

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Familie der HIT-Proteine

Die Proteine der HIT (Histidin-Triade)-Familie weisen das gemeinsame Aminosäuremotiv His-X-His-X-His-XX (X = hydrophobe AS) auf und finden sich hochkonserviert in vielen Organismen [Seraphin, 1992]. Anhand deren Aminosäuresequenz-Homologien und strukturellen Ähnlichkeiten lassen sich HIT-Proteine in drei Gruppen unterteilen [Brenner, 2002]:

- Hint-Proteine (histidine triad nucleotide binding-Proteine)
- Fhit-Proteine (fragile histidine triad-Proteine)
- Galactose-1-phosphat-uridyl-Transferasen (GalT-Proteine)

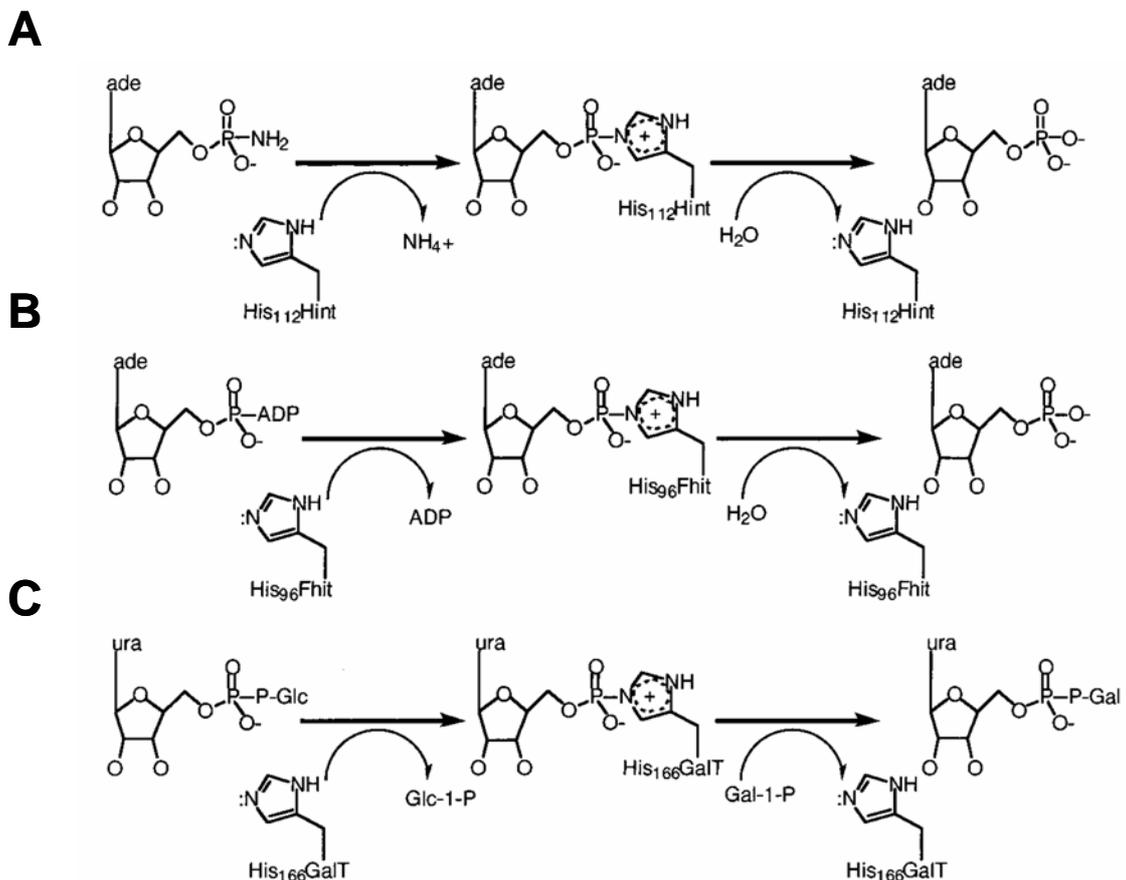
### 1.1.1 Die enzymatische Aktivität der HIT-Proteine

Für die Mitglieder der HIT-Protein-Superfamilie wird eine Nukleotid-Hydrolase- und/oder Nukleotid-Transferase-Aktivität postuliert [Lima et al., 1997], wobei die Histidin-Triade das aktive Zentrum dieser Enzyme bildet. Im Verlauf der Reaktion entsteht ein Intermediat, bei dem die  $\alpha$ -Phosphat-Gruppe der Nukleotide kovalent an das mittlere Histidin der Triade gebunden wird, das somit eine für die Enzymaktivität essentielle Aminosäure darstellt (Abb. 1.1) [Lima et al., 1997; Brenner, 2002].

Als Substrate konnten bisher die Moleküle ADP, ATP, Ap<sub>3</sub>A, Ap<sub>4</sub>A und AMP-X-Verbindungen identifiziert werden, die von den Angehörigen der HIT-Proteinfamilie mit unterschiedlicher Spezifität umgesetzt werden [Barnes et al., 1996; Brenner, 2002]. Während ADP und ATP als ubiquitäre Moleküle mit zahlreichen Funktionen seit Jahrzehnten bekannt sind, wurden die potenziellen Signalmoleküleigenschaften von Ap<sub>n</sub>A-Molekülen erst 1998 beschrieben [Kisselev et al., 1998]. Ap<sub>n</sub>A werden von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (aaRS) gebildet [Vartanian et al., 1997] und üben über Purinrezeptoren Einfluss auf Gefäßzellen aus [Schlüter et al., 1996]. Zudem gibt es Hinweise, dass das intrazelluläre Verhältnis von Ap<sub>3</sub>A und Ap<sub>4</sub>A Differenzierungs- und Apoptoseprozesse beeinflusst [Vartanian et al., 1997, 1999]. Die zusammenfassend als AMP-X bezeichneten

Moleküle AMP-NH<sub>2</sub> (Adenosin-5'-monophosphoramidat, AMA) und Adenosin-5'-phosphosulfat (AMP-SO<sub>4</sub>) konnten ebenfalls als Substrate identifiziert werden [Brenner, 2002]. Die Existenz dieser ungewöhnlichen Nukleotide *in vivo* wurde erstmalig 1981 bewiesen [Fankhauser et al., 1981]. Andere Verbindungen, bei denen die Phosphatgruppe von AMP über ein Stickstoffatom kovalent verknüpft ist, könnten Aminosäuren wie z.B. Lysin sein, die im Rahmen von Stoffwechselprozessen mit AMP verknüpft wurden und somit als Proteinmodifikationen funktionell von Bedeutung sein könnten [Bieganowski et al., 2002; Brenner, 2002].

