

4 Ergebnisse

4.1 Homodimerisierung von Hint2

Für die bisher genauer untersuchten HIT-Proteine Hint1 und Fhit wurde beschrieben, dass die enzymatisch aktiven Proteine als Homodimere vorliegen [Brenner, 2002]. Um zu untersuchen, ob Hint2 aufgrund seiner hohen Aminosäuresequenzhomologie zu Hint1 ebenfalls in der Lage ist Homodimere auszubilden, wurde die cDNA von humanem Hint2 in prokaryotische und eukaryotische Expressionsvektoren kloniert. Mit den in *E. coli* rekombinant exprimierten Hint2-Fusionsproteinen wurden Pull-down-Experimente durchgeführt.

4.1.1 Pull-down-Experimente zum Nachweis des Homodimers

Für die *in vitro*-Assoziationsassays (Pull-down) wurden vergleichbare Mengen von GST- und MBP-Hint2-Proteinen miteinander inkubiert, sich ausbildende Proteinkomplexe über GSH-Agarose-Beads isoliert und anschließend einer Western Blot-Analyse unterzogen. Wie in Abb. 4.1 erkennbar, war es möglich, GST-Hint2 und MBP-Hint2 zusammen aus dem Reaktionsansatz zu isolieren. So konnten die ersten Hinweise darauf gefunden werden, dass die Hint2-Proteine in der Lage sind homodimere Komplexe auszubilden.

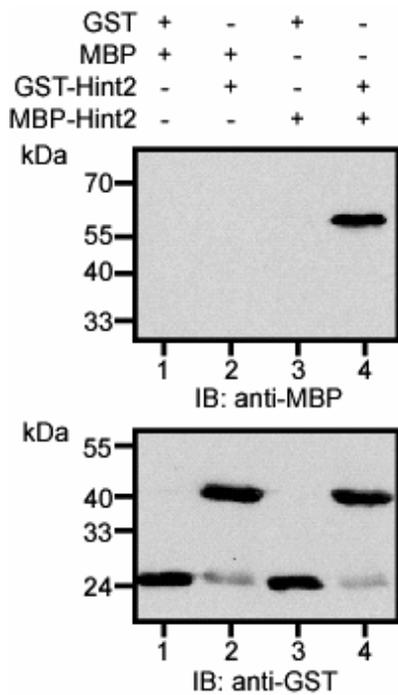


Abb. 4.1: Homodimerisierung von rekombinanten Hint2-Proteinen. Repräsentativer Pull-down-Assay von 5 unabhängigen Versuchen mit rekombinantem GST- und MBP-Hint2, GST und MBP (jeweils 4 µg). Die Western Blot-Analyse erfolgte mit anti-MBP (0,25 µg/ml)- und anti-GST (0,5 µg/ml)-Antikörper. GST-Hint2 interagiert spezifisch mit MBP-Hint2 (Spur 4). GST bindet weder MBP noch MBP-Hint2 (Spuren 1 und 3), MBP interagiert nicht mit GST-Hint2 (Spur 2). Der unten dargestellte Western Blot zeigt die über GSH-Agarose-Beads isolierten GST-Proteine.

4.1.2 Nachweis von homodimeren Hint2-Proteinkomplexen in HEK293-Zellen

Zur Untersuchung der Homodimerisierung von Hint2 in Zellen wurden 10^6 HEK293-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die eine Überexpression von FLAG- und myc₆-getaggtem Hint2 bewirkten. Nach 48 h folgte die Lyse der HEK293-Zellen und es wurden Immunpräzipitationen mit 100 µg Protein entweder mit anti-FLAG- oder anti-myc₆-Antikörper durchgeführt. Die an die Antikörper gebundenen Proteinkomplexe wurden mit Protein A-Sepharose sedimentiert, mit SDS-Probenpuffer eluiert und elektrophoretisch aufgetrennt. In der Western Blot-Analyse wurde für die Immundetektion jeweils der nicht zur Immunpräzipitation herangezogene Antikörper benutzt. Es zeigte sich, dass Hint2 in HEK293-Zellen als Homodimer vorliegt (Abb. 4.2 A), da in den mit FLAG-Hint2 und myc₆-Hint2 co-transfizierten Zellen FLAG-Hint2 an myc₆-getaggttes Hint2 bindet. Umgekehrt konnte bei der Immunpräzipitation von myc₆-Hint2 aus dem Lysat der HEK293-Zellen FLAG-getaggttes Hint2 als Interaktionspartner co-präzipitiert werden. Die nach der Lyse der HEK293-Zellen durchgeführten Kontrollen bestätigten die erfolgreiche Transfektion mit FLAG-Hint2 und myc₆-Hint2 und zeigten, dass vergleichbare Proteinmengen für die Immunpräzipitationsexperimente eingesetzt wurden (Abb. 4.2 B).

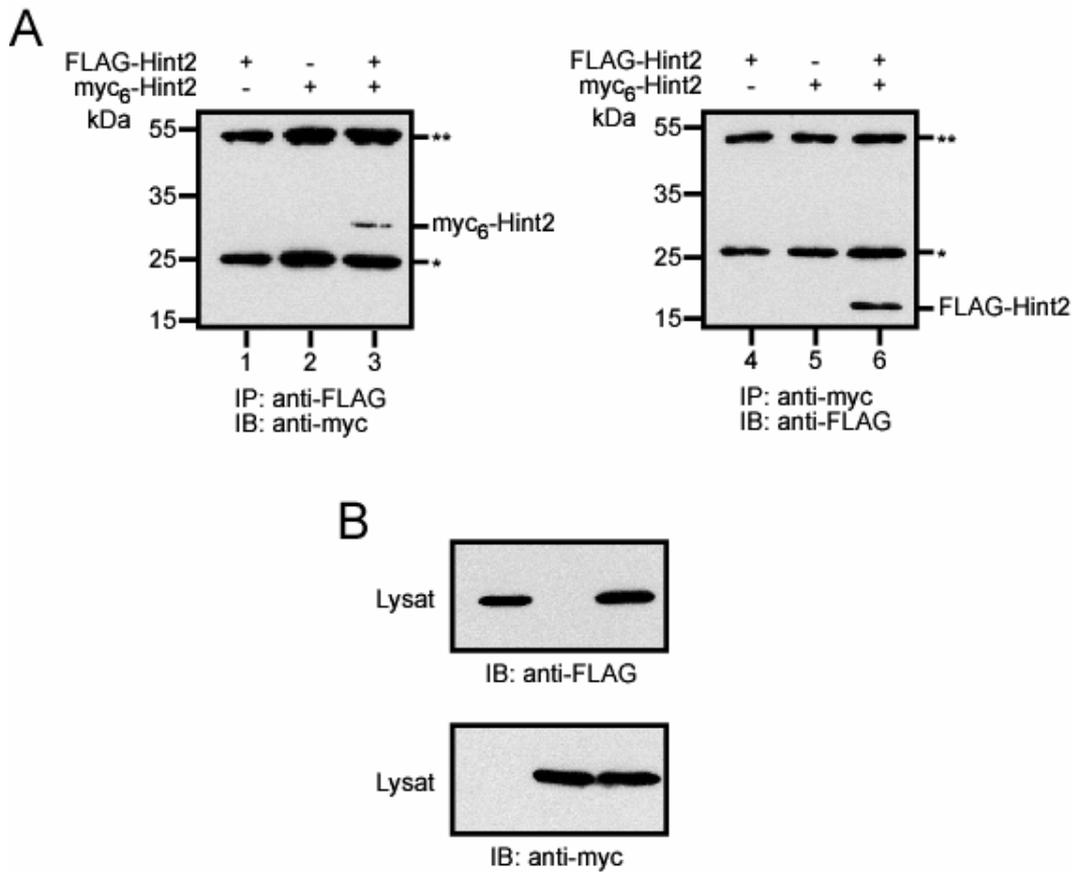


Abb. 4.2: Nachweis der Homodimerisierung von Hint2 in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden transient mit myc₆-Hint2 und FLAG-Hint2 transfiziert (jeweils 2 µg Plasmid-DNA) und vorliegende Proteinkomplexe über anti-FLAG-M2- (jeweils 2 µg) oder anti-myc-Antikörper (Klon 9E10, jeweils 2 µg) präzipitiert. **A)** In den Präzipitaten der anti-FLAG-Antikörper konnte FLAG-Hint2 zusammen mit myc₆-Hint2 nachgewiesen werden (Spur 3). In den nur mit jeweils einem Konstrukt transfizierten Zellen ist myc₆-Hint2 nicht im Präzipitat nachweisbar (Spur 1 und 2). Bei der Präzipitation von myc₆-Hint2 mit anti-myc-Antikörper war umgekehrt FLAG-Hint2 detektierbar (Spur 6). Die Kontrollinkubationen der einfach transfizierten Zellen zeigten kein FLAG-Hint2 (Spur 4 und 5). **B)** Transfektionskontrolle der Lysate. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Versuch von 5 unabhängigen Experimenten.
* schwere und **leichte Kette des präzipitierenden Antikörpers

4.2 Hint2 bildet Heterodimere mit Hint1 und Hint3

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben konnte nachgewiesen werden, dass Hint2 wie Hint1 ein Homodimer ausbildet. Die hohe Homologie der humanen Hint-Proteine Hint1, Hint2 und Hint3 legte die Überlegung nahe, dass die Struktur der Proteine auch die Ausbildung von Heterodimeren zulassen könnte. Deshalb sollte nun mit rekombinanten Proteinen untersucht werden, ob sich in Assoziations-Experimenten heterodimere Hint-Proteinkomplexe ausbilden.

4.2.1 Heterodimerisierung von Hint2 mit den Hint-Proteinen 1 und 3 in Pull-down-Experimenten

Die zur Verfügung gestellten Hint1- und Hint3-Plasmide wurden verwendet, um MBP-fusionierte Varianten der Proteine zu exprimieren und identische Mengen der jeweiligen Proteine mit GST-Hint2 zu inkubieren. Nach dem Pull-down der Proteinkomplexe erfolgte erst die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE, dann der Transfer auf PVDF-Membranen und letztendlich die Immundetektion mit anti-MBP- und anti-GST-Antikörpern. Die *in vitro*-Assoziations-Experimente zeigten, dass Hint2 sowohl mit Hint1 als auch mit Hint3 heterodimere Komplexe auszubilden vermag (Abb. 4.3). Wurde GST-Hint2 mit MBP-Hint1 inkubiert, konnten aus dem Reaktionsansatz heterodimere Komplexe der beiden Proteine isoliert werden. Ebenso wurde eine spezifische Assoziation von GST-Hint2 an MBP-Hint3 nachgewiesen.

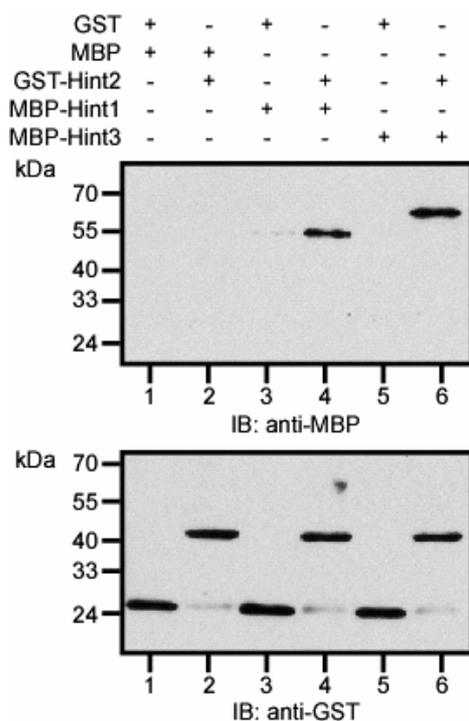


Abb. 4.3: Assoziationsassay zum Nachweis der Heterodimerisierung von Hint2 mit Hint1 und Hint3. Je 4 µg GST-Hint2 sowie MBP-Hint1 und MBP-Hint3 wurden miteinander inkubiert und sich ausbildende Proteinkomplexe über GSH-Agarose Beads isoliert. Bei der Western Blot-Analyse wurde die Immundetektion mit anti-MBP (0,25 µg/ml)- und anti-GST (0,5 µg/ml)-Antikörpern durchgeführt. GST-Hint2 bindet an MBP-Hint1 (Spur 4) und MBP-Hint3 (Spur 6). Unspezifische Bindungen der MBP-Hint-Proteine an GST waren nicht nachweisbar (Spuren 3 und 5), die Kontrollen mit MBP und GST (Spur 1) als auch mit GST-Hint2 und MBP sind negativ (Spuren 1 und 2). Der untere Blot zeigt, dass gleiche Mengen GST und GST-Hint2 eingesetzt wurden. Die Abbildung zeigt ein Pull-down-Experiment von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

4.2.2 Nachweis der Hint2-Heterodimere mit Hint1 und Hint3 in HEK293-Zellen

Um die Ausbildung heterodimerer Hint2-Hint1- und Hint2-Hint3-Komplexe auch in Zellen nachzuweisen, wurden Co-Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden HEK293-Zellen in unterschiedlichen Kombinationen mit FLAG- und myc₆-getaggten Hint-Proteinen transient transfiziert und nach Lyse der Zellen vorliegende Proteinkomplexe über Tag-spezifische Antikörper präzipitiert. Bei der anschließenden Western Blot-Analyse zeigte sich, dass mit dem anti-FLAG-Antikörper FLAG-Hint1 zusammen mit myc₆-getaggten Hint2 gefällt werden konnte (Abb. 4.4 A). Umgekehrt war es möglich, bei der Immunpräzipitation mit anti-myc-Antikörper Proteinkomplexe aus myc₆-Hint2 und FLAG-Hint1 nachzuweisen. Das Vorliegen vergleichbarer Proteinmengen von FLAG-Hint1 und myc₆-Hint2 in den verschiedenen Zelllysaten wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft (Abb. 4.4 B). Der Versuch wurde zur Bestätigung des Ergebnisses fünfmal reproduziert.

