716_at	8,5715	10,6247	0,0004	<b>2,1</b>	Got2
1424967_x_at	5,5388	7,5868	0,0088	<b>2,0</b>	Tnnt2
1451149_at	8,6311	10,6761	0,0000	<b>2,0</b>	Pgm2
1427081_at	5,7332	7,7691	0,0013	<b>2,0</b>	A630072M18Rik
1452583_s_at	5,2333	7,2677	0,0017	<b>2,0</b>	Galm
1417268_at	7,3753	9,4075	0,0003	<b>2,0</b>	Cd14
1438251_x_at	7,2306	9,2567	0,0005	<b>2,0</b>	Htra1
1433653_at	5,3465	7,3644	0,0004	<b>2,0</b>	Fam20a
1423797_at	9,2181	11,2305	0,0003	<b>2,0</b>	Aacs
1434333_a_at	4,3706	6,3824	0,0082	<b>2,0</b>	Prkd2
1424630_a_at	5,2678	7,2689	0,0036	<b>2,0</b>	Brca1
1436698_x_at	3,5751	5,5724	0,0069	<b>2,0</b>	Tmem204
1451828_a_at	7,3592	9,3535	0,0030	<b>2,0</b>	Acsl4
1425615_a_at	10,0324	12,0206	0,0004	<b>2,0</b>	Pck2

1450264_a_at	7,5432	9,5282	0,0011	<b>2,0</b>	Chka
1436833_x_at	8,3451	10,3288	0,0001	<b>2,0</b>	Ttll1
1417019_a_at	9,4066	11,3888	0,0083	<b>2,0</b>	Cdc6
1451744_a_at	5,8966	7,8782	0,0013	<b>2,0</b>	Ptgr2
1432472_a_at	5,7526	7,7318	0,0022	<b>2,0</b>	Mccc2
1428365_a_at	9,5918	11,5690	0,0028	<b>2,0</b>	Lonp1
1423379_at	5,4673	7,4336	0,0040	<b>2,0</b>	Nfatc4
1418348_a_at	6,5562	8,5095	0,0001	<b>2,0</b>	Ascc2
1448354_at	9,1133	11,0642	0,0019	<b>2,0</b>	G6pdx
1426928_at	5,1930	7,1436	0,0009	<b>2,0</b>	Ccdc93
1449481_at	7,6459	9,5945	0,0030	<b>1,9</b>	Slc25a13
1448350_at	8,0510	9,9989	0,0025	<b>1,9</b>	Asl
1460292_a_at	4,9598	6,9063	0,0005	<b>1,9</b>	Smarca1
1425865_a_at	6,0302	7,9767	0,0025	<b>1,9</b>	Lig3
1416348_at	5,2224	7,1688	0,0049	<b>1,9</b>	Men1
1428612_at	6,4517	8,3949	0,0004	<b>1,9</b>	Atg7
1448907_at	7,6684	9,6113	0,0004	<b>1,9</b>	Thop1
1460396_at	8,3251	10,2644	0,0011	<b>1,9</b>	Ddx54
1423165_a_at	8,2692	10,2047	0,0093	<b>1,9</b>	Mta2
1448143_at	8,9997	10,9349	0,0004	<b>1,9</b>	Aldh2
1423815_at	8,7857	10,7208	0,0000	<b>1,9</b>	Ddx56
1435681_s_at	5,3887	7,3221	0,0010	<b>1,9</b>	Ddx49
1415909_at	10,2980	12,2263	0,0007	<b>1,9</b>	Stip1
1450355_a_at	10,5691	12,4928	0,0001	<b>1,9</b>	Capg
1426422_at	6,5237	8,4460	0,0014	<b>1,9</b>	Cc2d1a
1430986_at	6,7603	8,6810	0,0048	<b>1,9</b>	Farsb
1430533_a_at	7,3279	9,2460	0,0005	<b>1,9</b>	Ctnnb1
1460188_at	4,3129	6,2292	0,0057	<b>1,9</b>	Ptpn6
1428109_at	6,9972	8,9065	0,0004	<b>1,9</b>	Vps11
1426046_a_at	6,9770	8,8859	0,0010	<b>1,9</b>	Rabggta
1452194_at	9,7268	11,6348	0,0048	<b>1,9</b>	Tbcd
1450957_a_at	10,1136	12,0191	0,0040	<b>1,9</b>	Sqstm1
1423685_at	10,3694	12,2745	0,0087	<b>1,9</b>	Aars
1454647_at	7,3903	9,2902	0,0002	<b>1,9</b>	Acad11

