

FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DES HISTIDIN-TRIADEN (HIT)-PROTEINS HINT2

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

CHRISTOPHER WIRTHS
aus Würzburg

August 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. O. Huber
Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und
Pathobiochemie
Campus Benjamin Franklin
Charité - Universitätsmedizin Berlin
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Gust
Fachbereich für Biologie, Chemie und Pharmazie
Institut für Pharmazie
Freie Universität Berlin
- Disputation am: 20. November 2006

*Für meinen Vater
Dr. med. Rainer Wirths
(geb. 8. Juli 1942, gest. 5. Juli 2006)*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Die Familie der HIT-Proteine	1
1.1.1 Die enzymatische Aktivität der HIT-Proteine	1
1.1.2 Strukturelle Gemeinsamkeiten der HIT-Proteine	3
1.1.3 Die Hint-Proteine	5
1.1.3.1 Hint1, Hint2 und Hint3	5
1.1.3.2 DcpS	12
1.1.3.3 Aprataxin	13
1.1.4 Fhit-Proteine	14
1.1.5 Die GalT-Proteine	15
1.2 Der Wnt-Signalweg	16
1.2.1 β -Catenin	17
1.2.2 Die Transkriptionsregulation durch den LEF-1/TCF- β -Catenin Komplex	19
1.2.3 Die Wnt-Antagonisten Pontin52 und Reptin52	20
1.2.4 Hint1 als Inhibitor der LEF-1/TCF- β -Catenin-vermittelten Transkriptionsaktivität	20
1.3 Zielsetzung der Arbeit	22
2 Material	23
2.1 Geräte	23
2.1.1 Elektrophorese- und Blotapparaturen	23
2.1.2 Zentrifugen	23
2.1.3 Zell- und Bakterienkultur	23
2.1.4 Sonstige Geräte	24
2.2 Verbrauchsgegenstände	25
2.2.1 Chemikalien	25
2.2.2 Verbrauchsmaterialien	26
2.2.3 Zellkultivierungslösungen	27
2.2.4 Reaktionskits	27
2.2.5 Molekulargewichtsstandards	28

2.3	DNA	29
2.3.1	Vektoren	29
2.3.2	cDNA	29
2.3.3	Oligonukleotide und Primer	30
2.4	Proteine	31
2.4.1	Enzyme	31
2.4.2	Antikörper	31
2.4.2.1	Primärantikörper	31
2.4.2.2	Sekundärantikörper	32
2.5	Zelllinien	33
2.5.1	Eukaryotische Zellen	33
2.5.2	Prokaryotische Zellen	33
3	Methoden	34
3.1	Molekularbiologische Methoden	34
3.1.1	PCR	34
3.1.2	DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen	35
3.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	35
3.1.4	Isolation von DNA aus Agarosegelen	36
3.1.5	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	36
3.1.6	Ligation von cDNA in Vektoren	36
3.1.7	Transformation	37
3.1.8	Isolierung von Plasmid aus <i>E. coli</i>	38
3.1.9	Kontroll-PCR	39
3.1.10	Sequenzierung von Plasmid-DNA	39
3.1.11	Konzentrationsmessung von DNA-Lösungen	40
3.1.12	Ortspezifische Mutagenese	41
3.2	Proteinbiochemische Methoden	42
3.2.1	Rekombinante Proteinexpression	42
3.2.1.1	Induktion der Proteinexpression	42
3.2.1.2	Lyse der Bakterien und Aufreinigung der Proteine	42
3.2.1.3	Dialyse	44
3.2.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	44
3.2.3	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44