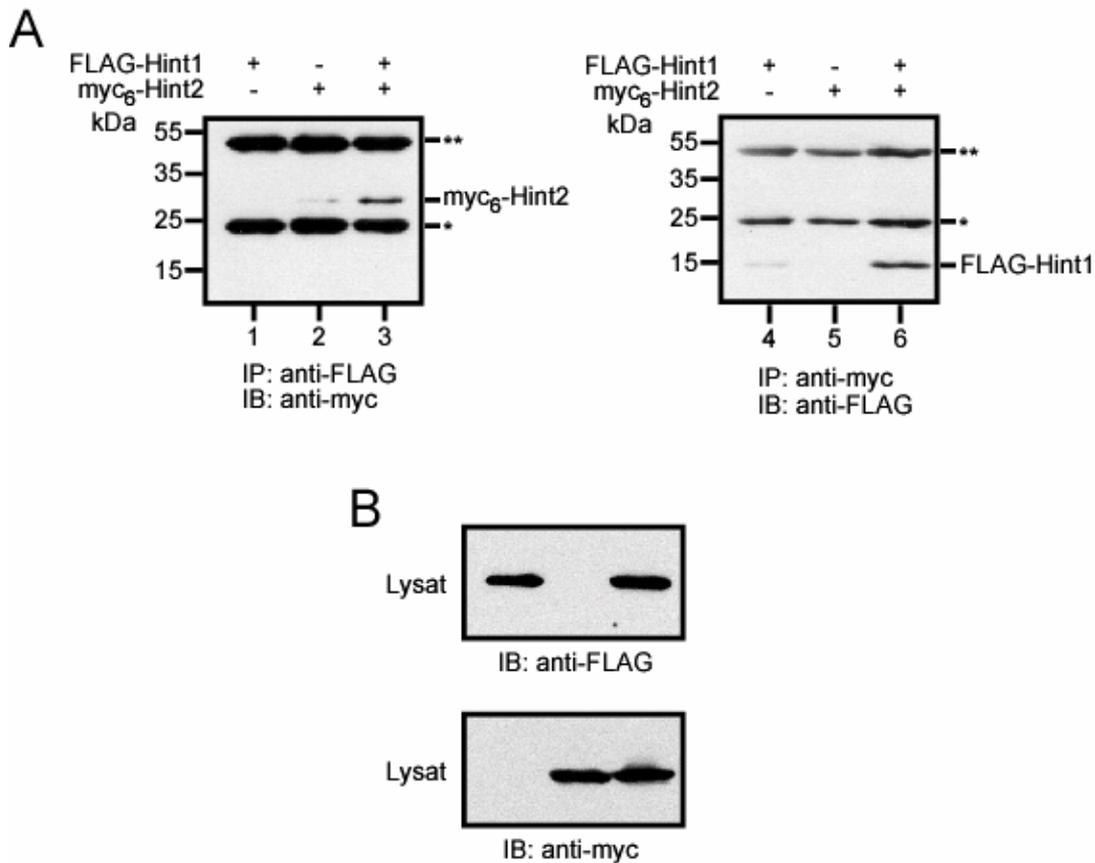


Abb. 4.4: Nachweis von heterodimeren Hint2-Hint1-Komplexen in HEK293-Zellen. Jeweils 2 µg pCS2+myc₆-Hint2 und pCMV4-FLAG-Hint1 wurden in HEK293-Zellen transfiziert und Co-Immunpräzitationen mit jeweils 2 µg anti-FLAG-M2- oder anti-myc-Antikörper (Klon 9E10) durchgeführt. **A)** Präzipitation mit anti-FLAG-Antikörper; FLAG-Hint1 konnte zusammen mit myc₆-Hint2 gefällt werden (Spur 3). Myc₆-Hint2 ist nicht im Präzipitat der nur mit FLAG-Hint1 transfizierten Zellen nachweisbar (Spur 1), im Lysat der myc₆-Hint2 überexprimierenden Zellen zeigte sich eine geringe unspezifische Bindung des rekombinanten Proteins an den anti-FLAG-Antikörper (Spur 2). Bei der Präzipitation mit anti-myc-Antikörper lag umgekehrt FLAG-Hint1 assoziiert an myc₆-Hint2 vor (Spur 6). In den einfach transfizierten Zellen konnte bei den Kontrollinkubationen geringe Spuren von FLAG-Hint1 nachgewiesen werden (Spur 4), nicht aber myc₆-Hint2 (Spur 5). **B)** Transfektionskontrolle der Lysate.
* schwere und **leichte Kette des präzipitierenden Antikörpers

In vergleichbaren Ansätzen konnte das Vorliegen von heterodimeren Hint2/Hint3-Proteinkomplexen mittels Co-Immunpräzitation nachgewiesen werden (Abb. 4.5 A). So war es einerseits möglich, eine Assoziation von FLAG-Hint2 mit myc₆-getagtem Hint3 nachzuweisen und andererseits nach Präzipitation mit anti-myc-Antikörper heterodimere Proteinkomplexe aus myc₆-Hint3 und FLAG-Hint2 zu detektieren.

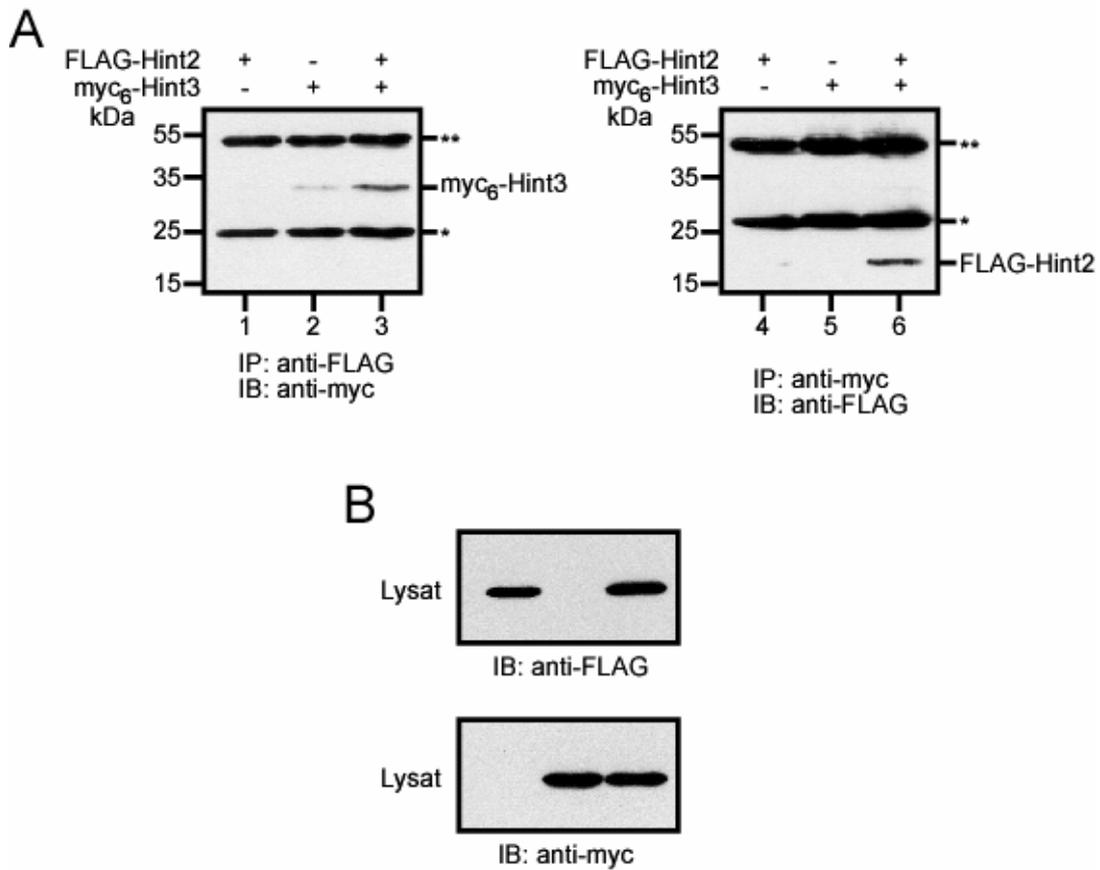


Abb. 4.5: Nachweis von Hint2/Hint3-Heterodimeren. HEK293-Zellen wurden in fünf unabhängigen Versuchen nach transienter Transfektion mit pCMV4-FLAG-Hint2 (2 µg) und pCS2+myc₆-Hint3 (2 µg) lysiert und heteromere Hint2/Hint3-Proteinkomplexe durch Immunpräzipitation isoliert. **A)** Bei der Immunpräzipitation mit anti-FLAG-Antikörper (2 µg) wurde myc₆-Hint3 detektiert (Spur 3). Die HEK293-Zellen, die zur Kontrolle nur mit FLAG-Hint2 oder myc₆-Hint3 transfiziert wurden, zeigen sehr geringe (Spur 2) oder keine (Spur 1) unspezifische Präzipitationen. Bei der Präzipitation mit anti-myc-Antikörper (2 µg) konnten Heterodimere aus Hint2 und Hint3 in den co-transfizierten Lysaten nachgewiesen werden (Spur 6), bei der Inkubation der einfach transfizierten Zelllysate mit anti-myc-Antikörper wurden keine unspezifischen Bindungen nachgewiesen (Spuren 4 und 5). **B)** Transfektionskontrolle der Lysate.
* schwere und **leichte Kette des präzipitierenden Antikörpers

4.3 Identifizierung der die Dimerisierung vermittelnden Bindungsstelle im Hint2-Protein

Da in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, dass Hint2 als Homodimer und als Heterodimer mit Hint1 oder Hint3 vorliegen kann, sollte nun geklärt werden, welcher Aminosäurebereich im Hint2-Protein für diese Interaktion verantwortlich sind. Die Struktur des Hint1-Homodimers ist durch Röntgenstrukturanalysen aufgeklärt worden. Dabei stellte sich heraus, dass die Homodimerisierung über C-terminale Aminosäuren vermittelt wird [Lima et al., 1996]. Um den entsprechenden Aminosäurebereich im Hint2-Molekül zu identifizieren, wurden MBP-getaggte Deletionskonstrukte hergestellt und mit GST-Hint2, GST-Hint1 und GST-Hint3 verschiedene Pull-down-Experimente durchgeführt (Abb. 4.6). Der N-Terminus von Hint2 wurde durch das Konstrukt MBP-Hint2 AS 1-54, der mittlere Teil des Proteins durch MBP-Hint2 AS 47-99 und der C-terminale Bereich durch ein MBP-Fusionsprotein mit den Aminosäuren 94-163 repräsentiert.