### 5.3.3 RIP-Chip-Daten für eIF-5A1-K50R

Affymetrix Sonden Set ID	Mittelwert Basisgruppe	Mittelwert Testgruppe	p-Wert	Signal Log Ratio	Gensymbol
1454789_x_at	9,3287	11,9861	0,0004	<b>2,7</b>	Prpf6
1450569_a_at	7,9986	10,6236	0,0014	<b>2,6</b>	Rbm14
1434333_a_at	4,3706	6,8097	0,0025	<b>2,4</b>	Prkd2
1422327_s_at	5,8924	8,2871	0,0007	<b>2,4</b>	G6pdx2 /// G6pdx
1451111_at	7,3689	9,7535	0,0004	<b>2,4</b>	Nup133
1437032_x_at	8,6524	11,0150	0,0025	<b>2,4</b>	Rbm14

1422478_a_at	6,9875	9,3402	0,0016	<b>2,4</b>	Acss2
1452003_at	6,1364	8,4782	0,0015	<b>2,3</b>	Rbm14
1451176_at	7,1586	9,4466	0,0039	<b>2,3</b>	Mavs
1419685_at	6,6958	8,9837	0,0042	<b>2,3</b>	Upf1
1448618_at	7,7649	10,0511	0,0017	<b>2,3</b>	Mvp
1427498_a_at	6,9693	9,2458	0,0059	<b>2,3</b>	Spag5
1460371_at	6,2234	8,4752	0,0061	<b>2,3</b>	Hspa12b
1418752_at	5,9513	8,1592	0,0080	<b>2,2</b>	Aldh3a1
1416038_at	9,5454	11,7442	0,0046	<b>2,2</b>	Snd1
1416780_at	8,9255	11,1141	0,0016	<b>2,2</b>	Pfkm
1452429_s_at	7,8193	9,9943	0,0001	<b>2,2</b>	Abcf1
1423685_at	10,3694	12,5370	0,0018	<b>2,2</b>	Aars
1460279_a_at	7,1481	9,3091	0,0007	<b>2,2</b>	Gtf2i
1426747_at	8,1435	10,2915	0,0010	<b>2,1</b>	Abcf3
1419370_a_at	9,5054	11,6520	0,0002	<b>2,1</b>	Mfap1a
1451365_at	7,2674	9,4086	0,0004	<b>2,1</b>	Rbm19
1426928_at	5,1930	7,3147	0,0008	<b>2,1</b>	Ccdc93
1420535_a_at	7,3786	9,4864	0,0005	<b>2,1</b>	Nub1
1424036_at	9,3462	11,4391	0,0037	<b>2,1</b>	Prpf6
1451891_a_at	7,7407	9,8315	0,0054	<b>2,1</b>	Dysf
1448143_at	8,9997	11,0795	0,0004	<b>2,1</b>	Aldh2
1453581_at	8,5469	10,6261	0,0077	<b>2,1</b>	Cep170
1448658_at	8,7521	10,8257	0,0009	<b>2,1</b>	Sart1
1452672_at	8,6424	10,7146	0,0002	<b>2,1</b>	Thoc5
1423706_a_at	10,3867	12,4569	0,0025	<b>2,1</b>	Pgd
1422431_at	8,2689	10,3373	0,0027	<b>2,1</b>	Magee1
1422584_at	7,5673	9,6337	0,0008	<b>2,1</b>	Skiv2l
1426423_at	9,0693	11,1260	0,0012	<b>2,1</b>	Shmt2
1422479_at	6,6468	8,6923	0,0053	<b>2,0</b>	Acss2
1448354_at	9,1133	11,1540	0,0008	<b>2,0</b>	G6pdx
1448278_at	7,4272	9,4657	0,0017	<b>2,0</b>	Xab2
1415945_at	9,9504	11,9829	0,0002	<b>2,0</b>	Mcm5
1449444_a_at	10,0399	12,0676	0,0001	<b>2,0</b>	LOC100048499 /// Mfap1a /// Mfap1b
1449060_at	9,1649	11,1920	0,0000	<b>2,0</b>	Kif2c
1415917_at	10,4704	12,4945	0,0024	<b>2,0</b>	Mthfd1
1439185_x_at	8,6354	10,6535	0,0002	<b>2,0</b>	Mavs
1417716_at	8,5715	10,5890	0,0017	<b>2,0</b>	Got2
1448311_at	8,6890	10,6827	0,0006	<b>2,0</b>	Usp5
1424288_at	8,2523	10,2342	0,0006	<b>2,0</b>	Mepce
1415866_at	6,6539	8,6343	0,0076	<b>2,0</b>	Unc45a
1454985_at	7,1338	9,1119	0,0005	<b>2,0</b>	Ambra1
1415811_at	8,4458	10,4216	0,0048	<b>2,0</b>	Uhrf1
1428105_at	9,0333	11,0044	0,0046	<b>2,0</b>	Tpx2
1423644_at	8,0834	10,0538	0,0074	<b>2,0</b>	Aco1
1415978_at	5,7856	7,7484	0,0002	<b>2,0</b>	Tubb3