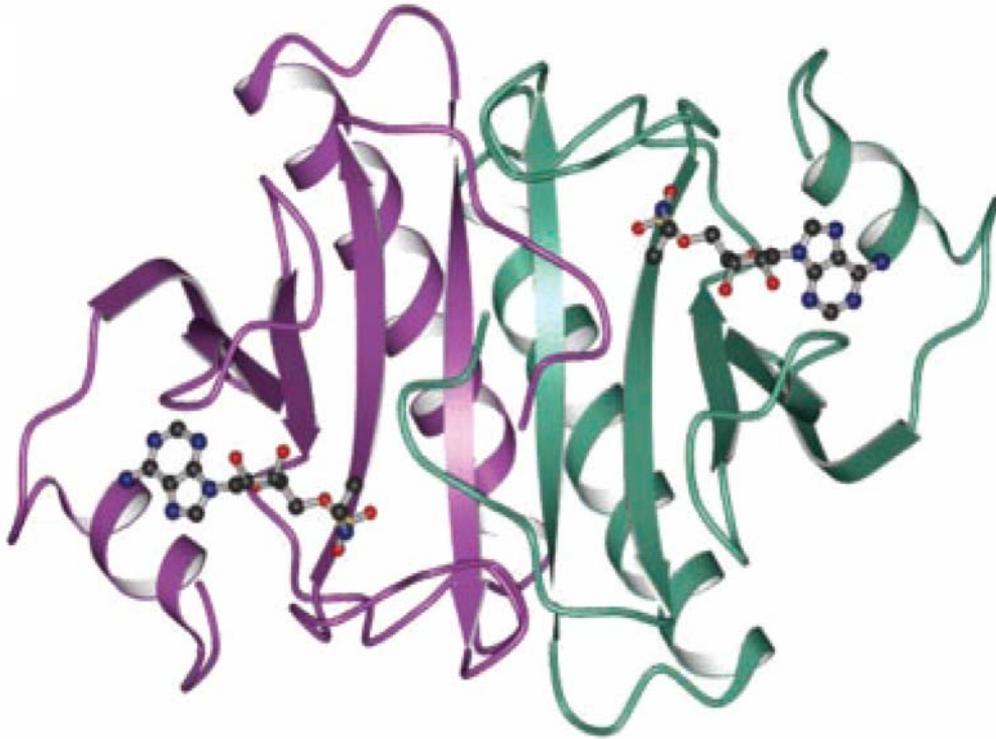
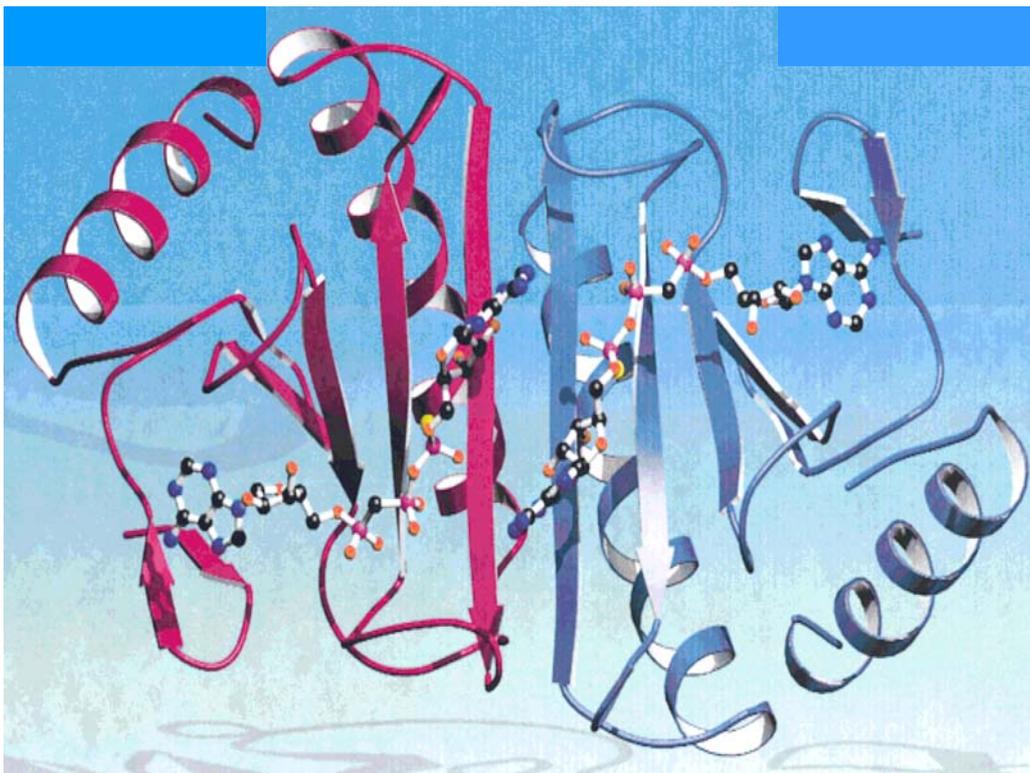
Die Proteine der GalT-Gruppe vermögen als Nukleotid-Transferasen Uridin-5'-monophosphat von UDP-Glucose auf die Phosphatgruppe von Galactose-1-phosphat unter Bildung von UDP-Galactose zu übertragen (Abb. 1.1 und Kapitel 1.1.3) [Wedekind et al., 1995].



**Abb. 1.1: Schematische Darstellungen der enzymatischen Reaktionen von HIT-Proteinen.** Dargestellt sind die Reaktionsabläufe je eines Mitgliedes der drei Gruppen der Superfamilie und die für die Funktionalität der Enzyme essentiellen Aminosäuren. **A)** Hint1 hydrolysiert AMA, **B)** Fhit spaltet Ap<sub>3</sub>A, **C)** GalT transferiert UMP zwischen Glucose-1-Phosphat und Galactose-1-Phosphat [aus Brenner, 2002].

### 1.1.2 Strukturelle Gemeinsamkeiten der HIT-Proteine

Als weiteres gemeinsames Merkmal der bisher charakterisierten HIT-Familienmitglieder wird deren homodimere Struktur beschrieben. Die 3D-Strukturen der Homodimere von Hint1 und Fhit weisen eine hohe Ähnlichkeit auf. Sie werden durch zehn antiparallele  $\beta$ -Faltblätter und vier  $\alpha$ -Helices gebildet. Die C-terminalen Aminosäuren ragen seitlich aus der Kernstruktur hinaus (Abb. 1.2). In der Nähe des C-terminalen Endes ist das aktive Zentrum, die Histidin-Triade lokalisiert. In der Abbildung ist dies durch die gebundenen Substrate erkennbar. Jedes Monomer bildet so ein unabhängiges aktives Zentrum aus. GalT liegt zwar als Monomer vor [Wedekind et al., 1995], seine  $\beta$ -Half-Barrel-Struktur bestehend aus dreizehn antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern und sechs  $\alpha$ -Helices ist allerdings in grafischen Projektionen nahezu deckungsgleich mit dem Hint1- und Fhit-Dimer [Brenner, 2002].

**A****B**

**Abb. 1.2: Dreidimensionale Ribbon-Diagramme von Hint1 und Fhit.** **A)** 3D-Darstellung des Hint1-Homodimers. Die einzelnen Monomere sind lila bzw. grün gefärbt, die gebundenen GMP-Analoga sind als Kalottenmodelle dargestellt [Krakowiak et al., 2004]. Zu erkennen sind die fünf antiparallel angeordneten Faltblattstrukturen der Proteine sowie die mittig angeordnete  $\alpha$ -Helix. **B)** Seitenansicht eines Fhit-Dimers mit einem gebundenen  $A_p_3A$ -Analogon. Die Monomere sind rot bzw. blau dargestellt, die Substratanaloga sind als Kalottenmodelle zu sehen [aus Brenner et al., 1999].