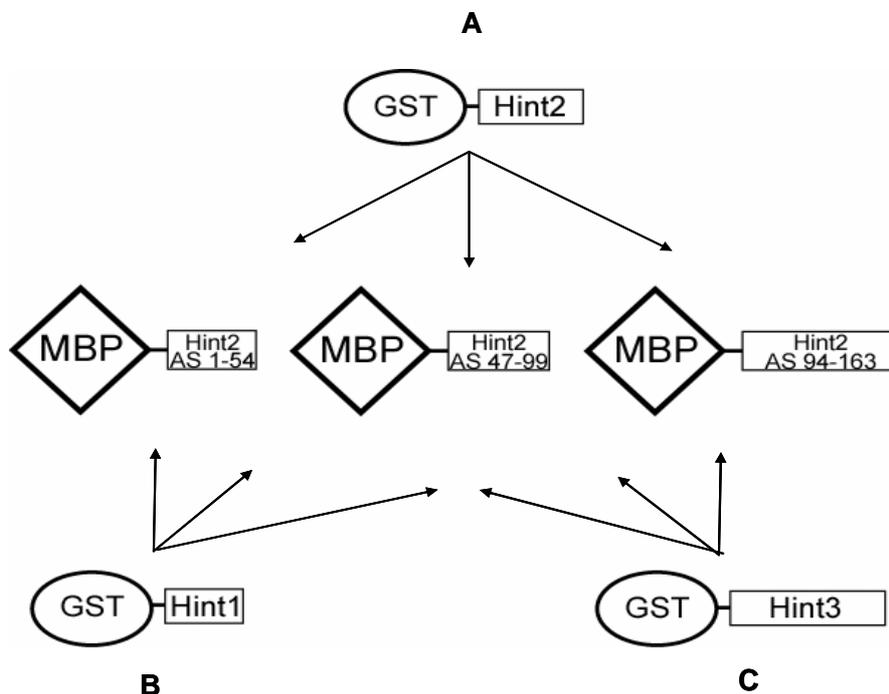


Abb. 4.6: Schematische Darstellung der für die Identifizierung der Bindungsstelle durchgeführten Pull-down-Experimente. Dazu wurden MBP-getaggte Deletionskonstrukte von Hint2 generiert, die die Aminosäuren 1-54, 47-99 und 94-163 umfassten. **A)** Zur Identifizierung der Bindungsstelle im Hint2-Homodimer sollte GST-Hint2 mit den Deletionskonstrukten analysiert werden. **B)** Vergleichbar dazu wurden GST-Hint1 und GST-Hint3 (**C)** mit den Hint2-Deletionskonstrukten zur Identifizierung der Dimerisierungsstelle im Hint2-Protein analysiert.

Zunächst wurde das Hint2-Homodimer untersucht, dabei stellte sich heraus, dass analog zu Hint1 der Proteinkomplex über die C-terminalen Aminosäuren der beiden dimerisierenden Hint2-Monomere ausgebildet wird (Abb. 4.7). GST-Hint2 interagiert ausschließlich mit dem MBP-getaggten Deletionskonstrukt, das die Aminosäuren 94-163 umfasste, als Positivkontrolle wurde parallel eine Inkubation mit MBP-Hint2 durchgeführt.

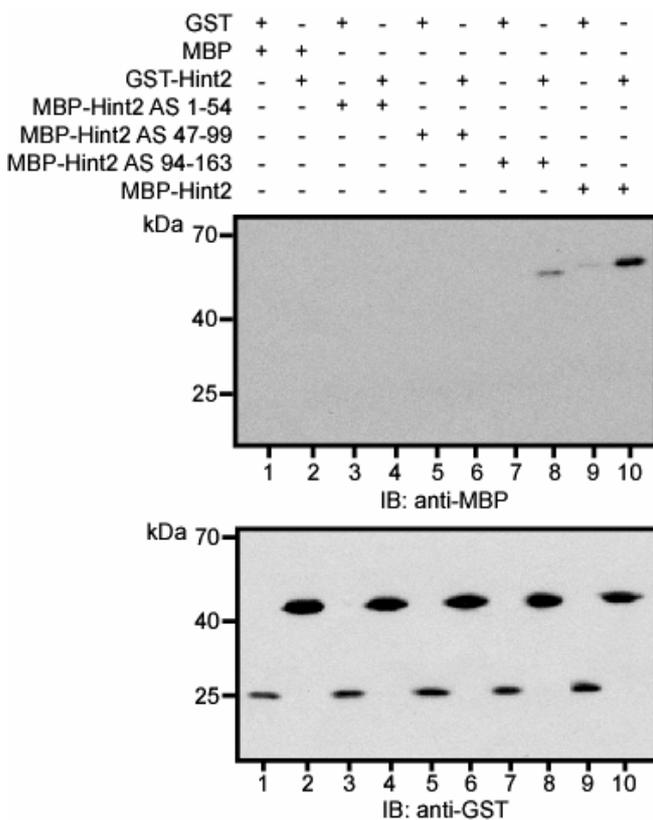


Abb. 4.7: Pull-down-Experiment zur Identifizierung der die Hint2-Homodimerisierung vermittelnden Aminosäurebereiche. Je 4 μg der MBP-Hint2 Deletionskonstrukte wurden mit Vollängen GST-Hint2 (4 μg) in Pull-down-Assay analysiert. Die Komplexbildung zwischen MBP-Hint2 (4 μg) und GST-Hint2 diente als Positivkontrolle (Spur 10). GST-Hint2 interagiert nur mit MBP-Hint2 AS 94-163 (Spur 8), aber nicht mit den anderen Konstrukten (Spuren 4, 5 und 6) oder MBP (Spur 2). Bei keinem der MBP-Fusionsproteine oder dem MBP-Protein war eine signifikante unspezifische Bindung an GST nachweisbar (Spuren 1, 3, 5, 7 und 9). Oberer Blot: Immundetektion mit anti-MBP-Antikörper (0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Unterer Blot: Rückfisch der GST-Proteine mit GSH-Agarose-Beads, detektiert mit anti-GST-Antikörper (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Das Experiment wurde dreimal reproduziert.

In vergleichbaren Experimenten wurden GST-Hint1 und GST-Hint3 mit den MBP-Hint2-Deletionskonstrukten in Pull-down Experimenten untersucht, um heraus zu finden, welcher Aminosäurebereich im Hint2-Protein für die Ausbildung der Heterodimere verantwortlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Hint1 als auch Hint3 nur mit den Hint2-Aminosäuren 94-163 interagieren (Abb. 4.8). Als Positivkontrolle diente einerseits der Pull-down von MBP-Hint2 mit GST-Hint1 (Abb. 4.8 A) und andererseits die Heterodimerisierung zwischen GST-Hint3 und MBP-Hint2 (Abb. 4.8 B).

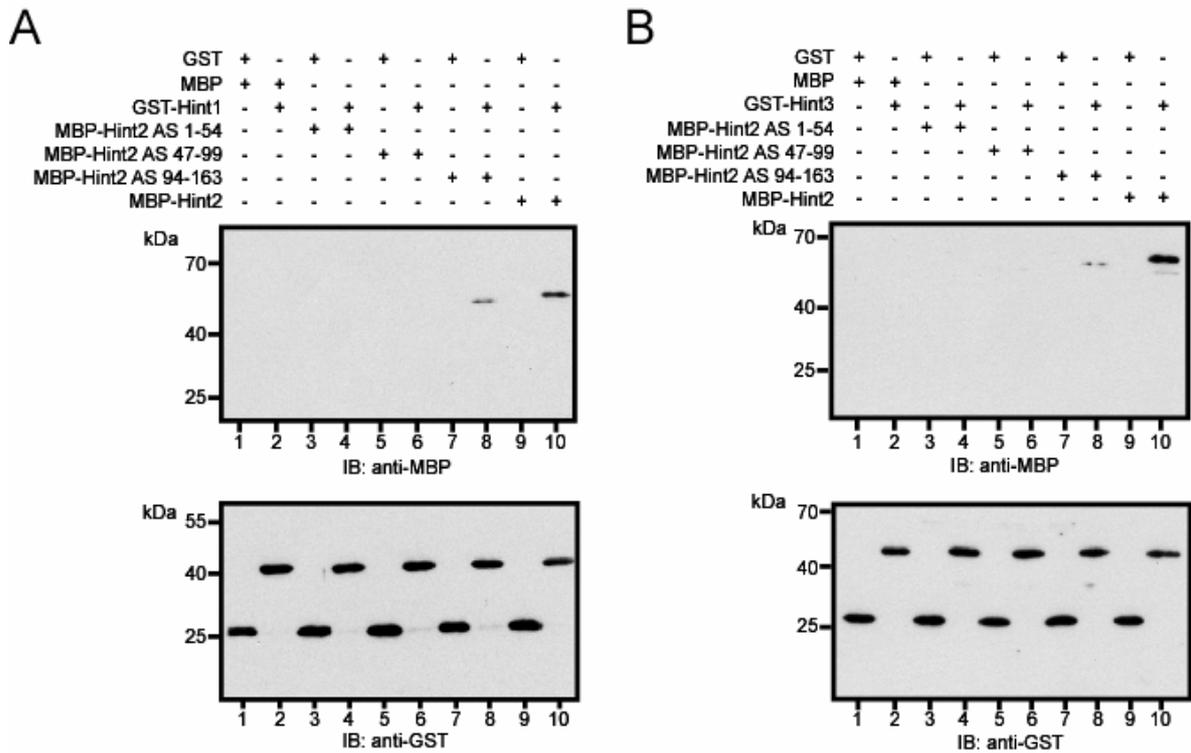


Abb. 4.8: Im C-terminalen Aminosäurebereich von Hint2 wird die Heterodimerisierung mit Hint1 und Hint3 vermittelt. In jeweils 3 unabhängig voneinander durchgeführten Pull-down-Tests wurden je 4 µg der GST- und der MBP-Proteine inkubiert. Western Blot-Analyse und Immundetektion mit 0,25 µg/ml anti-MBP-Antikörper (obere Blots), zur Kontrolle der rückgefischten GST-Proteinmengen erfolgte jeweils ein Western Blot mit 0,5 µg/ml anti-GST-Antikörper (untere Blots). **A)** Beim Pull-down von GST-Hint1 mit GSH-Agarose-Beads wird nur MBP-Hint2 AS 94-163 (Spur 8) und MBP-Hint2 (Spur 10) mitgefällt. In den Kontrollinkubationen sind keine Bindungen an die N-terminalen Deletionskonstrukte (Spuren 4 und 6) und keine unspezifischen Bindungen detektierbar (Spuren 1-3, 5, 7 und 9). **B)** GST-Hint3 assoziiert an die C-terminalen Aminosäuren 94-163 von Hint2 (Spur 8) und an Vollängen-Hint2 (Spur 10), nicht aber an die Hint2-Aminosäurebereiche 1-54 (Spur 4) oder 47-99 (Spur 6). Es konnten keine Interaktionen zwischen den MBP-getagten Proteinen und GST nachgewiesen werden (Spuren 3, 5, 7 und 9), GST und GST-Hint3 interagierten nicht mit MBP (Spuren 1 und 2).

4.4 Nachweis des Hint3-Homodimers und der Heterodimerisierung mit Hint1

4.4.1 Hint1 und Hint3 interagieren im Pull-down-Assoziationstest

Als nächstes wurde untersucht, ob auch Hint1 und Hint3 *in vitro* zu Komplexbildungen fähig sind und ob Hint3 unter diesen Bedingungen ein Homodimer ausbildet. Dazu wurde GST-Hint3 mit MBP-Hint3 oder MBP-Hint1 inkubiert und sich bildende Proteinkomplexe über GSH-Agarose-Beads isoliert. In diesen Experimenten konnte die Ausbildung eines Hint3-Homodimers gezeigt werden (Abb. 4.9). Zudem konnte eine Heterodimerisierung von GST-Hint3 mit MBP-Hint1 nachgewiesen werden.

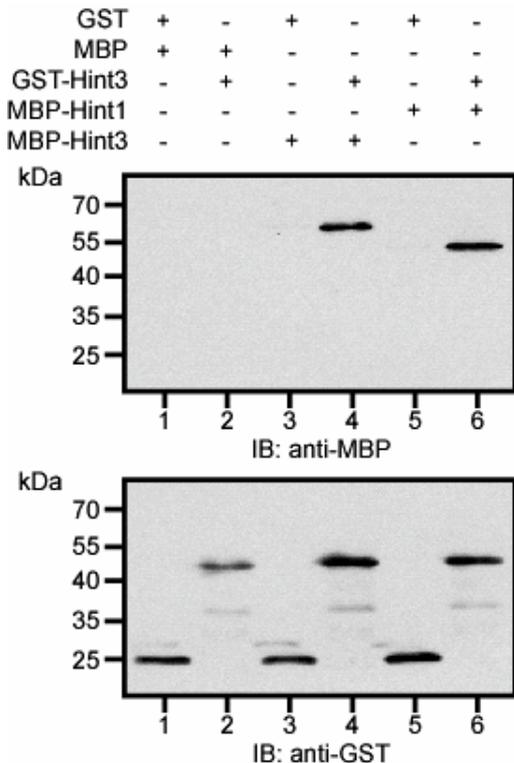


Abb. 4.9: Homo- und Heterodimerisierung von Hint3.