1430543_at	6,6807	8,6415	0,0008	<b>2,0</b>	Clip3
1423796_at	9,9793	11,9246	0,0084	<b>1,9</b>	Sfpq
1426422_at	6,5237	8,4681	0,0033	<b>1,9</b>	Cc2d1a
1425865_a_at	6,0302	7,9726	0,0029	<b>1,9</b>	Lig3
1449445_x_at	10,4256	12,3614	0,0016	<b>1,9</b>	Mfap1a
1434090_at	5,5321	7,4632	0,0007	<b>1,9</b>	Dis3l2
1425902_a_at	7,0708	8,9995	0,0001	<b>1,9</b>	Nfkb2
1436886_x_at	7,6650	9,5836	0,0033	<b>1,9</b>	Xab2
1427304_at	6,2674	8,1816	0,0001	<b>1,9</b>	Vps18
1436979_x_at	11,2165	13,1280	0,0019	<b>1,9</b>	Rbm14
1450976_at	8,4661	10,3772	0,0013	<b>1,9</b>	Ndrp1
1450687_at	7,5777	9,4846	0,0072	<b>1,9</b>	Igf2bp3
1433942_at	5,3876	7,2915	0,0074	<b>1,9</b>	Myo6
1436414_at	5,8295	7,7316	0,0002	<b>1,9</b>	Obsl1
1423379_at	5,4673	7,3650	0,0011	<b>1,9</b>	Nfatc4
1451666_at	11,9227	13,8191	0,0019	<b>1,9</b>	Acly
1457670_s_at	11,2915	13,1851	0,0005	<b>1,9</b>	Lmna
1451860_a_at	6,0428	7,9356	0,0057	<b>1,9</b>	Trim30a
1422796_at	10,1796	12,0679	0,0034	<b>1,9</b>	Prep
1452829_at	8,3332	10,2076	0,0073	<b>1,9</b>	Cad
1415985_at	10,3525	12,2266	0,0038	<b>1,9</b>	Sf3b3
1424570_at	7,4251	9,2983	0,0003	<b>1,9</b>	Ddx46
1423797_at	9,2181	11,0900	0,0005	<b>1,9</b>	Aacs
1416383_a_at	6,9741	8,8386	0,0004	<b>1,9</b>	Pcx
1451274_at	8,8238	10,6873	0,0004	<b>1,9</b>	Ogdh
1420863_at	6,5547	8,4176	0,0002	<b>1,9</b>	Dctn4
1424023_at	7,6859	9,5483	0,0004	<b>1,9</b>	Ctu1
1416430_at	9,9452	11,8035	0,0002	<b>1,9</b>	Cat
1450957_a_at	10,1136	11,9674	0,0032	<b>1,9</b>	Sqstm1
1426657_s_at	10,4702	12,3240	0,0009	<b>1,9</b>	Gm8096 /// Phgdh
1460396_at	8,3251	10,1758	0,0002	<b>1,9</b>	Ddx54
1448187_at	7,9920	9,8372	0,0066	<b>1,8</b>	Pold1
1450082_s_at	6,1590	7,9977	0,0028	<b>1,8</b>	Etv5
1424569_at	8,8485	10,6833	0,0002	<b>1,8</b>	Ddx46
1452920_a_at	8,9415	10,7759	0,0000	<b>1,8</b>	Ppil2
1441727_s_at	5,2853	7,1184	0,0025	<b>1,8</b>	Zfp467
1448672_a_at	8,6122	10,4422	0,0031	<b>1,8</b>	Arfgap2
1415774_at	8,1470	9,9725	0,0007	<b>1,8</b>	Elp2
1428104_at	9,8332	11,6577	0,0025	<b>1,8</b>	Tpx2
1416380_at	6,5214	8,3357	0,0014	<b>1,8</b>	Mov10
1416647_at	7,7133	9,5265	0,0027	<b>1,8</b>	Bckdha
1424630_a_at	5,2678	7,0748	0,0009	<b>1,8</b>	Brca1
1456566_x_at	10,4104	12,2164	0,0042	<b>1,8</b>	Rbm14
1421972_s_at	6,2333	8,0374	0,0019	<b>1,8</b>	Hcfc1
1434133_s_at	5,9537	7,7566	0,0047	<b>1,8</b>	Dcaf8
1452690_at	9,2734	11,0748	0,0011	<b>1,8</b>	Khsrp