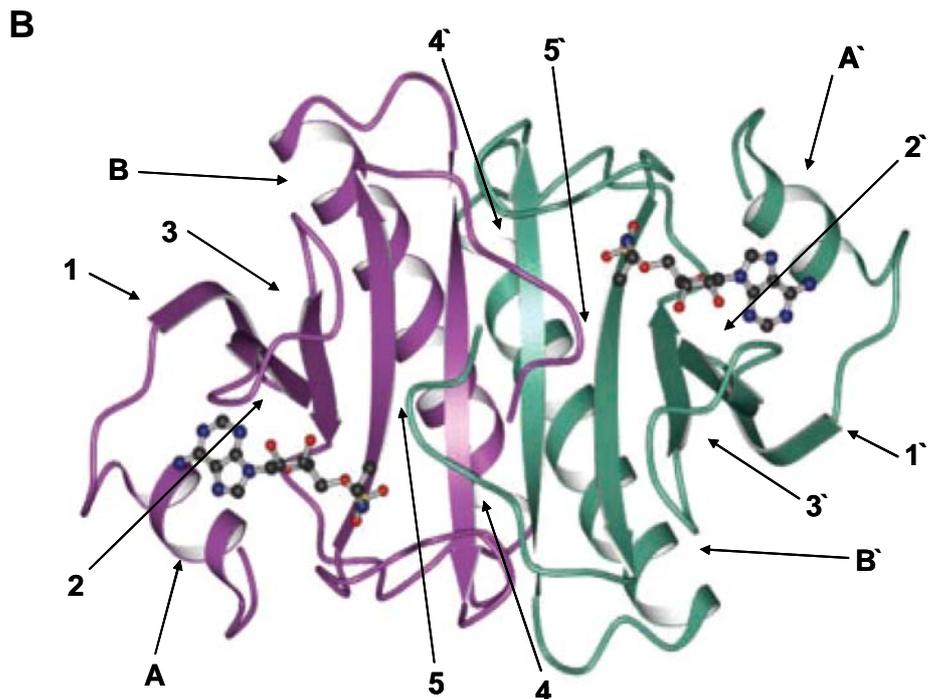
### **1.1.3 Die Hint-Proteine**

Die Hint-Familie fasst die Proteine zusammen, die strukturhomolog zu Hint1 sind. Beim Menschen werden dieser Subfamilie neben den direkten Verwandten Hint2 und Hint3 noch die Proteine Aprataxin und DcpS zugeordnet [Brenner, 2002; Liu et al., 2002].

#### **1.1.3.1 Hint1, Hint2 und Hint3**

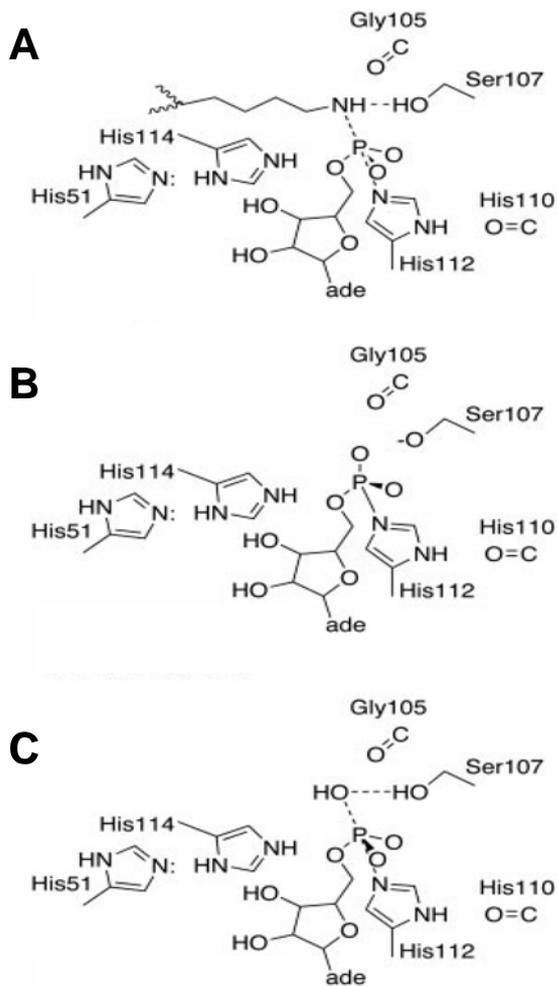
Das Protein Hint1 (histidine triad nucleotide binding protein 1) ist der mittlerweile am besten charakterisierte Vertreter des ältesten und im Laufe der Evolution konserviertesten Zweigs der HIT-Superfamilie [Brenner et al., 1999]. Hint-Proteine kommen im Gegensatz zu Fhit in allen Lebensformen vor. Hint1 wird in Säugetieren in sämtlichen Geweben exprimiert [Klein et al., 1998]. Erstmals 1990 aus Rinder-Hirn isoliert, wurde es zunächst als Proteinkinase C-Inhibitor (PKCI) bezeichnet [Pearson et al., 1990]. Im gleichen Zusammenhang wurden dem neu entdeckten Protein Zink-bindende Eigenschaften zugeschrieben, für die die Histidin-Triade verantwortlich gemacht wurde [Pearson et al., 1990; Mozier et al., 1991]. 1992 wurde die HIT-Superfamilie aufgrund bioinformatischer Analysen das erste Mal beschrieben [Seraphin, 1992] und PKCI/Hint1 wurde dieser Gruppe zugeordnet, als es im Rahmen von Affinitätschromatographischen Analysen aus verschiedensten Organismen und Geweben isoliert und charakterisiert worden war [Lima et al., 1996; Lima et al., 1997; Gilmour et al., 1997]. Die PKC-inhibierenden Eigenschaften und die Zink-Bindung durch die Histidin-Triade wurden später aber in Frage gestellt. Zwar konnten konformationale Veränderungen am Hint1-Molekül durch Zink-Ionen nicht ausgeschlossen werden [Brenner et al., 1999], die postulierte Nukleotid-bindende Funktion von Hint1 gewann jedoch immer mehr an Bedeutung [Lima et al., 1997; Gilmour et al., 1997]. Der Name des Proteins wurde daraufhin in „protein kinase c interacting protein 1“ abgewandelt, die Interaktion mit PKC wird jedoch nach wie vor kontrovers in der Literatur diskutiert [Lima et al., 1996; Lima et al., 1997; Gilmour et al., 1997; Klein et al., 1998; Brenner et al., 1999; Brenner, 2002]. Nachdem durch Röntgenstrukturanalysen auch für Hint1 bestätigt werden konnte, dass das natürlich vorkommende Protein als Homodimer vorliegt [Lima et al., 1996] und eine Half-Barrel-Struktur (vgl. Abb. 1.2) aufweist [Brenner et al., 1997], erfolgte die Einordnung in eine Untergruppe der HIT-Superfamilie neben GalT und Fhit [Brenner et al., 1999]. Das Hint1-Monomer besteht aus fünf  $\beta$ -Faltblättern

und zwei Helices (Abb. 1.3 A). Im fünften Faltblatt befindet sich die Histidin-Triade, die das Nukleotid-bindende Zentrum darstellt [Gilmour et al., 1997]. Die Homodimerisierung erfolgt über die C-terminalen Aminosäuren, wobei die Helix B bzw. B' (AS 68-86) das Dimerisierungsinterface zusammen mit dem Carboxyl-Ende des jeweiligen Protomers bilden (Abb. 1.3 B) [Lima et al., 1996].



**Abb. 1.3: Aminosäuresequenzvergleich von Hint-Proteinen verschiedener Lebewesen mit ihren Sekundärstrukturelementen und dreidimensionale Darstellung des Hint1-Dimers:** A) Aminosäurealignment, vollständig konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt. Helikale Sekundärstrukturen (nummeriert als A und B) sind schraffiert dargestellt, die schwarzen Pfeile geben die als  $\beta$ -Faltblätter vorliegenden Regionen an. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz von Hint1 aus *Homo sapiens* (GenBank data base accession no. U51004) und die dazu homologen Proteine aus *Bos taurus* (U09405), *Zea mays* (Z29643), *Oryza sativa callus* (D21291) und *Mycobacterium laprae* (U15187). Die Abbildung wurde übernommen aus Lima et al., 1996. B) 3D-Ribbon-Diagramm des Hint1-Dimers mit gebundenem N-Ethylsulfamoyladenosin (Kalottenmodell). Die Pfeile markieren die in A) eingezeichneten Sekundärstrukturen im jeweiligen Dimer (lila und grün). Modifiziert aus Krakowiak et al., 2004.