Je 4 µg rekombinantes GST-Hint3 sowie MBP-Hint3 und MBP-Hint1 wurden im Pull-down-Experiment miteinander inkubiert. Die Western Blot-Analyse wurde mit anti-MBP (0,25 µg/ml)- und anti-GST (0,5 µg/ml)-Antikörpern durchgeführt. GST-Hint3 bindet an MBP-Hint3 (Spur 4) und MBP-Hint1 (Spur 6). Unspezifische Bindungen der MBP-Hint-Proteine an GST waren nicht nachweisbar (Spuren 3 und 5). Die Kontrollen mit den MBP und GST (Spur 1) als auch GST-Hint3 und MBP sind negativ (Spuren 1 und 2). Der untere Blot zeigt, dass vergleichbare Mengen GST und GST-Hint3 eingesetzt wurden. Der Versuch wurde fünfmal reproduziert. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot.

4.4.2 Hint3-Proteine homodimerisieren in HEK293-Zellen

Um homodimere Hint3-Komplexe in HEK293-Zellen nachzuweisen, wurden die Zellen mit Plasmiden zur Überexpression von FLAG- und myc₆-getaggtten Hint3 transfiziert und nach 48 h lysiert. Bei der Präzipitation mit anti-FLAG-Antikörper wurde gezeigt, dass im Zelllysat myc₆-Hint3 an FLAG-Hint3 assoziiert vorliegt (Abb. 4.10).

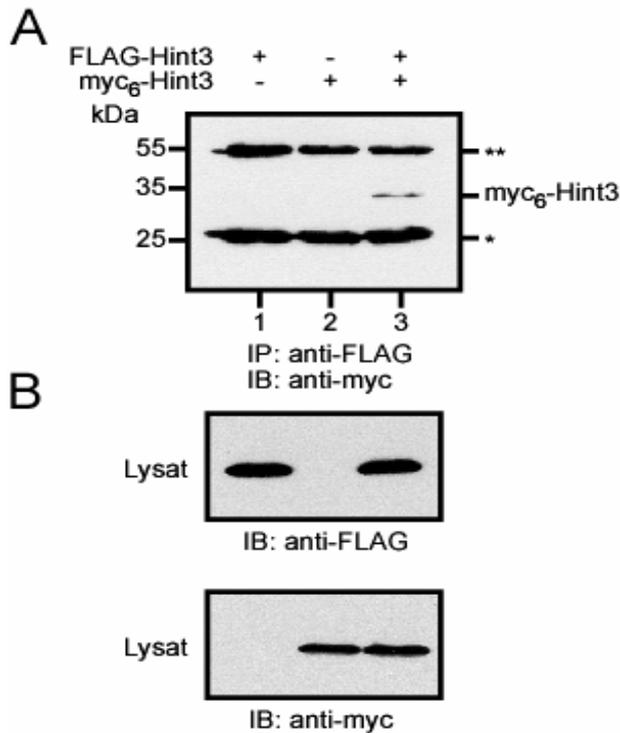


Abb. 4.10: Nachweis der Homodimerisierung von Hint3 in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden in 5 unabhängigen Versuchen transient mit jeweils 2 µg pCS2+myc₆-Hint3 und pCMV4-FLAG-Hint3 transfiziert, vorliegende Proteinkomplexe über anti-FLAG-M2-Antikörper (2 µg) präzipitiert und mit Protein A-Sepharose abgetrennt. Die Western Blot-Analyse erfolgte mit anti-myc-Antikörper (Klon 9E10). **A**) In den Präzipitaten der anti-FLAG-Antikörper konnte FLAG-Hint3 zusammen mit myc₆-Hint3 nachgewiesen werden (Spur 3). In den nur mit jeweils einem Konstrukt transfizierten Zellen ist myc₆-Hint3 nicht im Präzipitat nachweisbar (Spur 1 und 2). **B**) Transfektionskontrolle der Lysate. * schwere und **leichte Kette des präzipitierenden Antikörpers

4.4.3 Heterodimere Komplexe zwischen Hint1 und Hint3 sind in HEK293-Zellen nachweisbar

Im nächsten Schritt wurde die Ausbildung eines Heterodimers zwischen Hint1 und Hint3 in HEK293-Zellen mittels Immunpräzipitation nachgewiesen, nachdem die Zellen transient mit FLAG-Hint1 und myc₆-Hint3 transfiziert worden waren (Abb. 4.11 A). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von insgesamt fünf Versuchen. Das Vorliegen von FLAG-Hint1 und myc₆-Hint3 in den Zelllysaten wurde anhand einer Transfektionskontrolle überprüft (Abb. 4.11 B).

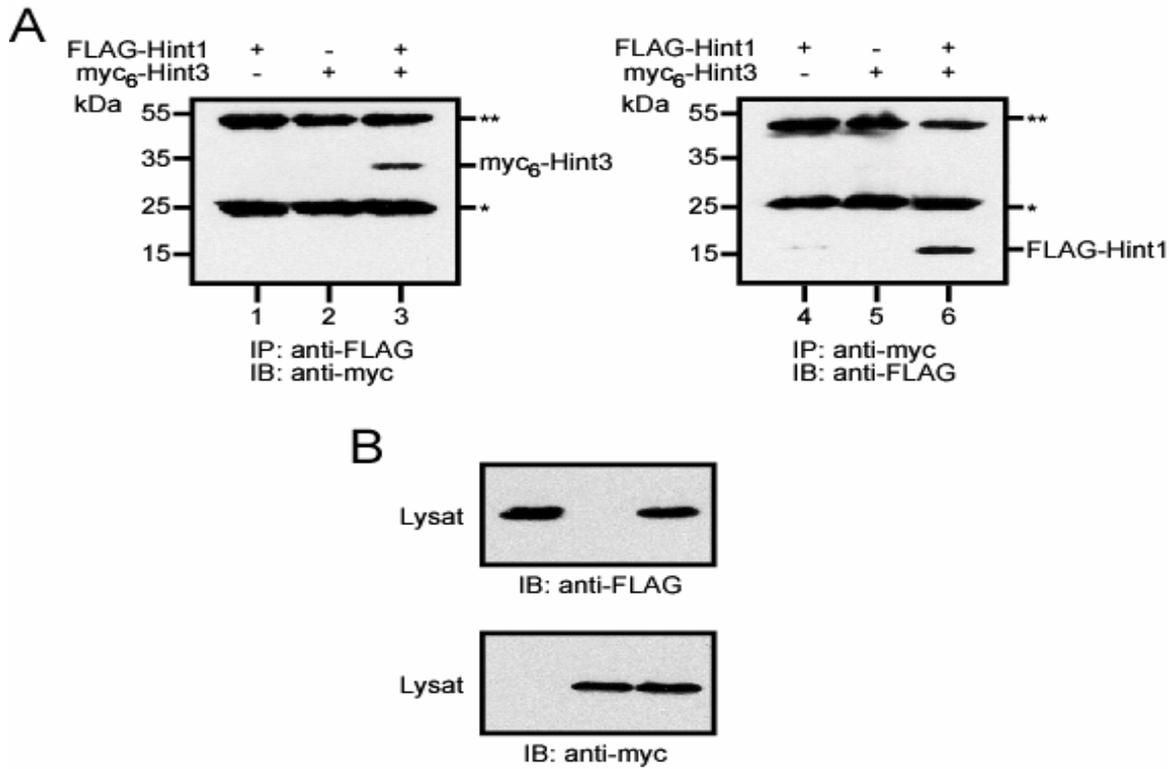


Abb. 4.11: Nachweis von Hint1/Hint3-Heterodimeren in HEK293-Zelllysaten. HEK293-Zellen wurden mit pCMV4-FLAG-Hint1 (2 µg) und pCS2+myc₆-Hint3 (2 µg) transfiziert, nach 48 h lysiert und heteromere Hint1/Hint3-Proteinkomplexe durch Immunpräzipitation isoliert. **A)** Bei der Immunpräzipitation mit anti-FLAG-M2-Antikörper (2 µg) wurde myc₆-Hint3 detektiert (Spur 3). Die HEK293-Zellen, die zur Kontrolle nur mit FLAG-Hint1 oder myc₆-Hint3 transfiziert wurden, zeigten keine unspezifische Präzipitationen (Spur 1 und 2). Umgekehrt konnte mit anti-myc-Antikörper (Klon 9E10, 2 µg) Hint1 als Interaktionspartner von Hint3 co-präzipitiert werden (Spur 6). Bei der Inkubationen der einfach transfizierten Zelllysate mit anti-myc-Antikörper wurden keine unspezifischen Bindungen nachgewiesen (Spuren 4 und 5). **B)** Transfektionskontrolle der Lysate.

* schwere und **leichte Kette des präzipitierenden Antikörpers

4.5 Untersuchung der enzymatischen Aktivität von Hint2

Alle bisher untersuchten Vertreter der HIT-Proteinfamilie besitzen enzymatische Aktivität [Brenner, 2002]. Das Tumorsuppressorprotein Fhit spaltet die Diadenosinpolyphosphatverbindungen Ap₃A und Ap₄A [Lima et al., 1997], Hint1 ist in der Lage Adenosinmonophosphatamidat (AMA) zu AMP zu hydrolysieren (Abb. 4.12) [Bieganski et al., 2002]. Es sollte nun untersucht werden, ob in *E. coli* rekombinant exprimiertes His₆-Hint2 enzymatisch aktiv ist und welches Substrat oder welche Substrate identifiziert werden können.

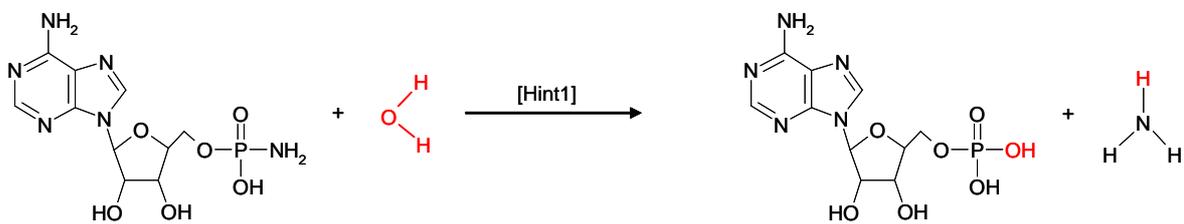


Abb. 4.12: Hydrolytische Spaltung von AMA durch Hint1.

4.5.1 Identifizierung von AMA als Substrat für Hint2

Als potenzielle Substrate wurden 100 µM AMA, AMP, ADP, ATP, Ap₃A oder Ap₄A mit 1 µg His₆-Hint2 für 30 min bei 37 °C inkubiert, das Protein abgetrennt und der Umsatz der Substrate sowie die Entstehung der Produkte analysiert. Dazu wurden Edukte und Produkte über eine Reversed Phase-HPLC (Typ HP Agilent 1100, Säule: C-18 Nucleosil-100-3, Partikelgröße 3 µm, Länge 125 mm, interner Durchmesser 4 mm) aufgetrennt und quantifiziert. Anhand der Elutionsprofile von Referenzsubstanzen wurden die entstandenen Produkte identifiziert. Unter den getesteten Bedingungen war Hint2 in der Lage, nur AMA zu hydrolysieren, wobei als Produkt der Reaktion AMP detektierbar war (Tab. 4.1). Für die anderen Substrate konnte keine Hydrolyse festgestellt werden. In der Abbildung 4.25 sind exemplarische Referenzchromatogramme gezeigt, in denen zum einen die Auftrennung der Standardsubstanzen AMA und AMP zu sehen ist und zum anderen die Umsetzung von AMA zu AMP durch Hint2 gezeigt wird (Abb. 4.13). Nachdem AMA als Substrat für

Hint2 identifiziert worden war, wurde es zur weiteren Charakterisierung der enzymatischen Aktivität von His₆-Hint2 verwendet.