1423419_at	7,6399	9,4406	0,0030	<b>1,8</b>	Lig3
1422503_s_at	9,9424	11,7427	0,0004	<b>1,8</b>	Parp1

### 5.3.4 RIP-Chip-Daten für eIF-5A2-K50R

Affymetrix Sonden Set ID	Mittelwert Basisgruppe	Mittelwert Testgruppe	p-Wert	Signal Log Ratio	Gensymbol
1418752_at	5,9513	8,3270	0,0031	<b>2,4</b>	Aldh3a1
1434333_a_at	4,3706	6,3906	0,0049	<b>2,0</b>	Prkd2
1450976_at	8,4661	10,3984	0,0012	<b>1,9</b>	Ndrp1
1422327_s_at	5,8924	7,8165	0,0070	<b>1,9</b>	G6pd2 /// G6pdx
1452003_at	6,1364	8,0274	0,0085	<b>1,9</b>	Rbm14
1430543_at	6,6807	8,5496	0,0014	<b>1,9</b>	Clip3
1441941_x_at	5,8513	7,6939	0,0077	<b>1,8</b>	Serpib5
1448143_at	8,9997	10,7937	0,0023	<b>1,8</b>	Aldh2
1426422_at	6,5237	8,2659	0,0031	<b>1,7</b>	Cc2d1a
1423165_a_at	8,2692	10,0027	0,0058	<b>1,7</b>	Mta2
1452583_s_at	5,2333	6,9649	0,0007	<b>1,7</b>	Galm
1450957_a_at	10,1136	11,8357	0,0065	<b>1,7</b>	Sqstm1
1418175_at	7,3024	9,0237	0,0005	<b>1,7</b>	Vdr
1426942_at	5,7053	7,4241	0,0012	<b>1,7</b>	Aim1
1416647_at	7,7133	9,4293	0,0035	<b>1,7</b>	Bckdha
1448324_at	10,7460	12,4590	0,0006	<b>1,7</b>	Rnps1
1433464_at	8,2213	9,8998	0,0007	<b>1,7</b>	Ipo13
1423379_at	5,4673	7,1398	0,0027	<b>1,7</b>	Nfatc4
1417668_at	6,2075	7,8612	0,0085	<b>1,7</b>	Rtn4ip1
1426928_at	5,1930	6,8464	0,0044	<b>1,7</b>	Ccdc93
1424078_s_at	8,2955	9,9441	0,0034	<b>1,6</b>	Pex6
1418450_at	6,7936	8,4296	0,0014	<b>1,6</b>	Islr
1428612_at	6,4517	8,0869	0,0022	<b>1,6</b>	Atg7
1448267_at	6,1565	7,7840	0,0013	<b>1,6</b>	Stx5a
1416638_at	6,9360	8,5597	0,0018	<b>1,6</b>	Sall2
1448350_at	8,0510	9,6642	0,0017	<b>1,6</b>	Asl
1424651_at	6,8434	8,4352	0,0014	<b>1,6</b>	Acsf3
1451226_at	8,3579	9,9243	0,0087	<b>1,6</b>	Pex6
1421748_a_at	5,6882	7,2479	0,0007	<b>1,6</b>	Tubd1
1427081_at	5,7332	7,2925	0,0013	<b>1,6</b>	A630072M18Rik
1424101_at	10,9156	12,4719	0,0079	<b>1,6</b>	Hnrnp1
1433433_at	9,0994	10,6506	0,0055	<b>1,6</b>	Myst2
1417228_at	6,6710	8,2222	0,0020	<b>1,6</b>	Capn1
1432472_a_at	5,7526	7,3023	0,0051	<b>1,5</b>	Mccc2
1456935_at	5,8982	7,4454	0,0029	<b>1,5</b>	AI606473
1450082_s_at	6,1590	7,6962	0,0087	<b>1,5</b>	Etv5
1434133_s_at	5,9537	7,4808	0,0065	<b>1,5</b>	Dcaf8
1433708_at	9,3209	10,8435	0,0023	<b>1,5</b>	Srp68