Hint1 ist eine AMP-NH<sub>2</sub>-Hydrolase und bindet *in vitro* mehrere Nukleotide, darunter AMP, ADP und die Diadenosin-Polyphosphate Ap<sub>3</sub>A und Ap<sub>4</sub>A [Lima et al., 1997; Bieganowski et al., 2002]. Die Hydrolyse von Verbindungen, bei denen AMP über ein Stickstoffatom an Proteine gebunden ist, wurde u.a. mit dem Substrat AMP-Lysin erforscht [Bieganowski et al., 2002; Krakowiak et al., 2004]. Diese Versuche gaben Hinweise darauf, dass Hint-Enzyme AMP von unspezifisch oder gezielt modifizierten Proteinen abspalten können [Bieganowski et al., 2002; Brenner, 2002]. Die strukturellen Eigenschaften der Adenosinmonophosphatamidat-Hydrolase Hint1 aus Kaninchen wurden detailliert untersucht, wobei die in den katalytischen Prozess theoretisch involvierten Aminosäuren identifiziert wurden [Krakowiak et al., 2004]. Bei dem postulierten Reaktionsablauf bindet im ersten Schritt das Phosphat des AMP-X-Substrats kovalent an das His112 des aktiven Zentrums (Adenylierung), die Abgangsgruppe XH wird durch das Ser107 protoniert und verlässt das katalytische Zentrum (Abb. 1.4). Der kovalente Übergangszustand wird durch die Histidine 51 und 110 stabilisiert (adenylierter Übergangszustand). Die Spaltung wird durch einen Angriff von Wasser an das His112 unter Rückbildung des Ausgangszustandes am Ser107 und Freisetzung von AMP hervorgerufen (Hydrolyse). Darüber hinaus konnte durch die Generierung einer Hefe Hnt1-H116A-Mutante demonstriert werden, dass der Austausch des mittleren Histidins der HIT gegen Alanin zum vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität führt [Bieganowski et al., 2002]. Weitere Analysen mit mutiertem Kaninchen Hint1, bei dem die dem aktiven Zentrum benachbarte Aminosäure Serin 107 gegen Alanin ausgetauscht wurde, zeigten eine signifikante Herabsetzung der Hydrolysegeschwindigkeit im Vergleich zum Wildtyp-Protein [Krakowiak et al., 2004].



**Abb. 1.4: Theoretischer Katalysemechanismus der Hydrolase**  
**Hint1:** A) Adenylierung des His112 und Protonierung des Substrates durch Ser107. B) adenylierter Übergangszustand, stabilisiert durch His114, Ser107 liegt als Alkyloxid-Anion vor. C) Hydrolyse des Übergangszustandes, AMP verläßt das aktive Zentrum, Serin 107 wird reprotoniert, die Ausgangskonfiguration der Phosphatgruppe wird wiederhergestellt. Abbildung modifiziert aus Krakowiak et al., 2004.

Die Frage nach der physiologischen Bedeutung des HIT-Vertreters Hint1 wurde bisher auf verschiedenste Art und Weise untersucht. In *E. coli* wurde das homologe Protein HinT unlängst als das einzige Enzym identifiziert, das den Bakterien zur Hydrolyse von Purinnukleotid-Phosphoramidat-Verbindungen zur Verfügung steht [Chou et al., 2005]. Der Verlust des HinT-Enzyms führt dazu, dass *E. coli*-Bakterien in stark salzhaltiger Umgebung in ihrem Wachstum gehemmt werden. Die Hydrolyse von Purinnukleotid-Phosphoramidat-Substraten scheint deshalb essentiell für das Wachstum unter diesen Bedingungen zu sein [Chou et al., 2005]. Untersuchungen zur Geschlechterentwicklung bei Vögeln zeigten, dass das zum humanen Hint1 homologe Protein Wpkci [Hori et al., 2000] und das für weibliche Embryonen spezifische Protein Asw [Ellegren, 2001] aufgrund ihrer Struktur in der Lage sein könnten, ein Heterodimer auszubilden [Pace et Brenner, 2003]. Es wurde herausgefunden, dass die Bildung dieses Heterodimers für die Determinierung des weiblichen Geschlechtes eine wesentliche Rolle spielt. Weitere aufklärende Experimente stehen allerdings noch aus [Pace et Brenner, 2003]. Für *Homo*

*sapiens*-Hint1 konnte eine Interaktion mit dem Protein ATDC festgestellt werden, von dem vermutet wurde, dass Defekte im dafür codierenden Gen an der Entstehung der Krankheit Ataxia-telangiectasia beteiligt sind [Brzoska et al., 1995]. Diese Erkrankung führt beim Menschen zu vielseitigen immunologischen, neurologischen und entwicklungsbiologischen Störungen sowie bei isolierten betroffenen Zellen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Strahlungseinflüssen [McKinnon, 2004]. Inzwischen hat sich aber herausgestellt, dass ATDC nicht das für die Erkrankung verantwortliche Gen darstellt.

Den ersten direkten Hinweis auf eine transkriptionsregulierende Rolle von Hint1 ergab die Beobachtung, dass Hint1 direkt mit dem Transkriptionsfaktor MITF (microphthalmia transcription factor) interagiert und dessen Transkriptionsaktivität reprimiert [Razin et al., 1999]. In weiterführenden Untersuchungen wurde dann gezeigt, dass MITF dabei mit Hint1 und der Aminoacyl-tRNA-Synthetase LysRS in einem Multiproteinkomplex vorliegt. In Mastzellen bildet die LysRS nach IgE-vermittelter Stimulation  $Ap_4A$ , das an Hint1 bindet und zur Dissoziation des Proteinkomplexes führt, womit MITF freigesetzt wird und die Transkription durch das nun an die DNA bindende MITF stimuliert wird [Lee et al., 2004]. Bei diesem Signalprozess scheint die Enzymaktivität von Hint1 keine Rolle zu spielen, da allein die Bindung von  $Ap_4A$  ausreicht, um die Transkription von MITF-Zielgenen zu aktivieren. Es zeigte sich somit, dass das Zusammenspiel von einem Nukleotidmolekül und einem HIT-Protein eine wichtige regulatorische Rolle in menschlichen Zellen spielen kann.