3.2.4	Coomassie Brilliant Blue-Färbung	46
3.2.5	Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membran	46
3.2.6	Immundetektion	47
3.3	Zellbiologische Methoden	48
3.3.1	Zellkultur	48
3.3.2	Passagierung von HEK293-, HeLa- und SW480-Zellen	48
3.3.3	Transfektion von Zellen	49
3.3.3.1	Transfektion von HEK293-Zellen	49
3.3.3.2	Transfektion von HeLa-Zellen	49
3.4	Anti-Hint2-Antikörper-Aufreinigung	50
3.4.1	Immunisierung von Kaninchen	50
3.4.2	Vorbereitung der Affinitätschromatographiesäulen	50
3.4.3	Isolation des anti-Hint2-Antikörpers	51
3.4.4	Charakterisierung des anti-Hint2-Antikörpers	51
3.5	Interaktionsstudien	53
3.5.1	Immunpräzipitation	53
3.5.1.1	Passagieren von Zellen für die Immunpräzipitation	53
3.5.1.2	Lyse der Zellen	53
3.5.1.3	Durchführung der Immunpräzipitation	54
3.5.1.4	Endogene Immunpräzipitation	54
3.5.2	Nachweis der direkten Interaktion mittels Pull-down	54
3.5.3	Gelfiltration	55
3.5.4	Reporteranalysen	56
3.5.4.1	Untersuchung der Beeinflussung der TCF- β -Catenin- Transkriptionsaktivität durch Hint2	56
3.5.4.2	Analysen mit LEF-1-Konstrukten	57
3.5.4.3	Experimente zur Cyclin D1-Promotorregulierung	57
3.6	Enzymatische Aktivitätsanalysen	58
3.6.1	Allgemeine Versuchsbedingungen	58
3.6.2	Analyse verschiedener Substrate	59
3.6.3	Einfluss von Mg^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen	59
3.6.4	Ermittlung des pH-Optimums	59
3.6.5	K_m -Wert-Bestimmung	60
3.6.6	Untersuchung von Hint2-Mutanten	60

3.7	Fluoreszenzmikroskopie	61
3.7.1	Aussäen von Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie	61
3.7.2	Nachweis von homodimeren Hint2-Proteinkomplexen in HeLa-Zellen	61
3.7.3	Lokalisation von Hint2 in HEK293-Zellen	61
3.7.4	Mitochondriale Lokalisation von Hint2-YFP in HEK293-Zellen	62
4	Ergebnisse	63
4.1	Homodimerisierung von Hint2	63
4.1.1	Pull-down-Experimente zum Nachweis des Homodimers	63
4.1.2	Nachweis von homodimeren Hint2-Proteinkomplexen in HEK293-Zellen	64
4.2	Hint2 bildet Heterodimere mit Hint1 und Hint3	66
4.2.1	Heterodimerisierung von Hint2 mit den Hint-Proteinen 1 und 3 in Pull-down-Experimenten	66
4.2.2	Nachweis der Hint2-Heterodimere mit Hint1 und Hint3 in HEK293-Zellen	67
4.3	Identifizierung der die Dimerisierung vermittelnden Bindungsstelle im Hint2-Protein	70
4.4	Nachweis des Hint3-Homodimers und der Heterodimerisierung mit Hint1	73
4.4.1	Hint1 und Hint3 interagieren im Pull-down-Assoziationstest	73
4.4.2	Hint3-Proteine homodimerisieren in HEK293-Zellen	73
4.4.3	Heterodimere Komplexe zwischen Hint1 und Hint3 sind in HEK293-Zellen nachweisbar	74
4.5	Untersuchung der enzymatischen Aktivität von Hint2	76
4.5.1	Identifizierung von AMA als Substrat für Hint2	76
4.5.2	Analyse des Einflusses von Mg ²⁺ - und Zn ²⁺ -Ionen auf die enzymatische Aktivität von Hint2	79
4.5.3	Bestimmung des pH-Optimums	80
4.5.4	Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante	81
4.5.5	Nachweis der Homodimerisierung der Hint2-H149N-Mutante	84
4.5.6	Charakterisierung von Hint2-Punktmutanten	86
4.6	Aufreinigung und Charakterisierung eines anti-Hint2-Antikörpers	89