1415770_at	10,1015	11,6206	0,0040	1,5	Wdr6
1433780_at	7,6151	9,1272	0,0074	1,5	Ubn1
1435256_at	7,8418	9,3529	0,0001	1,5	Clip3
1416137_at	7,9723	9,4817	0,0095	1,5	Anxa7
1435681_s_at	5,3887	6,8872	0,0034	1,5	Ddx49
1452709_at	9,8150	11,3126	0,0011	1,5	Poldip3
1420953_at	7,3249	8,8184	0,0094	1,5	Add1
1448401_at	7,7814	9,2455	0,0056	1,5	Smarcd2
1417101_at	7,5979	9,0588	0,0018	1,5	Hspa2
1434987_at	4,0626	5,5212	0,0074	1,5	Aldh2
1433942_at	5,3876	6,8456	0,0011	1,5	Myo6
1436589_x_at	5,3851	6,8399	0,0029	1,5	Prkd2
1451176_at	7,1586	8,6129	0,0073	1,5	Mavs
1426427_at	6,3963	7,8376	0,0002	1,4	Ttll1
1431292_a_at	7,5337	8,9719	0,0035	1,4	Twf2
1451149_at	8,6311	10,0680	0,0092	1,4	Pgm2
1433919_at	3,9325	5,3652	0,0059	1,4	Asb4
1448121_at	7,5100	8,9349	0,0006	1,4	Wbp2
1452226_at	8,7111	10,1297	0,0073	1,4	Rcc2
1428750_at	9,6226	11,0405	0,0012	1,4	Cdc42ep2
1418238_at	8,7756	10,1819	0,0000	1,4	Ivd
1417013_at	10,7069	12,1101	0,0068	1,4	Hspb8
1429876_at	7,1748	8,5708	0,0016	1,4	Supt7l
1439738_at	4,9858	6,3817	0,0044	1,4	Mettl13
1428110_x_at	7,1226	8,5179	0,0077	1,4	Vps11
1416127_a_at	9,4556	10,8450	0,0083	1,4	Dnpep
1426873_s_at	6,2183	7,5998	0,0009	1,4	Jup
1460292_a_at	4,9598	6,3396	0,0021	1,4	Smarca1
1422847_a_at	7,8214	9,1984	0,0067	1,4	Prkcd
1424130_a_at	11,8576	13,2323	0,0039	1,4	Ptrf
1428759_s_at	7,8012	9,1747	0,0085	1,4	Cwc25
1419329_at	6,7000	8,0625	0,0004	1,4	Sorbs3
1460641_a_at	7,1345	8,4969	0,0002	1,4	Rbm42
1447780_x_at	9,6625	11,0211	0,0094	1,4	Tufm
1433604_x_at	10,9083	12,2660	0,0018	1,4	Aldoa
1454840_at	6,6998	8,0535	0,0023	1,4	Mccc2
1434050_at	6,3406	7,6917	0,0010	1,4	Vps8
1456937_at	5,4504	6,7984	0,0046	1,3	Cdh26
1448215_a_at	8,4379	9,7848	0,0008	1,3	Dpp3
1425656_a_at	7,2212	8,5658	0,0036	1,3	Baiap2
1416675_s_at	7,3708	8,7124	0,0033	1,3	Plcd1
1426534_a_at	7,9928	9,3342	0,0069	1,3	Arfgap3
1433890_a_at	8,7640	10,1043	0,0048	1,3	Bat3
1426891_at	6,8378	8,1771	0,0025	1,3	Rpap1
1445897_s_at	9,8868	11,2234	0,0020	1,3	Ifi35
1424453_at	6,0427	7,3782	0,0084	1,3	Pcyt1a

1435802_at	6,3303	7,6569	0,0009	<b>1,3</b>	Zbtb45
1428895_at	6,5049	7,8263	0,0014	<b>1,3</b>	Rftn2
1437243_at	5,5117	6,8326	0,0002	<b>1,3</b>	D2hgdh
1417526_at	9,1337	10,4510	0,0095	<b>1,3</b>	Pcbp3
1455467_at	5,2966	6,6116	0,0095	<b>1,3</b>	Fam188b
1448522_at	6,4739	7,7881	0,0084	<b>1,3</b>	Sars2
1447803_x_at	3,9354	5,2444	0,0093	<b>1,3</b>	Capg
1422550_a_at	6,5510	7,8544	0,0036	<b>1,3</b>	Mtap6
1427669_a_at	6,0754	7,3741	0,0012	<b>1,3</b>	Cit
1451339_at	5,7350	7,0317	0,0082	<b>1,3</b>	Suox
1428378_at	6,0420	7,3386	0,0078	<b>1,3</b>	Zc3hav1
1426944_at	8,1256	9,4218	0,0029	<b>1,3</b>	Fbxw8
1417793_at	4,7867	6,0816	0,0073	<b>1,3</b>	Irgm2
1418965_at	8,2419	9,5362	0,0006	<b>1,3</b>	Nosip
1423777_at	7,0082	8,3011	0,0023	<b>1,3</b>	Usp20