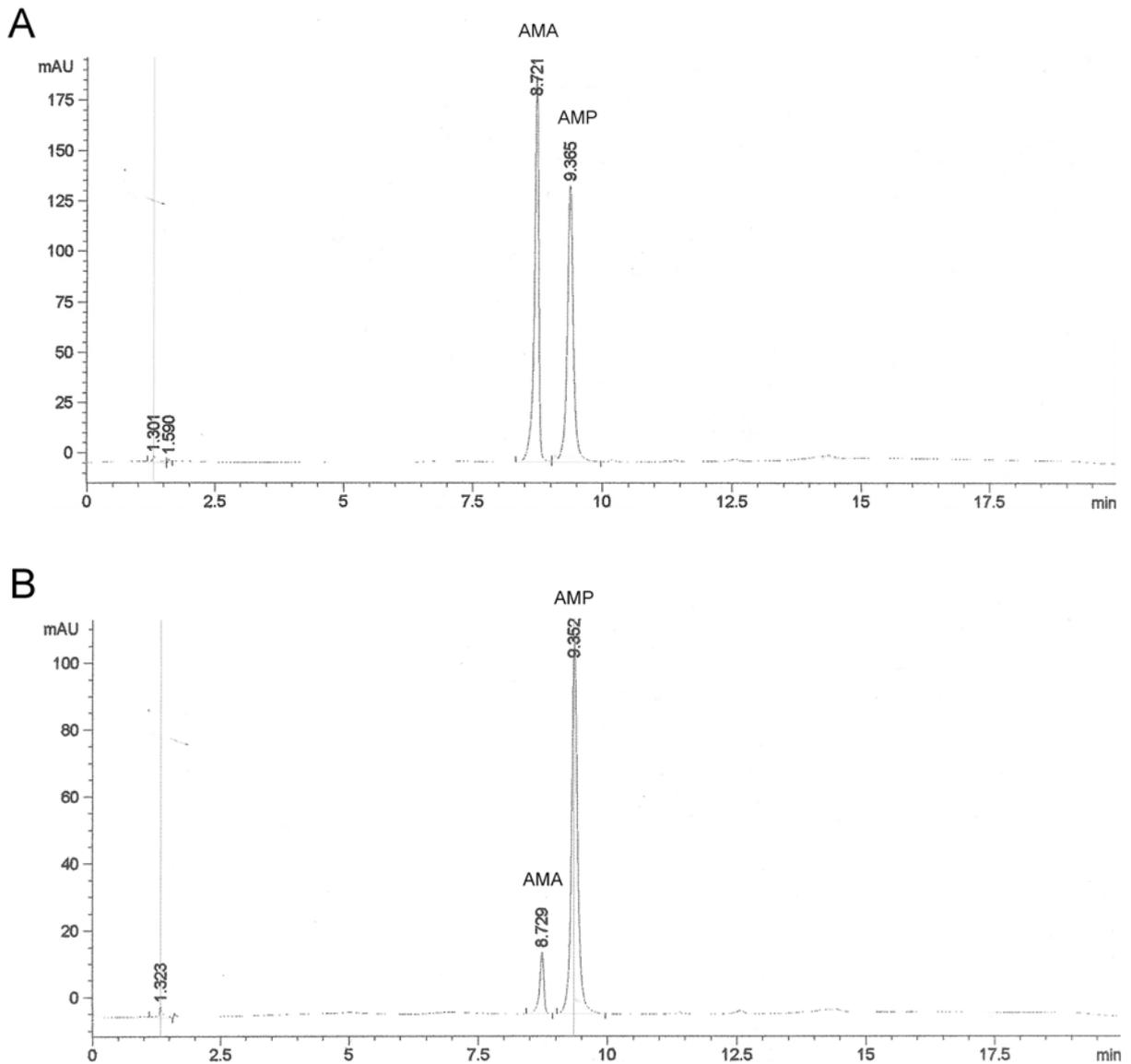


Abb. 4.13: Untersuchung der Hint2-katalysierten Hydrolyse von AMA zu AMP. A) Referenzchromatogramm von 100 μ M AMA und AMP (Gesamtvolumen 100 μ l). **B)** 100 μ M AMA wurden für 30 min mit 1 μ g His₆-Hint2 (Gesamtvolumen 200 μ l) inkubiert. Eine Umsetzung von AMA zu AMP konnte nachgewiesen werden.

Substrat	AMA	AMP	ADP	ATP	Ap ₃ A	Ap ₄ A
Hydrolyse	+	-	-	-	-	-

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung zur Identifizierung von potenziellen Hint2-Substraten.

4.5.2 Analyse des Einflusses von Mg^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen auf die enzymatische Aktivität von Hint2

Enzymatische Reaktionen, die Nukleotide als Substrat verwenden sind häufig abhängig von zweiwertigen Ionen. Für Hint1 wurde eine solche Abhängigkeit bereits beschrieben [Brenner et al., 1999]. Mit den nachfolgenden Untersuchungen sollte ermittelt werden, welchen Einfluss Magnesium- oder Zink-Ionen und der pH-Wert auf die durch His₆-Hint2 katalysierte Hydrolyse haben. Dazu wurde die enzymatische Aktivität von His₆-Hint2 in Magnesiumchlorid- oder Zinkchlorid-haltigen Puffern in einem pH-Bereich von 6,6 bis 7,8 bzw. 7,6 analysiert. Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart von Zink-Ionen die Umsetzung von AMA zu AMP durch Hint2 im Vergleich zu den Magnesium-haltigen Puffern in Abhängigkeit vom pH-Wert verringert ist (Abb. 4.14).

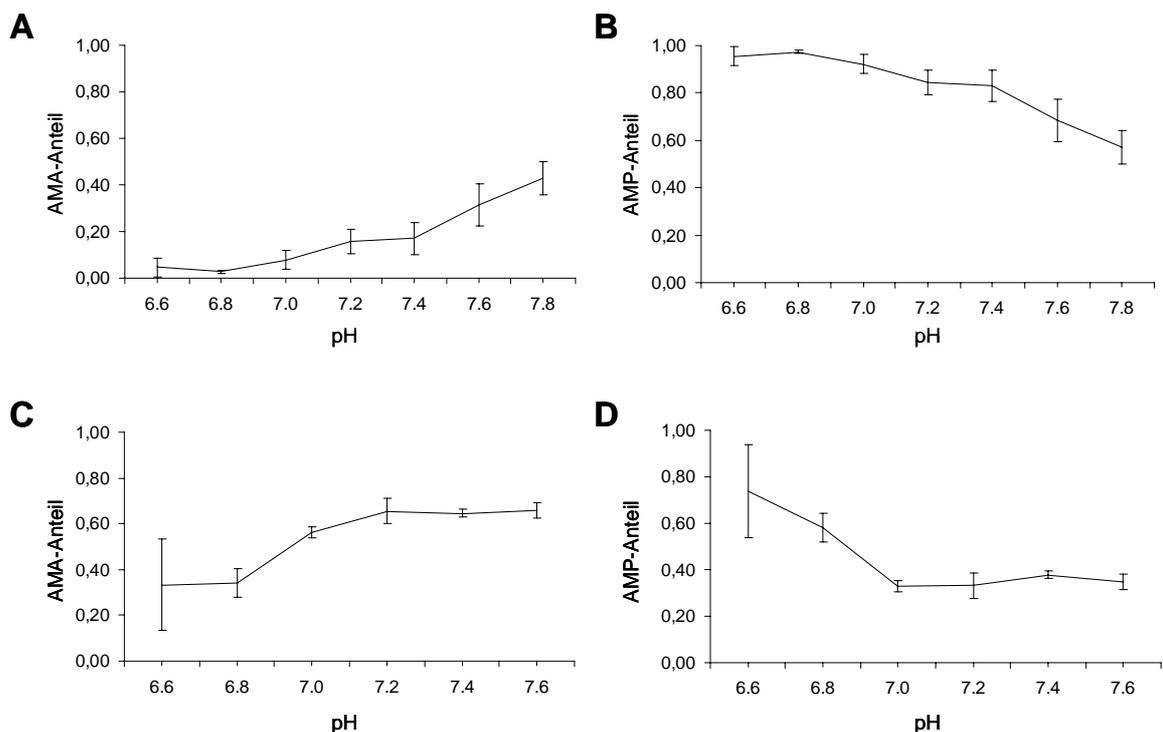


Abb. 4.14: Einfluss von Zn^{2+} -Ionen und Mg^{2+} -Ionen auf die Hint2-Aktivität. In 200 μ l Reaktionsvolumen wurden 125 ng His₆-Hint2 mit 100 μ M AMA und 2 mM $MgCl_2$ bei den pH-Werten 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, 7,6 und 7,8 inkubiert (A und B), sowie bei den pH-Werten 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4 und 7,6 mit 2 mM $ZnCl_2$ (C und D). Der Anteil der Peakflächen von AMA (A und C) und AMP (B und D) an der Peakflächensumme der einzelnen Versuche wurde in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgetragen. **A)** Der AMA-Anteil nahm in $MgCl_2$ -haltigen Puffern mit steigendem pH-Wert zu, es wurde weniger Edukt umgesetzt. **B)** Analog dazu lag der AMP-Anteil bei pH 6,8 am höchsten und fiel mit steigendem pH-Wert. **C)** Bei Anwesenheit von Zink-Ionen wurde im Vergleich zur Magnesium-haltigen Lösung weniger AMA umgesetzt. **D)** Im Zink-haltigen Puffer führte dies zu einer verringerten Bildung von AMP. Die Werte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus je drei unabhängigen Versuchen.

4.5.3 Bestimmung des pH-Optimums

Um den pH-Wert zu ermitteln, bei dem Hint2 die höchste Aktivität besitzt, wurden die Hydrolysereaktion von AMA zu AMP zunächst bei den pH-Werten 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 oder 9,0 mit 30 ng Hint2 und bei einer AMA-Konzentration von 100 μ M durchgeführt. Aus den Analysen wurde ersichtlich, dass der optimale pH-Bereich für die Hint2-katalysierte AMA-Hydrolyse um 5,0 liegen muss (Abb. 4.15). Bei den pH-Werten 4,0 und pH 9,0 konnte keine Umsetzung detektiert werden. Bei Kontrollversuchen wurden die gleichen Reaktionsansätze in Abwesenheit von Hint2 inkubiert, wobei keine hydrolytische Spaltung von AMA feststellbar war.

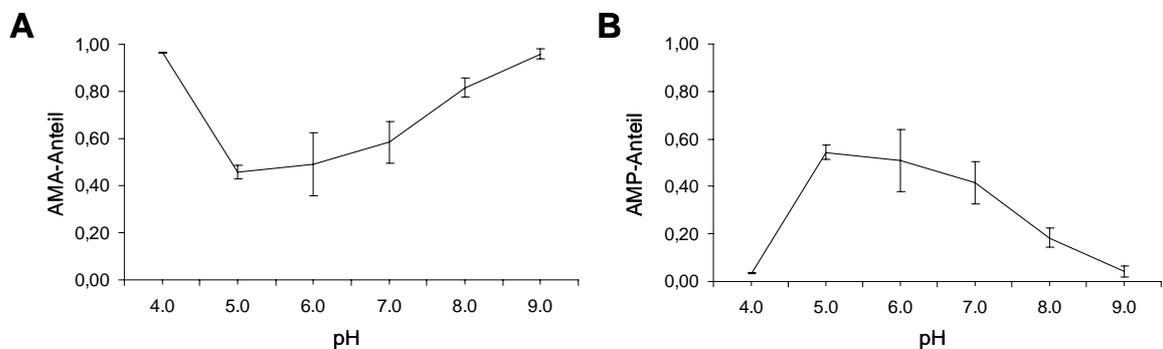


Abb. 4.15: pH-Abhängigkeit der Hydrolyseaktivität von Hint2. 30 ng Hint2 und 100 μ M AMA wurden in einem 2 mM $MgCl_2$ -haltigen Puffer bei den pH-Werten 4,0-9,0 für 5 min inkubiert. Dargestellt sind die Anteile der AMA- und AMP-Peakflächen an der Peakflächensumme der einzelnen Experimente in Abhängigkeit vom pH-Wert. **A)** Bei pH 4,0 und 9,0 fand keine Hydrolyse statt. Der Anteil an nicht umgesetztem AMA war bei pH 5,0 am niedrigsten. **B)** Analog dazu wurde bei pH 5,0 am meisten AMP gebildet. Alle Werte wurden in dreifachen Bestimmungen ermittelt, die Abweichungen sind als Standardabweichungen dargestellt.