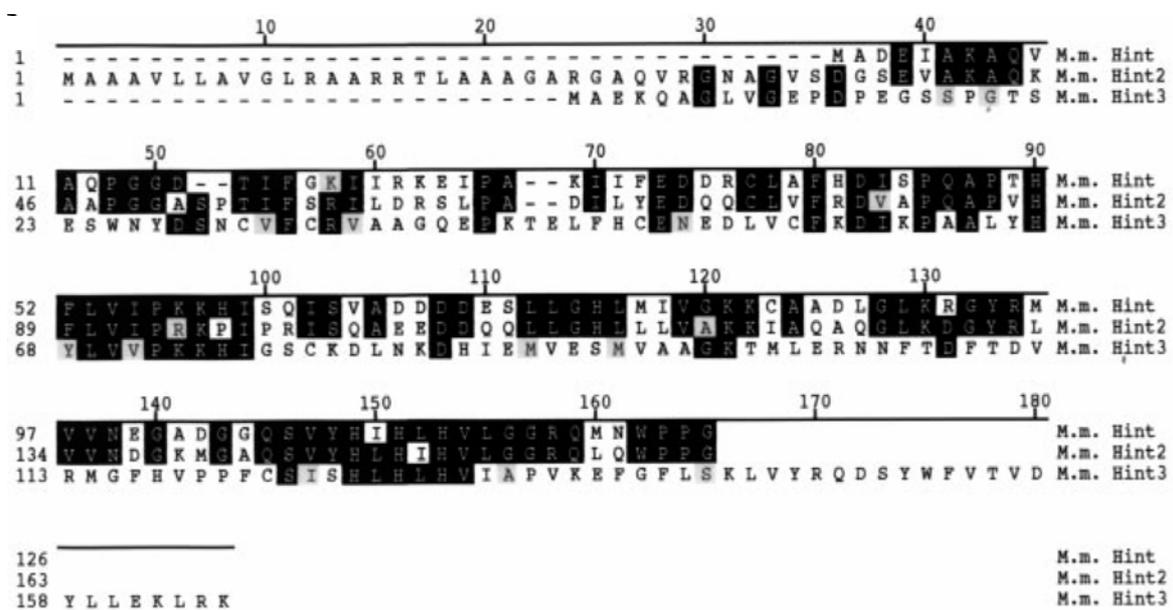
Weitere Hinweise für eine Beteiligung an Prozessen der Transkriptionsregulation ergaben sich, nachdem die Interaktion von Hint1 mit Cdk7 (cyclin-dependent kinase 7) entdeckt worden war [Korsisaari et Mäkelä, 2000]. Einerseits liegt diese Kinase in einem Multiproteinkomplex mit dem allgemeinen Transkriptionsfaktor TFIID vor und phosphoryliert die Untereinheit der RNA-Polymerase II, wodurch deren Aktivität reguliert wird [Kaldis, 1999]. Andererseits wirkt Cdk7 als CAK (cyclin dependent kinase activating kinase) und beeinflusst damit den Zellzyklus. Allerdings konnte in Hint1-Knockout-Mäusen kein Effekt auf die Funktion von Cdk7 nachgewiesen werden [Korsisaari et al., 2003]. Andere Experimente zeigten, dass Hint1 an der zellulären Antwort auf ionisierende Strahlung beteiligt ist, indem es die c-Fos-induzierte Transkription reprimiert [Choi et al., 2001]. Der genaue Mechanismus ist jedoch nicht bekannt.

Weitere wesentliche Erkenntnisse zur Rolle von Hint1 erbrachten neuere Analysen mit Hint1-Knockout-Mäusen. Diese wuchsen gesund heran und wiesen eine normale

Lebenserwartung auf. Jedoch führte die Behandlung mit NMBA (N-Nitrosomethylbenzylamin), einem für Fhit etablierten Tumor-induzierenden Experiment, zu einer höheren Häufigkeit der Ausbildung von Tumoren als bei Wildtyp-Tieren [Su et al., 2003]. Aktuelle Studien beschreiben Hint1 als haploinsuffizienten Tumorsuppressor, da bereits die Deletion eines Hint1-Allels in Mäusen sowohl zu einer vermehrten Ausbildung von spontanen Tumoren, als auch zu einer höheren Empfindlichkeit gegenüber induzierter Krebsbildung im DMBA (7,12-Dimethylbenz[a]anthracen)-Experiment führt [Li et al., 2005]. Nachdem diese Gemeinsamkeit zum bereits mehrfach beschriebenen Tumorsuppressor Fhit (siehe auch 1.1.2.) dokumentiert worden war, blieb die Frage offen, welchen Signalweg Hint1 beeinflusst, um die in den Knockout-Mäusen beobachteten Wirkungen zu entfalten. Neuere Arbeiten in der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass Hint1 als Interaktionspartner von Pontin und Reptin inhibitorisch auf die TCF- $\beta$ -Catenin-vermittelte Transkriptionsaktivität wirkt [Weiske and Huber, 2005]. Dadurch entsteht eine direkte Verbindung zwischen einem HIT-Protein und dem vielbeschriebenen Wnt-Signalweg (siehe auch 1.2), der bei einer Vielzahl von Tumoren dereguliert ist [Giles et al., 2003]. Außerdem zeigen neueste Ergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe, dass Hint1 in Tumorzellen Apoptose induzieren kann [Weiske and Huber, 2006]. Dieser Effekt scheint auf der Regulierung von pro- und antiapoptotischen Faktoren sowie der Assoziation von Hint1 an den Promotor des proapoptotischen Proteins Bax zu beruhen. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass Hint1 Teil des Chromatin-remodulierenden Tip60-Histon-Acetyltransferase-Komplexes ist. Interessant dabei ist, dass die proapoptotische Funktion unabhängig von der enzymatischen Aktivität von Hint1 ist, da auch das enzymatisch inaktive Hint1-H112N-Enzym in der Lage war, die Apoptose zu induzieren.

Von den zu Hint1 strukturell verwandtesten Proteinen Hint2 und Hint3 gibt es in der Literatur nur für Hint2 neue Ergebnisse, Hint3 wurde bislang nur am Rande beschrieben. *Mus musculus* Hint2 zeigt gegenüber Hint1 eine 61,3 %-ige Identität, Hint3 ist dem Hint1-Protein zu 21,3 % identisch [Korsisaari et al., 2003]. In Abbildung 1.5 sind die Aminosäuresequenzen der *Mus musculus*-Hint-Proteine dargestellt, die Histidin-Triade wurde dabei als Ausrichtungspunkt für die Anordnung der Aminosäuresequenzen gewählt. Auffällig ist die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz der drei Proteine im Bereich des aktiven Zentrums. Neben dem H-X-H-X-H-XX (X=Valin, Leucin oder Isoleucin)-Motiv ist auch das dem aktiven Zentrum benachbarte Serin bei allen Hint-Enzymen vorhanden. Vergleicht man die Länge der Proteine so fällt auf, dass Hint2 im N-terminalen Bereich 35 Aminosäuren länger ist als Hint1. Bei Hint3 sind sowohl der C- als auch der N-

Terminus verlängert. Da bei den Hint-Proteinen wie bei den bisher beschriebenen Vertretern der HIT-Familie das aktive Zentrum im C-terminalen Bereich lokalisiert ist, lassen sich Spekulationen bezüglich der unterschiedlich ausgebildeten N-Termini der Enzyme aufstellen. Untersuchungen an Hint1<sup>-/-</sup>-Mäusen, bei denen die mRNA-Level von Hint2 und Hint3 in verschiedenen Geweben analysiert wurden, zeigten, dass ein Verlust der Hint1-Funktionalität keine erhöhte Expression der anderen Hint-Proteine nach sich zieht [Korsisaari et al., 2003]. Eine funktionelle, kompensatorische Redundanz innerhalb dieser Familie konnte vorerst ausgeschlossen werden, was das Interesse an der Aufklärung der Funktion von Hint2 und Hint3 gesteigert hat.



**Abb. 1.5: Aminosäuresequenzen von Hint1, Hint2 und Hint3 aus *Mus musculus*:** In der Abbildung wurden die Sequenzen ausgehend von der Histidin-Triade der Proteine aneinandergereiht. Übereinstimmungen in den Aminosäuren sind schwarz, Ähnlichkeiten grau markiert [Korsisaari et al., 2003].

### 1.1.3.2 DcpS

Das scavenger mRNA decapping enzyme DcpS wurde im Rahmen von Untersuchungen auf dem Gebiet des mRNA-Abbaus in Krebszellen entdeckt und gehört mit dem hDcpS2-Enzym zu den wichtigsten Proteinen beim RNA-Abbau in eukaryotischen Zellen [Wang und Kiledjian, 2001; Liu et al., 2002]. Die Pyrophosphatase DcpS hydrolysiert methylierte Cap-Strukturen auf mRNA-Molekülen [Liu et al., 2002] und ist vorwiegend im Zellkern lokalisiert [Liu SW et al., 2005]. Eine Gemeinsamkeit mit den anderen Vertretern der HIT-

Familie findet sich in der Eigenschaft von DcpS, Homodimere über den Hint1-homologen C-terminalen Bereich auszubilden, wohingegen der N-Terminus für die RNA-bindenden Eigenschaften verantwortlich ist [Liu et al., 2002]. Die Tatsache, dass das mittlere Histidin der C-terminalen HIT-Domäne unentbehrlich für die enzymatische Aktivität von DcpS ist [Han et al., 2005], steht im Einklang mit den Untersuchungen an den bisher beschriebenen HIT-Proteinen.