### 5.3.5 RIP-Chip-Daten für N-terminales eIF-5A1

Affymetrix Sonden Set ID	Mittelwert Basisgruppe	Mittelwert Testgruppe	p-Wert	Signal Log Ratio	Gensymbol
1449250_at	7,3589	11,0901	0,0001	<b>3,7</b>	Prcc
1433892_at	8,1794	11,3064	0,0030	<b>3,1</b>	Spag5
1457695_at	6,8540	9,8983	0,0005	<b>3,0</b>	Synrg
1451891_a_at	7,7407	10,7753	0,0022	<b>3,0</b>	Dysf
1417621_at	5,8756	8,8815	0,0000	<b>3,0</b>	Nfatc1
1422847_a_at	7,8214	10,7868	0,0002	<b>3,0</b>	Prkcd
1424548_at	7,3265	10,2807	0,0010	<b>3,0</b>	Lime1 /// Zgpat
1433893_s_at	9,3074	12,2342	0,0040	<b>2,9</b>	Spag5
1435644_at	9,3020	12,1302	0,0000	<b>2,8</b>	Sh3pxd2b
1454789_x_at	9,3287	12,1314	0,0006	<b>2,8</b>	Prpf6
1419370_a_at	9,5054	12,2769	0,0005	<b>2,8</b>	Mfap1a
1418175_at	7,3024	10,0631	0,0036	<b>2,8</b>	Vdr
1416756_at	8,9601	11,7082	0,0000	<b>2,7</b>	Dnajb1
1419685_at	6,6958	9,3639	0,0017	<b>2,7</b>	Upf1
1428479_at	7,6564	10,3212	0,0001	<b>2,7</b>	Nfatc1
1423379_at	5,4673	8,0745	0,0021	<b>2,6</b>	Nfatc4
1434832_at	7,4997	10,1038	0,0001	<b>2,6</b>	Foxo3
1448618_at	7,7649	10,3634	0,0001	<b>2,6</b>	Mvp
1417039_a_at	9,3640	11,9406	0,0001	<b>2,6</b>	Cul7
1423659_a_at	7,5323	10,0763	0,0001	<b>2,5</b>	Tbc1d17
1449445_x_at	10,4256	12,9669	0,0000	<b>2,5</b>	Mfap1a
1434333_a_at	4,3706	6,8993	0,0086	<b>2,5</b>	Prkd2
1437532_at	7,5623	10,0722	0,0001	<b>2,5</b>	Rnf216
1422584_at	7,5673	10,0387	0,0020	<b>2,5</b>	Skiv2l
1422591_at	7,6749	10,1414	0,0006	<b>2,5</b>	Tceb3