4.6.1	Aufreinigung des Antikörpers	89
4.6.2	Charakterisierung des anti-Hint2-Antikörpers	89
4.6.2.1	Kreuzreaktivität- und Spezifität	89
4.6.2.2	Nachweis von endogenem Hint2 in Zelllysaten	91
4.7	Lokalisation von homodimeren Hint2-Proteinkomplexen, endogenem und YFP-getaggttem Hint2 in Zellen	92
4.7.1	Fluoreszenzmikroskopie mit CFP-/YFP-Hint2 in HeLa-Zellen	92
4.7.2	Lokalisation von Hint2 in HEK293-Zellen	94
4.7.3	Nachweis von Hint2-YFP in den Mitochondrien von HEK293-Zellen	96
4.8	Interaktion von Hint2 mit β -Catenin	102
4.8.1	Immunpräzipitation von Hint2/ β -Catenin-Komplexen aus HEK293-Zelllysaten	102
4.8.2	Darstellung endogener Hint2/ β -Catenin-Komplexe	103
4.8.3	Pull-down mit Proteinen des Wnt-Signalweges und Hint2	104
4.8.4	Hint2 moduliert die Wnt-induzierte Transkription	105
4.8.4.1	Reprimierung der TCF- β -Catenin-Transkriptionsaktivität durch Hint2	106
4.8.4.2	Hint2 beeinflusst nicht die durch LEF-VP16 aktivierte Transkription	108
4.8.4.3	Dosisabhängige Induktion des Cyclin D1-Promotors durch Hint 2	109
5	Diskussion	110
5.1	Hint2 bildet homodimere Komplexe und ist ein mitochondriales Protein	110
5.2	Hint2 heterodimerisiert mit Hint1 und Hint3	112
5.3	Untersuchungen zu Hint1 und Hint3	114
5.4	Hint2 ist eine AMP-NH ₂ -Hydrolase	115
5.5	Hint2 interagiert mit β -Catenin	118
6	Ausblick	121
7	Zusammenfassung	123
8	Literaturverzeichnis	125

9 Anhang	134
9.1 Lebenslauf	134
9.2 Danksagung	135

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumenanteil im Verhältnis zum Volumen
(w/v)	Gewichtsanteil im Verhältnis zum Volumen
aaRS	Aminoacyl-tRNA Synthetasen
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5`-diphosphat
AMA	Adenosin-5`-monophosphoramidat (AMP-NH ₂)
AMP	Adenosin-5`-monophosphat
Amp	Ampicillin
AOA1	Ataxia-ocular apraxia 1
Ap ₃ A	Diadenosin-5`, 5``-triphosphat
Ap ₄ A	Diadenosin-5`, 5``-tetraphosphat
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
AU	Absorption Units
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
cDNA	copy DNA (komplementäre DNA zu einer mRNA)
CIP	calf intestinal phosphatase (alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)
DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindol
DcpS	scavenger mRNA decapping enzyme
DMBA	7, 12-Dimethylbenz[a]anthracen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleotid-5`-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECT	E-Cadherin cytoplasmatischer Teil
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)

Fhit	fragile HIT
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung; $9,81 \text{ m/s}^2$
GalT	Galactose-1-phosphat-uridyl-Transferase
GSK3 β	Glycogen-Synthase-Kinase 3 β
GST	Gluthathion-S-Transferase
h	Stunde
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
His	Histidin
HIT	Histidin-Triade
HMG-Box	high mobility group-box
HPLC	high pressure liquid chromatographie (Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie)
HRPO	horseradish peroxidase (Merretich-Peroxidase)
IB	Immunblot
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
LEF-1	lymphoid enhancer factor-1
M	Molar; Mol pro Liter
MBP	Maltose-Bindungsprotein
min	Minute(n)
MITF	microphthalmia transcription factor
mRNA	messenger RNA
MW	molecular weigth (Molekulargewicht)
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NMBA	N-Nitrosomethylbenzylamin
ON	Oligonukleotid
p.a.	pro analysi (Angabe zum Reinheitsgrad)
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese

PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
Upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TCF	T-cell factor
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
Triton X-100	t-Oktylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	units (Einheiten)
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UV	Ultraviolett
WB	Western Blot
WT	Wildtyp