Um den optimalen pH-Wert weiter einzugrenzen, wurden Puffer mit den pH-Werten 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 und 7,0 hergestellt und die Analysen wiederholt (Abb. 4.16). Wie in Abbildung 4.16 gezeigt, konnte der optimale pH-Wert auf 5,5 eingegrenzt werden, hier fand die effizienteste Umsetzung von AMA (A) zu AMP (B) statt.

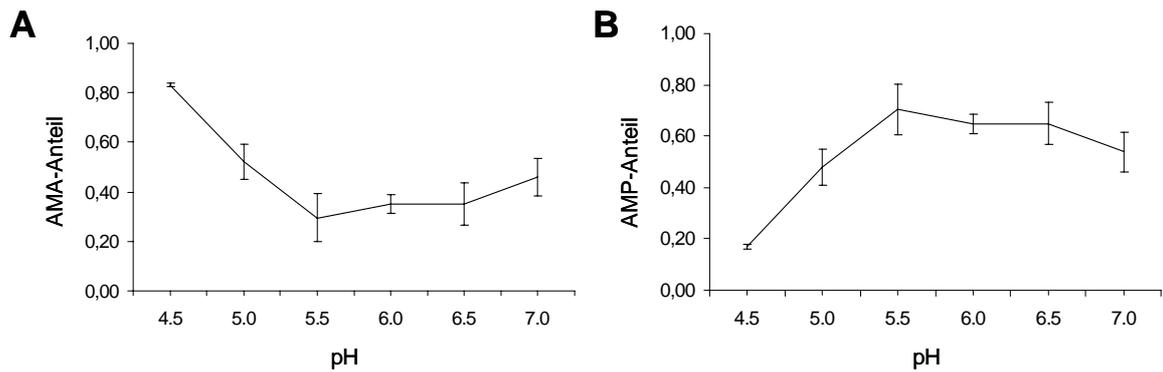


Abb. 4.16: Eingrenzung des für die Hint2-Aktivität optimalen pH. In den MgCl₂-haltigen Puffern mit den pH-Werten 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 und 7,0 erfolgte für 5 min die Inkubation von 30 ng Hint2 in Gegenwart von 100 μM AMA gefolgt von der HPLC-Analyse. Die Anteile der AMA- und AMP-Peakflächen an den Peakflächensummen der einzelnen Versuche sind in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. **A)** Der Anteil von AMA an der Peakflächensumme erreichte bei pH 5,5 den niedrigsten Wert. **B)** Der AMP-Anteil war bei pH 5,5 am höchsten.

4.5.4 Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante

Nachdem in den vorherigen Experimenten das Substrat, die optimalen Pufferbedingungen und der optimale pH für Hint2 bestimmt worden waren, sollte die in der Literatur oft zur allgemeinen Charakterisierung von Enzymen verwendete Michaelis-Menten-Konstante (K_m) bestimmt werden. Zur Berechnung des K_m -Wertes, der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}) und der katalytischen Konstante (k_{cat}) von Hint2 dient die Michaelis-Menten-Gleichung (Abb. 4.17).

A

$$v = \frac{v_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

B

$$K_m = \frac{v_{max}}{2}$$

C

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{K_m}$$

Abb. 4.17: Formeln zur K_m -Wert-Berechnung: **A)** Michaelis-Menten-Gleichung. **B)** Definition der Michaelis-Menten-Konstante: Die Michaelis-Menten-Konstante K_m [μM] gibt die Substratkonzentration an, bei der die Hälfte der theoretischen maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}) bei Substratsättigung erreicht ist. **C)** Formel zur Berechnung der katalytischen Konstante k_{cat} [s⁻¹], v = Reaktionsgeschwindigkeit [μM/s], v_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit [μM/s], [S] = Substratkonzentration [μM].

Da bei diesen Versuchen die enzymatische Hydrolyse von AMA durch Hint2 immer nach 5 min durch Einfrieren der Proben in flüssigem Stickstoff beendet wurde, war die Reaktionszeit immer gleich. Die Menge an verbrauchtem Substrat AMA entsprach der

Menge an gebildetem Produkt AMP, da Hint2 ein Molekül AMA zu einem Molekül AMP hydrolysiert. Die bei der Auswertung der HPLC-Analysen generierten AMP-Peakflächen wurde deshalb nicht in Reaktionsgeschwindigkeiten umgerechnet, sondern direkt zur Berechnung des K_m -Wertes mit der Sigma Plot 8.0-Software verwendet. Neben der Michaelis-Menten-Gleichung wurden die allgemein bekannten Verfahren zur Linearisierung der Michaelis-Menten-Gleichung nach Eadie-Hofstee, Lineweaver-Burk und Hanes-Woolf eingesetzt, um die Michaelis-Menten-Konstante zu berechnen. Die Berechnungen lieferten für Hint2 im Mittel einen K_m von 28,3 μM für die Hydrolyse von AMA zu AMP, darüber hinaus wurden die Maximalgeschwindigkeit $v_{\text{max}} = 0,1887 \mu\text{M/s}$ und die katalytische Konstante $k_{\text{cat}} = 0,0067 \text{ s}^{-1}$ berechnet (Abb. 4.18).

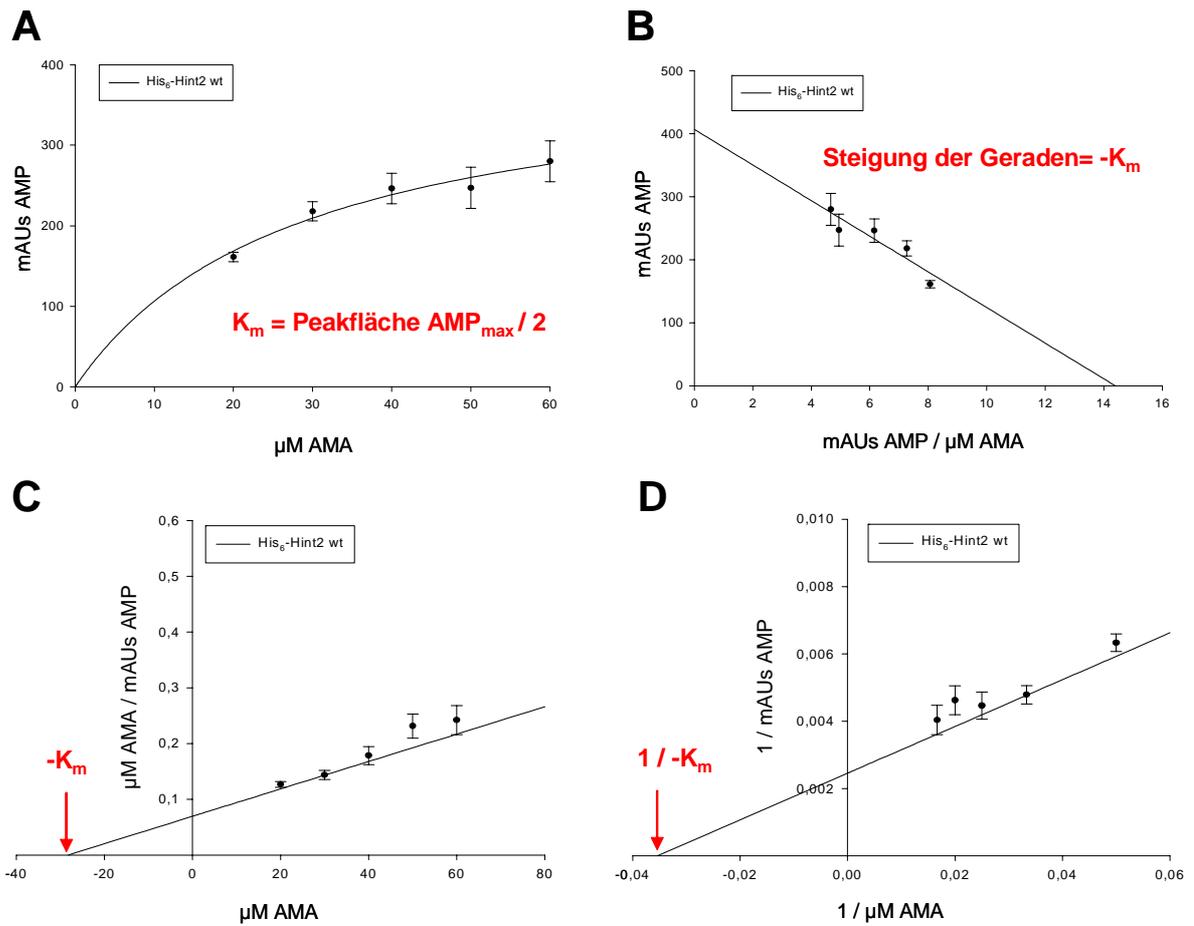


Abb. 4.18: Ermittlung des K_m -Wertes für Hint2. 20, 30, 40, 50 oder 60 $\mu\text{M AMA}$ wurden in mit 2 mM Mg^{2+} -Ionen versetzten Puffern (pH 5,5) für 5 min bei 25 $^\circ\text{C}$ mit 100 ng $\text{His}_6\text{-Hint2}$ inkubiert. Die für AMP in Abhängigkeit der eingesetzten AMA-Konzentration erhaltenen Peakflächen (Einheit: mAU s = milli absorption units x second) wurden für die Berechnung des K_m -Wertes herangezogen. Die durch die verschiedenen Auftragungsmethoden erhaltenen K_m -Werte ergaben im Mittel 28,3 μM , dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 15 Einzelbestimmungen pro AMA-Konzentration. Die Ausgleichsgeraden wurden nach den jeweiligen Berechnungsverfahren mit der SigmaPlot 8.0-Software erstellt. **A)** Michaelis-Menten-Diagramm, rot: Berechnung der Michalis-Menten-Konstante. **B)** Eadie-Hofstee-Plot: Der K_m -Wert entspricht der positiven Steigung der Ausgleichsgeraden. **C)** Hanes-Woolf-Linearisierung: Der negative K_m -Wert ist der Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der x-Achse. **D)** Lineweaver-Burk-Diagramm: Auf der x-Achse ist der Kehrwert der Substratkonzentration aufgetragen, anhand deren Schnittpunkt mit der Ausgleichsgeraden kann die Michalis-Menten-Konstante ermittelt werden.

4.5.5 Nachweis der Homodimerisierung der Hint2-H149N-Mutante

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Hint2 analog zu Hint1 sowohl ein Homodimer ausbildet als auch enzymatisch aktiv ist. In der Literatur wird die aktive Form des Hint1-Proteins als Homodimer beschrieben, dies sollte auch für ein mutiertes Protein gelten, bei dem zur Modifizierung des aktiven Zentrums eine Aminosäure ausgetauscht wurde. Um nachzuweisen, dass das Hint2-Wildtyp-Enzym und die Hint2-H149N-Mutante Homodimere ausbilden, wurden Gelfiltrationsexperimente durchgeführt. Das His₆-Hint2-Protein ist 18 kDa groß, das Homodimer sollte eine Größe von ca. 36 kDa aufweisen. Durch Vergleich des Elutionsprofils von His₆-Hint2-WT und His₆-Hint2-H149N mit den Referenzläufen von Carboanhydrase (29 kDa) und BSA (66 kDa), zeigte sich dass die beiden rekombinanten Proteine zwischen den beiden Standards eluieren (Abb. 4.19). Anhand des Flussvolumens und den Molekulargewichten der Standardsubstanzen wurde ein Molekulargewicht von etwa 36 kDa ermittelt, was auf das Vorliegen eines Homodimers schließen ließ. Somit zeigten diese Experimente, dass His₆-Hint2-WT und His₆-Hint2-H149N als Homodimere vorlagen.