1450569_a_at	7,9986	10,4649	0,0008	<b>2,5</b>	Rbm14
1438268_at	7,0070	9,4708	0,0075	<b>2,5</b>	Rc3h2
1442743_at	5,5153	7,9496	0,0007	<b>2,4</b>	Trip4
1436732_s_at	7,7754	10,2048	0,0011	<b>2,4</b>	Fbxw8
1416755_at	10,8475	13,2692	0,0000	<b>2,4</b>	Dnajb1
1449444_a_at	10,0399	12,4515	0,0032	<b>2,4</b>	LOC100048499 /// Mfap1a /// Mfap1b
1452672_at	8,6424	11,0513	0,0001	<b>2,4</b>	Thoc5
1426928_at	5,1930	7,5974	0,0029	<b>2,4</b>	Ccdc93
1449001_at	7,5733	9,9722	0,0000	<b>2,4</b>	Ivd
1427498_a_at	6,9693	9,3454	0,0054	<b>2,4</b>	Spag5
1450976_at	8,4661	10,8304	0,0008	<b>2,4</b>	Ndrp1
1425902_a_at	7,0708	9,4252	0,0013	<b>2,4</b>	Nfkb2
1434831_a_at	8,9911	11,3352	0,0000	<b>2,3</b>	Foxo3
1416780_at	8,9255	11,2613	0,0010	<b>2,3</b>	Pfkm
1449060_at	9,1649	11,4961	0,0054	<b>2,3</b>	Kif2c
1424078_s_at	8,2955	10,6165	0,0038	<b>2,3</b>	Pex6
1441727_s_at	5,2853	7,6014	0,0054	<b>2,3</b>	Zfp467
1434117_at	8,5462	10,8616	0,0043	<b>2,3</b>	Tceb3
1451274_at	8,8238	11,1376	0,0002	<b>2,3</b>	Ogdh
1439825_at	5,7568	8,0673	0,0082	<b>2,3</b>	Dtx3l
1415713_a_at	9,8952	12,1925	0,0011	<b>2,3</b>	Ddx24
1422858_at	8,6797	10,9700	0,0005	<b>2,3</b>	Trip4
1415945_at	9,9504	12,2401	0,0000	<b>2,3</b>	Mcm5
1437926_at	8,9229	11,2100	0,0001	<b>2,3</b>	Xpnpep3
1418752_at	5,9513	8,2357	0,0068	<b>2,3</b>	Aldh3a1
1452429_s_at	7,8193	10,0947	0,0002	<b>2,3</b>	Abcf1
1452003_at	6,1364	8,4033	0,0049	<b>2,3</b>	Rbm14
1435681_s_at	5,3887	7,6521	0,0040	<b>2,3</b>	Ddx49
1460371_at	6,2234	8,4793	0,0014	<b>2,3</b>	Hspa12b
1448907_at	7,6684	9,9187	0,0005	<b>2,3</b>	Thop1
1451226_at	8,3579	10,6028	0,0044	<b>2,2</b>	Pex6
1415985_at	10,3525	12,5842	0,0001	<b>2,2</b>	Sf3b3
1426944_at	8,1256	10,3555	0,0010	<b>2,2</b>	Fbxw8
1450785_at	3,6269	5,8540	0,0000	<b>2,2</b>	Trip4
1422327_s_at	5,8924	8,1185	0,0009	<b>2,2</b>	G6pd2 /// G6pdx
1438022_at	6,9974	9,2230	0,0004	<b>2,2</b>	Rab11fip3
1422478_a_at	6,9875	9,2054	0,0004	<b>2,2</b>	Acss2
1448278_at	7,4272	9,6447	0,0036	<b>2,2</b>	Xab2
1424036_at	9,3462	11,5629	0,0010	<b>2,2</b>	Prpf6
1425326_at	9,2266	11,4390	0,0004	<b>2,2</b>	Acly
1427304_at	6,2674	8,4758	0,0027	<b>2,2</b>	Vps18
1437987_at	5,4941	7,6916	0,0006	<b>2,2</b>	---
1459840_s_at	5,8278	8,0209	0,0063	<b>2,2</b>	Ccdc28b
1418179_at	5,2438	7,4331	0,0014	<b>2,2</b>	Atg3
1450957_a_at	10,1136	12,3026	0,0000	<b>2,2</b>	Sqstm1

---

1437032_x_at	8,6524	10,8387	0,0025	<b>2,2</b>	Rbm14
1434445_at	5,9484	8,1314	0,0057	<b>2,2</b>	Arhgap39
1449660_s_at	8,6921	10,8709	0,0013	<b>2,2</b>	Coro1c
1455942_at	7,5699	9,7467	0,0091	<b>2,2</b>	Kdm2a
1423882_at	10,0504	12,2250	0,0004	<b>2,2</b>	Rfwd3
1454985_at	7,1338	9,3024	0,0002	<b>2,2</b>	Ambra1
1460692_at	9,6036	11,7593	0,0038	<b>2,2</b>	Ehmt2
1428105_at	9,0333	11,1867	0,0055	<b>2,2</b>	Tpx2
1423264_at	9,2951	11,4478	0,0017	<b>2,2</b>	Bop1
1452920_a_at	8,9415	11,0926	0,0008	<b>2,2</b>	Ppil2
1451111_at	7,3689	9,5178	0,0016	<b>2,1</b>	Nup133
1420930_s_at	9,7505	11,8947	0,0088	<b>2,1</b>	Cttnal1
1439738_at	4,9858	7,1289	0,0008	<b>2,1</b>	Mettl13
1424023_at	7,6859	9,8137	0,0002	<b>2,1</b>	Ctu1
1418176_at	8,5407	10,6668	0,0001	<b>2,1</b>	Vdr
1415750_at	7,7602	9,8830	0,0023	<b>2,1</b>	Tbl3
1418978_at	6,5353	8,6524	0,0003	<b>2,1</b>	Sap30bp
1416038_at	9,5454	11,6610	0,0024	<b>2,1</b>	Snd1
1416647_at	7,7133	9,8273	0,0005	<b>2,1</b>	Bckdha
1452583_s_at	5,2333	7,3435	0,0010	<b>2,1</b>	Galm
1425761_a_at	5,9139	8,0238	0,0004	<b>2,1</b>	Nfatc1
1420543_at	5,3538	7,4598	0,0036	<b>2,1</b>	Dnajc28
1452690_at	9,2734	11,3768	0,0004	<b>2,1</b>	Khsrp
1456937_at	5,4504	7,5460	0,0007	<b>2,1</b>	Cdh26
1420863_at	6,5547	8,6432	0,0054	<b>2,1</b>	Dctn4
1451006_at	7,9379	10,0262	0,0024	<b>2,1</b>	Xdh
1439496_at	10,3524	12,4400	0,0029	<b>2,1</b>	Ston1
1426747_at	8,1435	10,2287	0,0012	<b>2,1</b>	Abcf3
1422799_at	8,7899	10,8739	0,0032	<b>2,1</b>	Bat2