### **1.1.3.3 Aprataxin**

Wie DcpS ist auch Aprataxin ein ubiquitäres, nukleäres HIT-Protein mit definierten biologischen Eigenschaften [Gueven et al., 2004]. Mutationen im Aprataxin-Gen führen zu einer neurodegenerativen Erkrankung, die Ataxia-ocular apraxia 1 (AOA1) genannt wird und besonders häufig in Europa und Japan auftritt [Date et al., 2001; Moreira et al., 2001]. Aprataxin besitzt eine Hint1-homologe Histidin-Triaden-Domäne, weshalb es zu dieser Gruppe der Hint-Proteine gezählt wird [Brenner, 2002]. Nach eingehender Charakterisierung wurde herausgefunden, dass das Protein sowohl AMA als auch Ap<sub>4</sub>A hydrolisieren kann. Mit dem Krankheitsbild der AOA1 einhergehende Mutationen führen zu Proteinen mit eingeschränkter enzymatischer Aktivität [Seidle et al., 2005; Kijas et al., 2006]. Neben der Hint-Domäne und dem nukleären Lokalisationssignal (NLS) besitzt Aprataxin zwei weitere funktionelle Strukturelemente, eine N-terminale FHA- (forkhead-associated) oder PANT (PNKP-aprataxin amino-terminal domain)-Domäne und ein Zinkfinger-Motiv [Moreira et al., 2001]. Proteine mit FHA- und PNKP (Polynukleotidkinase-3'-Phosphatase)-Domänen werden zu den Komponenten des DNA-Reparatur-Apparates gezählt [Seidle et al., 2005]. Mit Zinkfinger-bildenden Aminosäuren wird es einem Protein ermöglicht, DNA zu binden. Mehrere Veröffentlichungen weisen bis dato daraufhin, dass Aprataxin dem DNA-Reparatursystem angehört, das an der Behebung von durch genotoxischen Stress induzierten DNA-Strangbrüchen beteiligt ist [Clements et al., 2004; Date et al., 2004; Mosesso et al., 2005]. Somit ist auch dieses Hint-Familien-Protein ein wichtiges Molekül in der eukaryotischen Zelle, dessen Mutation zu pathogenen Phänotypen führt. Seine Zuordnung zum Hint-Zweig der HIT-Proteinfamilie wird jedoch aufgrund jüngster Daten in Frage gestellt. Es wird aufgrund von Sequenz- und Eigenschaftsvergleichen die Bildung einer separaten Aprataxin- und einer zusätzlichen DcpS-Subgruppe vorgeschlagen [Kijas et al., 2006].

#### 1.1.4 Fhit-Proteine

Die Abkürzung Fhit, die für „fragile histidine triad“ steht, leitet sich von der Entdeckung des Fhit-Gens im FRA3B-Bereich des dritten Chromosoms [Ohta et al., 1996], einer der instabilsten und am häufigsten von Chromosomenumlagerungen und -brüchen betroffenen Regionen des menschlichen Genoms ab [Huebner et al., 1998]. Die Fhit-Subgruppierung vereint die evolutionär hochkonservierten homologen Proteine, denen die Fähigkeit der Adenosin-oligophosphat-Hydrolyse, insbesondere  $Ap_3A$  und  $Ap_4A$ , gemeinsam ist [Brenner, 2002; Lima et al., 1997].

Ihre Vertreter finden sich z.B. bei Pflanzen [Sato et al., 2000], in *S. cerevisiae* [Chen et al., 1998] und in Invertebraten wie *D. melanogaster* und *C. elegans* [Pekarsky et al., 1998]. Der erste Vertreter dieser Gruppe wurde 1993 mit Aph1 aus *Schizosaccharomyces pombe* isoliert, der als  $Ap_4A$ -Hydrolase charakterisiert wurde [Huang et al., 1995; Robinson et al., 1993]. Vor wenigen Jahren jedoch rückte das humane, zu Aph1 homologe Protein Fhit in den Mittelpunkt des Interesses. Es wurde gezeigt, dass der Verlust der Fhit-Expression zu den frühesten und häufigsten Veränderungen in Tumoren epithelialer Gewebe zählt [Ohta et al., 1996; Sozzi et al., 1996]. Derartige Beobachtungen bestätigten sich bei Untersuchungen mit Magen-, Lungen- und Nieren-Tumorzelllinien [Huebner et Croce, 2003]. Dies führte dazu, dass Fhit eine Tumorsuppressorfunktion zugeordnet wurde. Eine Bestätigung hierfür erbrachten verschiedene Versuche, in denen Fhit durch adenovirale Re-expression in Fhit-negativen Zellen wiederhergestellt wurde. Die Ausbildung von Ösophaguskarzinomen [Ishii et al., 2001], Lungen- und Zervixtumoren [Roz et al., 2002] und Brustkrebs [Sevignani et al., 2003] konnte reduziert oder unterdrückt werden. Weitere Einblicke in die Funktion von Fhit lieferten Untersuchungen an Fhit-Knockout-Mäusen. Fhit<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickeln sich normal, jedoch zeigen Fhit<sup>+/-</sup>- und Fhit<sup>-/-</sup>-Mäuse nach der Behandlung mit dem chemischen Kanzerogen NMBA deutlich erhöhte Tumorbildung im Vergleich zu WT-Tieren [Huebner et Croce, 2001; Ishii et al., 2001]. Darüber hinaus zeigten Fhit<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse eine erhöhte spontane Tumorbildung und eine erhöhte Sensitivität gegenüber NMBA [Zanesi et al., 2001] als Tiere, bei denen nur ein Allel inaktiviert wurde. Seit 1997 werden durch Rauchen verursachte Lungentumore in Zusammenhang mit der fehlenden Tumorsuppressor-Wirkung von Fhit gebracht [Sozzi et al., 1997]. Die neuesten Untersuchungen auf diesem Gebiet deuten daraufhin, dass Nicotin eine Methylierung des Promoters des Fhit-Gens induziert [Soma et al., 2006].

Umso erstaunlicher ist es, dass die enzymatische Aktivität von Fhit keinen Einfluss auf seine tumorsuppressive Wirkung hat. Eine mutierte Form des Enzyms, bei dem das mittlere Histidin der Histidin-Triade ausgetauscht wurde, war nicht mehr in der Lage Ap<sub>3</sub>A oder Ap<sub>4</sub>A zu hydrolisieren, behielt allerdings seine Tumor-unterdrückenden Eigenschaften bei [Siprashvili et al., 1997]. Da diese Ergebnisse im Zusammenhang mit den vermuteten physiologischen Funktionen der Diadenosinpolyphosphate wenig plausibel erscheint (s.o), wurde die Theorie entwickelt, dass ein Fhit-Ap<sub>n</sub>A-Komplexe signalaktive Funktionen haben könnten [Brenner et al., 1999].