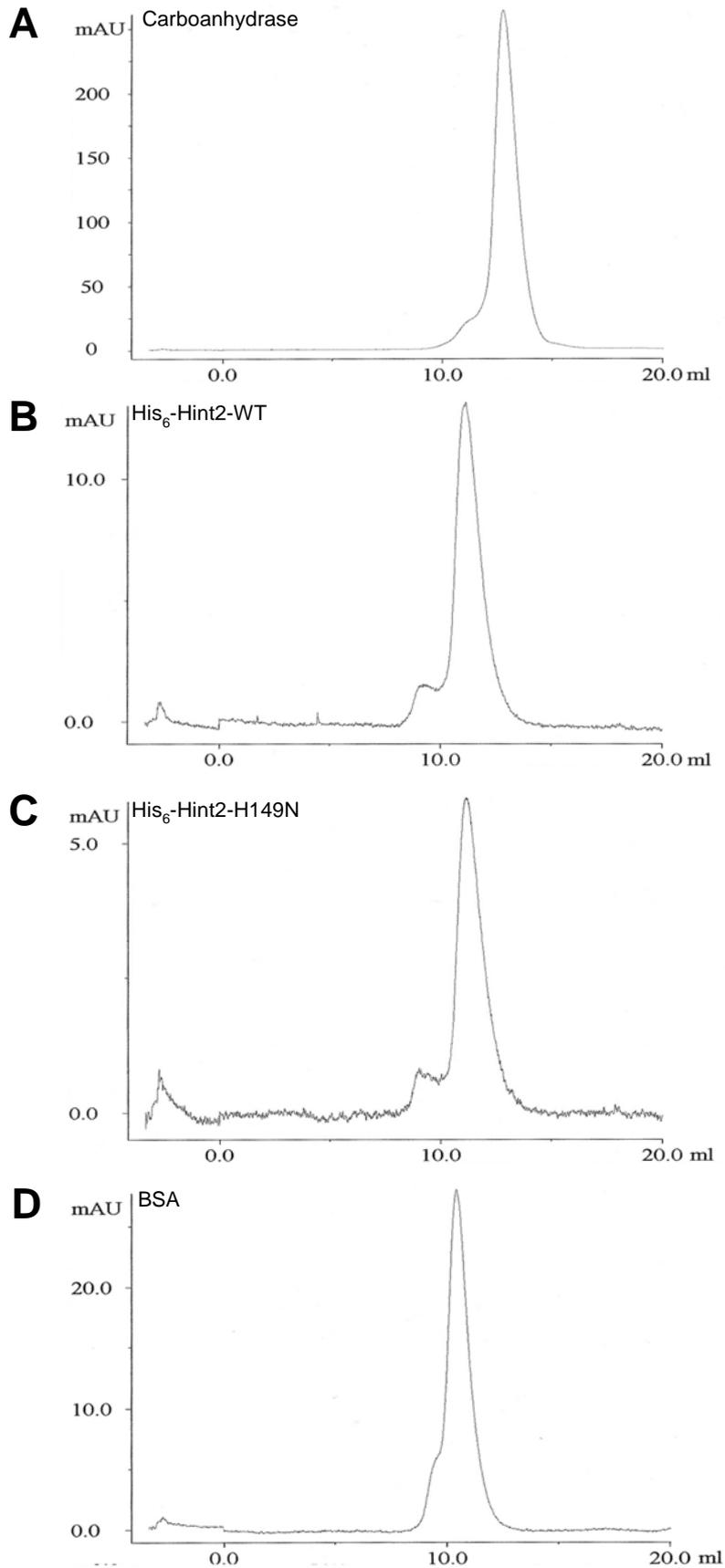


Abb. 4.19: Nachweis der Homodimerisierung der Hint2-H149N-Mutante.

Die His₆-getaggten Proteine Hint2-WT und Hint2-H149N wurden rekombinant exprimiert und unter nativen Bedingungen gereinigt. Bei der anschliessenden Gelfiltrationsanalyse wurden die Proteine Carboanhydrase (A) und BSA (D) als Standards eingesetzt (300 µg bzw. 30 µg). Da His₆-Hint2-Wildtyp (B, 15 µg) und His₆-Hint2-H149N (C, 7,5 µg) zwischen den beiden Standards, eluierten, konnte vom Vorliegen homodimerer Komplexe ausgegangen werden.

Die Hint2-Mutanten S144A, H147N, H149N, H151N und das Wildtyp-Enzym wurden rekombinant exprimiert, aufgereinigt und in Vorversuchen auf enzymatische Aktivität untersucht (nicht gezeigt). Es wurde nachgewiesen, dass die Hint2-H147N- und die Hint2-H149N-Mutante im Gegensatz zu den anderen Mutanten und dem Wildtyp-Protein AMA nicht mehr zu AMP hydrolisieren konnten. Daraufhin wurden jeweils 100 ng des Wildtyp-Proteins, der Hint2-S144A- und der Hint2-H151N-Mutante für fünf Minuten bei 25 °C mit 20-60 µM AMA inkubiert. Von der Hint2-H147N- und der Hint2-H149N-Mutante wurden 200 ng Protein eingesetzt, um eine eventuell vorhandene Restaktivität ausschließen zu können. Die Ergebnisse bestätigten die Befunde aus den Vorversuchen. So führte die Mutation der Histidine 147 und 149 zu Asparagin im Hint2-Molekül zur Abnahme der enzymatischen Aktivität gegenüber dem Wildtyp-Enzym um 100 % (Tab. 4.2). Im Vergleich zum Wildtyp-Protein wies die S144A-Mutante eine um 11,8 % verringerte Aktivität auf, das Enzym mit der Mutation im Histidin 151 wies eine um 71,8 % reduzierte Hydrolyseaktivität auf. Die grafische Darstellung der Ergebnisse zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Messreihen (Abb. 4.21).

Protein	Hint2-S144A	Hint2-H147N	Hint2-H149N	Hint2-H151N
Aktivitätsabnahme (%)	11,8 ± 5,2	100 ± 0	100 ± 0	71,8 ± 2,2

Tab 4.2: Prozentuale Aktivitätsabnahme der mutierten Hint2-Proteine im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Als Berechnungsgrundlage dienten die Mittelwerte der AMP-Peakflächen aus drei unabhängigen Messreihen pro AMA-Konzentration. Die bei den einzelnen Substratkonzentrationen erhaltenen AMP-Peakflächen der verschiedenen Mutanten wurden auf die des Wildtyp-Proteins bezogen. Der Wert in der Tabelle gibt den Mittelwert und die Streuung der Abnahme bei allen gemessenen Konzentrationen pro Protein an.

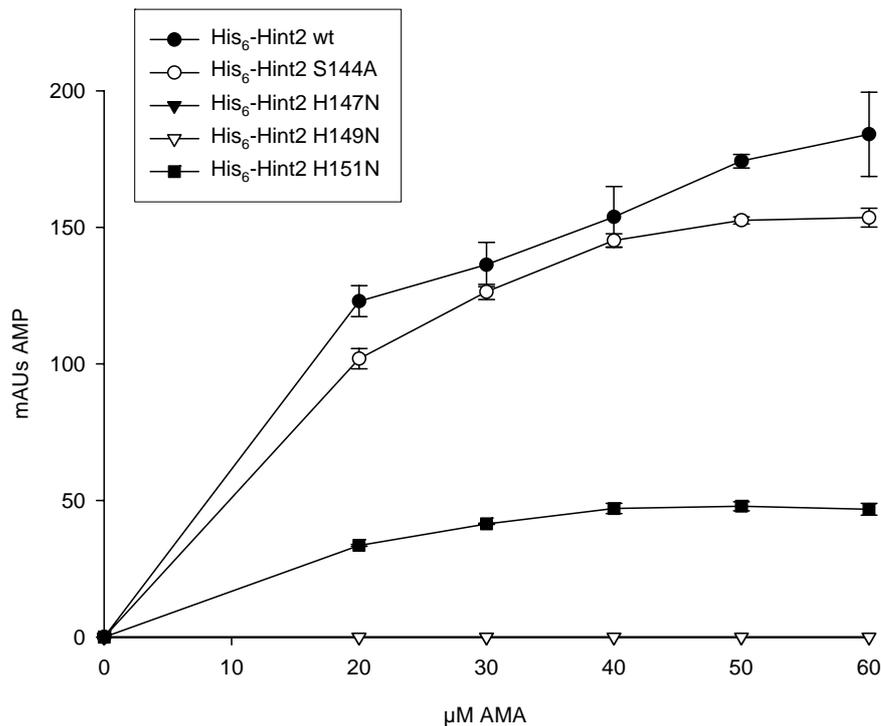


Abb. 4.21: Grafische Darstellung der Analyse der enzymatischen Aktivitäten der Hint2-Mutanten. Auftragung der AMP-Peakflächen gegen die eingesetzte Substratkonzentration. Es zeigte sich, dass die H147N- und die H149N-Mutante inaktiv sind. Die Graphen werden in der Abbildung von der x-Achse verdeckt. Bei der Serin-Alanin-Mutante und der H151N-Mutante konnte eine gegenüber dem Wildtyp-Protein verringerte enzymatische Aktivität nachgewiesen werden.

4.6 Aufreinigung und Charakterisierung eines anti-Hint2-Antikörpers

4.6.1 Aufreinigung des Antikörpers

Für den Nachweis von Hint2 mittels Western Blot-Analyse, für Immunpräzipitationsexperimente, sowie für den Einsatz bei der indirekten Immunfluoreszenz wurde ein polyklonaler anti-Hint2-Antikörper in Kaninchen erzeugt. Für die Affinitätsreinigung der anti-Hint2-Antikörper wurde His₆-Hint2 in *E. coli* exprimiert und unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Die eluierten Proteinfraktionen wurden mit SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abb. 4.22). Die Fraktionen zwei bis vier wurden vereinigt, das Protein umgepuffert und kovalent an das Mini-LeakTM-Säulenmaterial gekoppelt. Anschließend wurde das anti-Hint2-Antiserum (Tag 81 nach erster Immunisierung) über die Säule gegeben. Nach einem Waschschrift wurden die gebundenen Antikörper in mehrere Fraktionen eluiert und mittels SDS-PAGE analysiert (nicht gezeigt). Es folgte die Dialyse der Fraktionen und anschließend die Konzentrationsbestimmung mit der BCA-Methode.

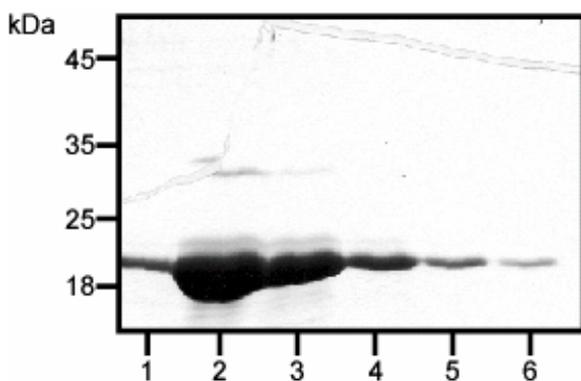


Abb. 4.22: Denaturierende Aufreinigung von His₆-Hint2. Nach der Elution zeigen die einzelnen Fraktionen 1-6 (Spur 1-6) im SDS-Polyacrylamidgel kaum Abbauprodukte, insbesondere die hochkonzentrierten Fraktionen 2 (Spur 2) und 3 (Spur 3). Das etwa 3 kDa über dem in der Literatur angegebenen Wert für Hint2 (18 kDa) liegende Molekulargewicht lässt sich durch die Fusion des Proteins an 6 Histidine und die damit verbundenen zusätzlichen Aminosäuren erklären.

4.6.2 Charakterisierung des anti-Hint2-Antikörpers

4.6.2.1 Kreuzreaktivität und Spezifität

Zur Überprüfung der Spezifität des anti-Hint2-Antikörpers wurden GST, GST-Hint1, GST-Hint2 sowie GST-Hint3 in einer SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 4.23 A), geblottet und mit dem anti-Hint2-Antikörper inkubiert. Bei der Detektion reagierte der anti-Hint2-

Antikörper spezifisch mit GST-Hint2 und zeigte keine Kreuzreaktivität mit rekombinantem Hint1 und Hint3 (Abb. 4.23 B). Zur weiteren Überprüfung der Spezifität wurden die Lösungen mit dem aufgereinigten Antikörper jeweils mit GST oder GST-Hint2 vorinkubiert, um die in der Lösung enthaltenen Antikörper zu binden und durch Sedimentation der GST-Proteine mit GSH-Beads aus der Lösung zu entfernen. Danach wurde der Überstand für die Western Blot-Analyse verwendet, im Reaktionsansatz mit der GST-vorbehandelten Antikörperlösung konnte GST-Hint2 spezifisch detektiert werden (Abb. 4.23 C), da die Antikörper nicht durch GST gebunden wurden. Im Gegensatz dazu konnte mit der mit GST-Hint2 inkubierten Lösung kein GST-Hint2 mehr nachgewiesen werden (Abb. 4.23 D).