## 5.4 Danksagung

Ganz herzlich danken möchte ich...

... **PD Dr. Dr. Stefan Balabanov** für die Bereitstellung dieses interessanten Promotionsthemas und die großartige Unterstützung während der gesamten Zeit.

... **Prof. Dr. Joachim Hauber** für die Betreuung der Doktorarbeit, die unkomplizierte Aufnahme in sein Labor und die große Unterstützung.

... **PD Dr. Sabine Hoffmeister-Ullerich** für die Übernahme des Zweitgutachtens und die vielen hilfreichen Ratschläge.

... **PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer** für die wertvollen Anregungen, das für Fragen immer offene Ohr und die vielfältige Unterstützung.

... **allen Kooperationspartnern, insbesondere Dr. Michaela Schweizer und Dr. Melanie Neumann sowie Sabrina Noster** für die gute Zusammenarbeit.

... **Dr. Melanie Balabanov** für die anregenden Diskussionen und wertvolle Unterstützung.

... **Michael, Henning und allen weiteren Mitgliedern der AG Balabanov, sowie Christine, Jasmin und Sarah** für die weit mehr als kollegiale Atmosphäre und schöne Zeit im Campus Forschung.

... **der gesamten Abteilung 4 vom HPI** für die herzliche Aufnahme, Hilfsbereitschaft und tolle Arbeitsatmosphäre.

... **meinen Eltern, Christoph, Lea und meinen Freunden**, die mir immer unterstützend und motivierend zur Seite standen.

## 5.5 Während dieser Arbeit entstandene Publikationen

**Pällmann N**, Sievert H, Preukschas M, Hermans-Borgmeyer I, Schweizer M, Neumann M, Hagel C, Bokemeyer C, Braig M, Hauber J, Balabanov S. Functional relevance of hypusine modification in higher eukaryotes. *In Vorbereitung*.

Sievert H, **Pällmann N\***, Miller KK\*, Hermans-Borgmeyer I, Venz S, Sendoel A, Preukschas M, Schweizer M, Böttcher S, Janiesch PC, Walther R, Hengartner MO, Brümmendorf TH, Bokemeyer C, Braig M, Hauber J, Duncan KE, Balabanov S. EIF5A hypusination by DOHH is crucial for embryonic development, proliferation and oncogenic transformation. *Zur Publikation eingereicht (2013)*.

Preukschas M, Hagel C, Schulte A, Weber K, Lamszus K, Sievert H, **Pällmann N**, Bokemeyer C, Hauber J, Braig M, Balabanov S. Expression of eukaryotic initiation factor 5A and hypusine forming enzymes in glioblastoma patient samples: implications for new targeted therapies. *PLoS One*. 2012;7(8):e43468.

Sievert H, Venz S, Platas-Barradas O, Dhople VM, Schaletzky M, Nagel CH, Braig M, Preukschas M, **Pällmann N**, Bokemeyer C, Brümmendorf TH, Pörtner R, Walther R, Duncan KE, Hauber J, Balabanov S. Protein-protein-interaction network organization of the hypusine modification system. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11(11):1289-1305.

## 5.6 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 22.08.2013

---

(Nora Pällmann)