### 1.1.5 Die GalT-Proteine

Diese Gruppe der HIT-Proteine umfasst Enzyme mit struktureller Homologie zur ubiquitären Galactose-1-phosphat-uridyl-Transferase (GalT). Darüber hinaus werden die Diadenosin-Tri-/Tetraphosphat-Phosphorylasen Apa1 und Apa2 aus *S. cerevisiae* [Huebner et al., 1998] und die ADP-Sulfurylase aus *T. denitrificans* der GalT-Proteinfamilie zugeordnet [Bruser et al., 2000]. Obwohl diese Proteine eine Sequenzabweichung in ihrer Histidin-Triade aufweisen - an der Stelle des dritten Histidins befindet sich ein Glutamin - werden sie aufgrund ihrer hohen strukturellen Ähnlichkeit zu Hint1 und Fhit in die HIT-Superfamilie eingeordnet [Huebner et al., 1998; Brenner, 2002]. Apa1 und Apa2 ermöglichen es den Hefen, Dipurin-oligophosphatverbindungen wie Ap<sub>3</sub>A und Ap<sub>4</sub>A abzubauen, oder umgekehrt diese durch den Transfer von ADP oder AMP auf ATP zu synthetisieren [Plateau et al., 1990]. Es wird vermutet, dass dies im Zusammenhang mit der zellulären Reaktion auf oxidativen Stress steht [Bochner et al., 1984]. Über die ADP-Sulfurylase ist bekannt, dass sie Adenosin-5'-phosphosulfat (AMP-SO<sub>4</sub>) hydrolisieren kann [Brenner, 2002]. Dies stellt einen wichtigen Schritt zur Verwertung von an Schwefel gebundenen Sauerstoff in Bakterien dar [Bruser et al., 2000]. Am besten beschrieben ist allerdings die humane UMP-Transferase GalT. Durch die Katalyse des zweiten Schrittes des Leloir-Weges, bei dem die Uridin-5'-monophosphatgruppe einer UDP-Glucose auf die Phosphatgruppe von Galactose-1-Phosphat übertragen wird [Wedekind et al., 1995], ist GalT essentiell für die Galactose-Verwertung in Organismen [Frey, 1996]. Beim Menschen führt das Fehlen von GalT zu Galactosämie. Betroffene Patienten müssen sich an strenge Diäten halten und sind potentiellen Langzeitkomplikationen wie Leberfunktionsstörungen, Ödemen und Erblindung ausgesetzt [Elsas und Lai, 1998].

## 1.2 Der Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg stellt eine in der Evolution hochkonservierte Signaltransduktionskaskade dar, die ursprünglich in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben wurde [Riggelman et al., 1990; Siegfried et al., 1994]. Die Glykoproteine der Wnt-Familie, von denen zur Zeit 23 Vertreter bekannt sind, werden von Rezeptoren der Frizzled-Proteinfamilie gebunden und das Signal durch einen bis heute noch nicht vollständig verstandenen Transduktionsprozess ins Zellinnere übertragen (zur weiteren Information siehe: <http://www.stanford.edu/rnusse/wntwindow.html>). Mittlerweile ist allerdings beschrieben, dass sich der Signalweg in der Zelle in verschiedene Signalkaskaden aufspaltet, die zur Regulation von unterschiedlichen zellulären Funktionen führen [Huelsenken and Birchmeier, 2001]. Zum einen führt der planare Zellpolaritäts-Signalweg über die Aktivierung der Jun-N-terminalen Kinase (JNK) zu einer asymmetrischen Organisation des Zytoskeletts sowie zu einer polarisierten Morphologie von Zellen in epithelialen Zellverbänden [Djiane et al., 2000; Heisenberg et al., 2000; Mlodzik, 2000]. Zum anderen aktiviert der Wnt/Ca<sup>2+</sup>-Weg über noch nicht vollständig aufgeklärte G-Protein-vermittelte Prozesse die Phospholipase C (PLC), wodurch es zur intrazellulären Ausschüttung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen und zur Induktion von Calcium-sensitiven Enzymen kommt [Kühl et al., 2000]. Darüber hinaus konnte in neuroepithelialen Zellen gezeigt werden, dass Wnt-Signale die Symmetrie der Zellteilung und die Orientierung des Spindelapparates beeinflussen, dabei scheint das Mikrotubuli-bindende Protein EB1 eine wichtige Rolle zu spielen [Bienz, 2001; Lu et al., 2001]. Der kanonische Wnt-Signalweg konnte bislang als einziger der vier beschriebenen Signalkaskaden in direkten Zusammenhang mit Wnt-vermittelter Transkriptionsregulation gebracht werden. Das Wnt-Signal wird auf das Phosphoprotein Dishevelled (Dsh) übertragen, welches die Inhibition des  $\beta$ -Catenin-Degradationskomplexes vermittelt, der für den intrazellulären Abbau des Proteins  $\beta$ -Catenin verantwortlich ist. Infolgedessen kann  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma akkumulieren und in den Zellkern translozieren, wo es durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der LEF-1/TCF-Familie die Transkription von Wnt-Zielgenen aktiviert [Behrens et al., 1996; Huber et al., 1996; Brannon et al., 1997; Hsu et al., 1998; Riese et al., 1997]. Zu diesen Zielgenen gehören u. a. das Protoonkogen c-Myc [He et al., 1998] und das Zellzyklus-Regulatorprotein Cyclin D1 [Tetsu et McCormick, 1999].

Die Bedeutung von Wnt-Signalen wird erkennbar, wenn man deren Involvierung in biologische Entwicklungsprozesse betrachtet, die während der Embryonalentwicklung über die Beeinflussung der Differenzierung, Proliferation und Morphogenese von Zellen bis hin zur Regulation der Zellmotilität sowie des programmierten Zelltods (Apoptose) reicht [Wodarz et Nusse, 1998]. Im Hinblick auf die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente kann die Tatsache nicht unerwähnt bleiben, dass eine Vielzahl von Mutationen in den Komponenten des Wnt-Signalwegs zu dessen unkontrollierter Aktivierung und damit zur Entstehung von Tumoren führen [Polakis, 2000]. Die pathogene Aktivierung von  $\beta$ -Catenin wurde in hepatozellulären Karzinomen, in Hepatoblastomen und in gastrischen Tumoren nachgewiesen [Behrens and Lustig, 2004]. Andere Mutationen in Proteinen des Wnt-Signalweges wurden bei gastrointestinalen Adenomen und Prostatakrebs-Erkrankungen gezeigt [Behrens and Lustig, 2004].

### 1.2.1 $\beta$ -Catenin

$\beta$ -Catenin wurde zunächst als Interaktionspartner des in den Adherens Junctions lokalisierten Moleküls E-Cadherin identifiziert [Ozawa et al., 1989]. E-Cadherin gehört zur Familie der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Zell-Zell-Adhäsionsproteine, den Cadherinen [Takeichi, 1995]. Die extrazellulären Domänen von Cadherinen binden an die Cadherine auf der Oberfläche von benachbarten Zellen. So wird die Zell-Zell-Erkennung und die räumliche Organisation von Zellen in Geweben sichergestellt [Gumbiner, 2000; Foty and Steinberg, 2005]. Die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin bindet an  $\beta$ -Catenin, das seinerseits an  $\alpha$ -Catenin bindet [Aberle et al., 1994; Hinck et al., 1994; Pokutta and Weis, 2000; Huber and Weis, 2001]. Mehrere Studien zeigten zwar eine Bindung von  $\alpha$ -Catenin an das Aktin-Zytoskelett, diese indirekte Verknüpfung von E-Cadherin mit dem Aktin-Zytoskelett wird allerdings in einer neueren Veröffentlichung angezweifelt [Yamada et al., 2005]. So kontrolliert  $\beta$ -Catenin als elementare Komponente des Cadherin-Catenin Zell-Zell-Adhäsionskomplexes nicht nur die strukturelle Organisation von Zellen in Geweben, sondern beeinflusst auch die Zellmigration [Nelson et Nusse, 2004]. Zerfällt der Adhäsionskomplex, z.B. durch Mutationen im E-Cadherin-Molekül, resultiert dies in einem nicht adhäsiven, hoch invasivem Phänotyp der betroffenen Zellen [Oyama et al., 1994]. Damit wird  $\beta$ -Catenin im Rahmen seiner adhäsiven Funktion im Cadherin-Catenin

Komplex eine tumorsuppressive Rolle zugeschrieben. Abgesehen von seiner Präsenz im Adhäsionskomplex ist  $\beta$ -Catenin nur in sehr geringen Konzentrationen in der Zelle vorhanden, da es durch den  $\beta$ -Catenin-Degradationskomplex phosphoryliert und schließlich in den Ubiquitin-Proteasomen-Abbauweg eingeleitet wird. Dieser Multiproteinkomplex besteht aus Axin, dem Tumorsuppressor APC (Adenomatous Polyposis Coli), der Serin/Threonin-Kinase GSK-3 $\beta$  und der Casein Kinase 1 $\alpha$  [Behrens et al., 1998; Ikeda et al., 1998]. Eine Bindung von Wnt-Proteinen an den Frizzled-LRP-Rezeptorkomplex führt allerdings zur Inhibierung des  $\beta$ -Catenin-Degradationskomplexes und zur Akkumulation von stabilisiertem  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma [Behrens and Lustig, 2004].

$\beta$ -Catenin ist ein aus 781 Aminosäuren aufgebautes Protein. Seine primäre Struktur lässt sich in drei Domänen einteilen: Die C- und N-terminalen Transaktivierungsbereiche und die zentrale Armadillo-Repeatregion (Abb. 1.6). Im N-terminalen Bereich liegen die für die Stabilität entscheidenden CK1- und GSK3 $\beta$ -Phosphorylierungsstellen, an denen  $\beta$ -Catenin für die Erkennung und den Abbau durch das Ubiquitin-Proteasomen System markiert wird [Aberle et al., 1997; Yost et al., 1996]. Zudem wurde die Bindungsstelle für  $\alpha$ -Catenin in dieser Region lokalisiert [McCrea and Gumbiner, 1991; Ozawa and Kemler, 1992]. Die zentrale Domäne definiert das Protein als Mitglied der Familie der Armadillo-Repeat-Proteine, dem auch das zu  $\beta$ -Catenin homologe Protein Armadillo aus *Drosophila melanogaster* gehört. Die Armadillo-Repeats bilden das Interaktionsinterface für verschiedene Proteine wie E-Cadherin, APC und LEF-1/TCF [Behrens et al., 1996; Graham et al., 2000; Huber et al., 1997; Huber and Weis, 2001; Rubinfeld et al., 1997; von Kries et al., 2000]. Die C-terminale Domäne enthält die für die transkriptionsfördernde Funktion von  $\beta$ -Catenin wichtigen Transkriptionsaktivierungsdomänen [Hecht et al., 1999; Hsu et al., 1998; Vleminckx et al., 1999]. Durch die Bindung an das TATA-Box Bindeprotein TBP kann sie den Kontakt zur generellen Transkriptionsmaschinerie herstellen [Hecht et al., 1999].



### **1.2.3 Die Wnt-Antagonisten Pontin52 und Reptin 52**

Die nukleären Proteine Pontin52 (Synonyme Tip49a, RuvB1) und Reptin52 (Repressing Pontin52, Synonyme Tip 49b, RuvB12) sind zueinander stark homologe Proteine, die eine Ähnlichkeit zur bakteriellen RuvB DNA-Helikase aufweisen [Bauer et al., 2000]. Ihre Sequenzen weisen charakteristische, als Walker A- und B-Sequenzmotive bezeichnete ATP/GTP-Bindungsstellen auf [Kanemaki et al., 1999]. Die antagonistische Beeinflussung der  $\beta$ -Catenin-TCF-Transkriptionsaktivität wurde in Reporteranalysen nachgewiesen, sie steht im Zusammenhang mit der Interaktion von Pontin und Reptin mit  $\beta$ -Catenin [Bauer et al., 1998, 2000]. Später konnte gezeigt werden, dass Pontin52 mit Chromatin-Remodeling und Histon-modifizierenden Faktoren wie dem Tip60-Histonacetylase Chromatin-Remodeling-Komplex [Ikura et al., 2000; Kim et al., 2005] und den Histon-modifizierenden Faktoren TRRAP und BAF53 interagiert [Park et al., 2003]. Es existieren Hinweise darauf, dass Pontin durch die Regulierung von  $\beta$ -Catenin und den Einfluss auf den Chromatin-Remodeling-Komplex an der Tumorgenese beteiligt ist [Feng et al., 2003]. Diese Erkenntnisse werden auch durch die Entdeckung untermauert, dass Pontin in die onkogene Transformation des Transkriptionsfaktors c-Myc involviert ist [Wood et al., 2000; Dugan et al., 2002]. Weiterhin wurden Pontin52 und Reptin52 durch Untersuchung der Mutation „Liebeskummer“ (lik) in Zebrafisch als antagonistische Regulatoren der Proliferation von Cardiomyocyten beschrieben [Rottbauer et al., 2002].

### **1.2.4 Hint1 als Inhibitor der LEF-1/TCF- $\beta$ -Catenin-vermittelten Transkriptionsaktivität**

Das im Kapitel 1.1.1 beschriebene HIT-Protein Hint1 ist in der Lage, die Funktion von Pontin52 und Reptin52 zu modulieren [Weiske and Huber, 2005]. Der N-terminale Bereich von Hint1 bindet an die zentralen Aminosäuren zwischen den Walker A- und B-Motiven der beiden Helikasen und unterbricht so deren heteromere Komplexe [Weiske and Huber, 2005]. In Reporteranalysen konnte gezeigt werden, dass Hint1 über die Interaktion mit Pontin und Reptin die LEF-1/TCF- $\beta$ -Catenin-vermittelte Transkriptionsaktivität in Wnt-stimulierten Zellen inhibiert. Obwohl der detaillierte molekulare Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist, geben diese Untersuchungen die ersten Hinweise auf die der

Tumorsuppressorfunktion des Histidin-Triaden-Proteins Hint1 zugrunde liegenden molekularen Mechanismen.

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Literatur beschreibt Hint1 als AMP-NH<sub>2</sub>- und AMP-Lysin-Hydrolase, die als Homodimer vorliegt und deren Histidin-Rest 112 für die enzymatische Aktivität unentbehrlich ist. Die bisher veröffentlichten Ergebnisse schreiben dem Protein einerseits eine transkriptionsregulierende Funktion z.B. im Rahmen der MITF-Modulierung oder der Beeinflussung der Wnt-Signaltransduktion zu, zudem wurde es als Tumorsuppressor in Mäusen charakterisiert.

Die Funktion des Hint1 verwandten Proteins Hint2 war bislang unbekannt, eine nähere Charakterisierung in Hinblick auf die Homologie des Proteins zu Hint1 und Hint3 und eine potenzielle Beeinflussung des Wnt-Signalweges analog zu Hint1 liegt in der Literatur bis heute nicht vor. Es war das Ziel dieser Arbeit, eine funktionelle und strukturelle Charakterisierung von Hint2 durchzuführen, wobei speziell folgende Fragestellungen untersucht werden sollten:

- Bildet Hint2 analog zu Hint1 ein Homodimer? Welche Aminosäuren sind an dieser Interaktion beteiligt?
- Ist Hint2 aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit zu den Proteinen Hint1 und Hint3 in der Lage, Heterodimere auszubilden? Können diese wie das Homodimer charakterisiert werden?
- Sind ähnliche Interaktionen zwischen Hint1 und Hint3 beobachtbar?
- Zeigt Hint2 ebenfalls eine Nukleotidhydrolase-Aktivität? Welche Substrate kann Hint2 umsetzen? Welche Rolle spielt dabei die Histidin-Triade?
- Wo ist Hint2 in der Zelle lokalisiert?
- Interagiert Hint2 ebenfalls mit Proteinen des Wnt-Signalweges? Übt es analog zu Hint1 eine transkriptionsregulierende Wirkung aus?