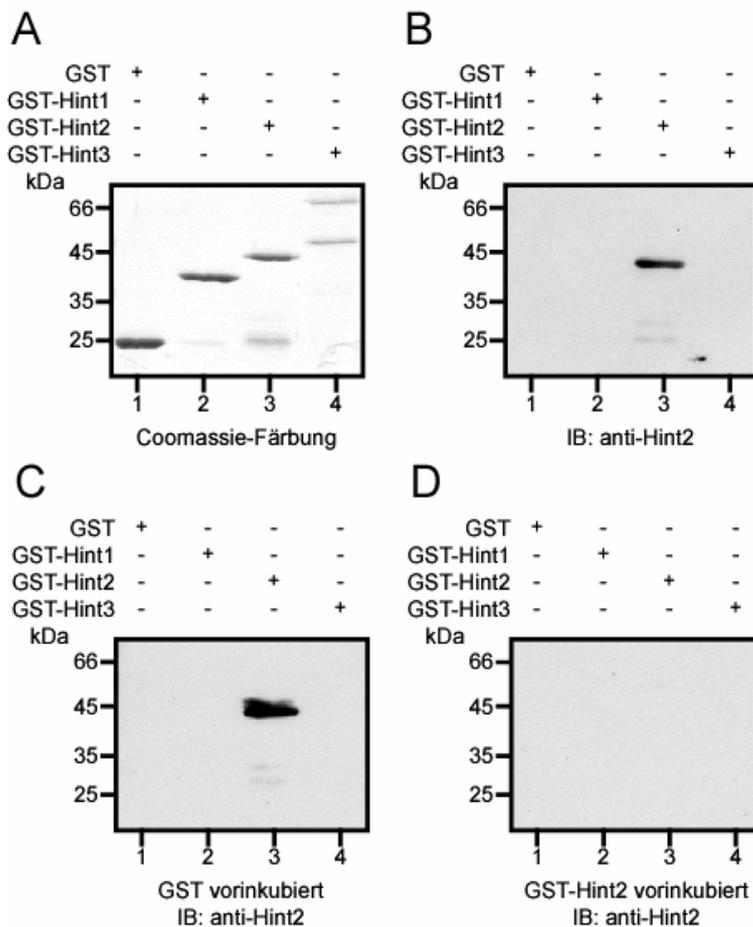


Abb. 4.23: Nachweis der Spezifität des anti-Hint2-Antikörpers. **A)** Coomassie-gefärbtes Inputgel. **B)** Western Blot mit dem affinitätsgereinigten anti-Hint2-Antikörper. **C)** Western Blot nach einstündiger Vorinkubation des affinitätsgereinigten anti-Hint2-Antikörpers mit 10 µg GST und anschließender Sedimentation der gebundenen Antikörper mit GSH-Agarose-Beads. **D)** Einstündige Vorinkubation mit 10 µg GST-Hint2 und anschließende Western Blot-Analyse. Eingesetzt wurden 2 µg/ml anti-Hint2-Antikörper in TST und je 1 µg GST (Spur 1), GST-Hint1 (Spur 2), GST-Hint2 (Spur 3) und GST-Hint3 (Spur 4, die zusätzliche Bande bei ca. 66 kDa ist experimentell bedingt).

4.6.2.2 Nachweis von endogenem Hint2 in Zelllysaten

Zum Nachweis der relativen Expression von endogenem Hint2 wurden gleiche Gesamtproteinmengen aus Lysaten verschiedener Zelllinien analysiert. Nach der SDS-PAGE-Auftrennung folgte die Western Blot-Analyse mit dem affinitätsgereinigten anti-Hint2-Antikörper. In allen untersuchten Zelllinien konnte Hint2 nachgewiesen werden (Abb. 4.24). Zur Überprüfung der eingesetzten Gesamtproteinmenge wurde parallel β -Actin als Ladekontrolle nachgewiesen. Es zeigte sich, dass HEK293-, HeLa-, HT29-, K562- und SW480-Zellen eine relativ starke Expression von Hint2-Protein aufweisen, wohingegen in A431 und Jurkat relativ wenig Hint2 exprimiert wird. Die in den meisten Lysaten oberhalb der Hint2-Bande erkennbare, etwas langsam laufendere Bande kann auf das Vorhandensein von Hint2 mit der noch nicht abgespaltenen mitochondrialen Signalsequenz zurückgeführt werden.

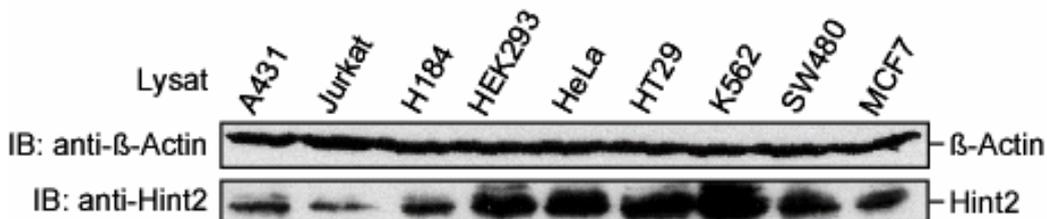


Abb. 4.24: Nachweis von Hint2 in verschiedenen Zelllysaten. Western Blot-Analyse von 30 μ g Gesamtprotein aus Zelllysaten (Lysepuffer: PBS (+/+)) mit 0,1 % (v/v) TX-100) mit dem affinitätsgereinigtem anti-Hint2-Antikörper (2 μ g/ml). Die Vergleichbarkeit der aufgetragenen Gesamtproteinmenge wurde mit einem anti- β -Actin-Antikörper (0,1 μ g/ml) überprüft.

4.7 Lokalisation von homodimeren Hint2-Proteinkomplexen, endogenem und YFP-getaggttem Hint2 in Zellen

4.7.1 Fluoreszenzmikroskopie mit CFP-/YFP-Hint2 in HeLa-Zellen

Zur Überprüfung der in den biochemischen Analysen gewonnenen Daten wurden 10^5 HeLa-Zellen mit Expressionsvektoren transfiziert, die eine Überproduktion von Hint2 bewirkten, das an seinem N-Terminus mit Cyan Fluorescent Protein (CFP) oder Yellow Fluorescent Protein (YFP) fusioniert war. Nach der Fixierung der Zellen auf den Deckgläschen wurden diese mit einem Zeiss LSM519 META fotografiert. Die überexprimierten Proteine YFP-Hint2 und CFP-Hint2 konnten bei dieser Fixierungsmethode sowohl im Zytosol als auch in den Kernstrukturen der HeLa-Zellen lokalisiert werden (Abb. 4.25). Bei Überlagerung der Einzelbilder war es möglich, die beiden Fluoreszenzproteine teilweise in den gleichen Kompartimenten der Zellen zu lokalisieren, sowohl im Zytosol als auch in geringerem Ausmaß im Zellkern. Als Kontrolle dienten HeLa-Zellen, die mit CFP- und YFP-exprimierenden Leervektoren transfiziert, fixiert und mit einem Zeiss LSM510 META analysiert worden waren (nicht gezeigt).

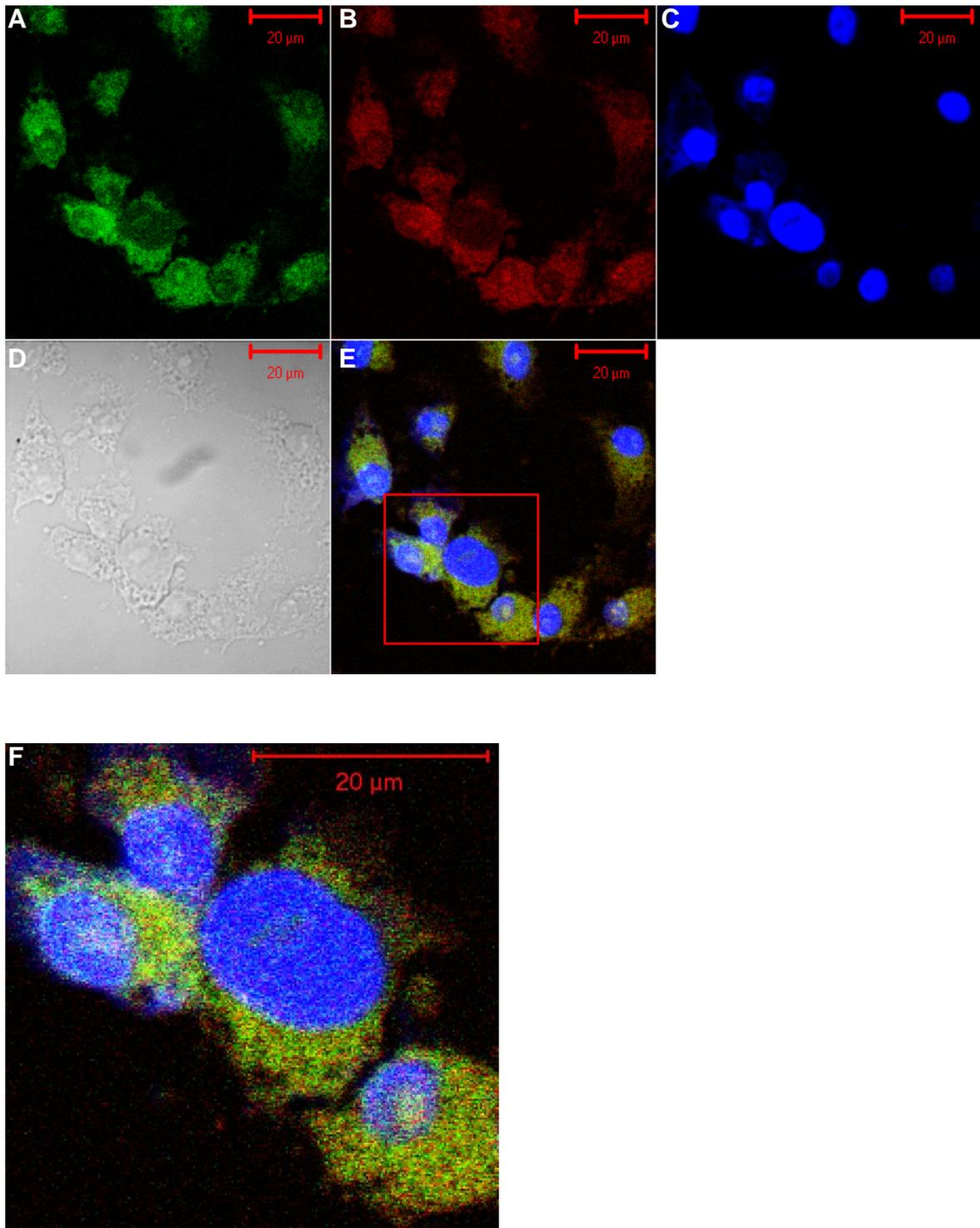


Abb. 4.25: Fluoreszenzmikroskopische Lokalisation des Hint2-Homodimers in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden mit je 3 µg CFP-Hint2 oder YFP-Hint2 transfiziert und nach 48 h mit Methanol fixiert. YFP-Hint2 (grün) wurde bei 488 nm, CFP-Hint2 (rot) bei 543 nm detektiert. Der Zellkern wurde mit dem DAPI-Reagenz (blau) nachgewiesen. **A)** YFP-Hint2. **B)** CFP-Hint2. **C)** DAPI-Färbung der Zellkerne. **D)** Phasenkontrastaufnahme der fixierten Zellen. **E)** Überlagerung der Bilder A), B) und C). CFP-Hint2 und YFP-Hint2 sind im Zytoplasma und im Kern sichtbar, punktuell vorhandene gelbe Stellen zeigen eine Lokalisation der beiden Proteine in den gleichen Kompartimenten. **F)** Vergrößerung des in E) rot markierten Ausschnittes. Vergrößerung: A), B), C), D), E) und F) 63x, Scan-Zoom 1,6; F) zusätzlich 2x digitaler Zoom.

4.7.2 Lokalisation von Hint2 in HEK293-Zellen

Um Hint2 in HEK293-Zellen zu lokalisieren, wurde der anti-Hint2-Antikörper für indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen eingesetzt. Dazu wurden HEK293-Zellen auf Deckgläschen kultiviert, mit Methanol fixiert und mit dem affinitätsgereinigten Antikörper inkubiert. Die Analyse und Dokumentation erfolgte mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Zeiss LSM510 META). Hint2 konnte sowohl im Zytosol als auch im Kern der HEK293-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.26). Auffällig war, dass das Protein im Zytoplasma keine gleichmäßige Verteilung aufwies, sondern in lokalen, ungleichmäßig geformten Bereichen stärker konzentriert war. Dies deutete darauf hin, dass endogenes Hint2 möglicherweise in Organellen lokalisiert sein könnte.

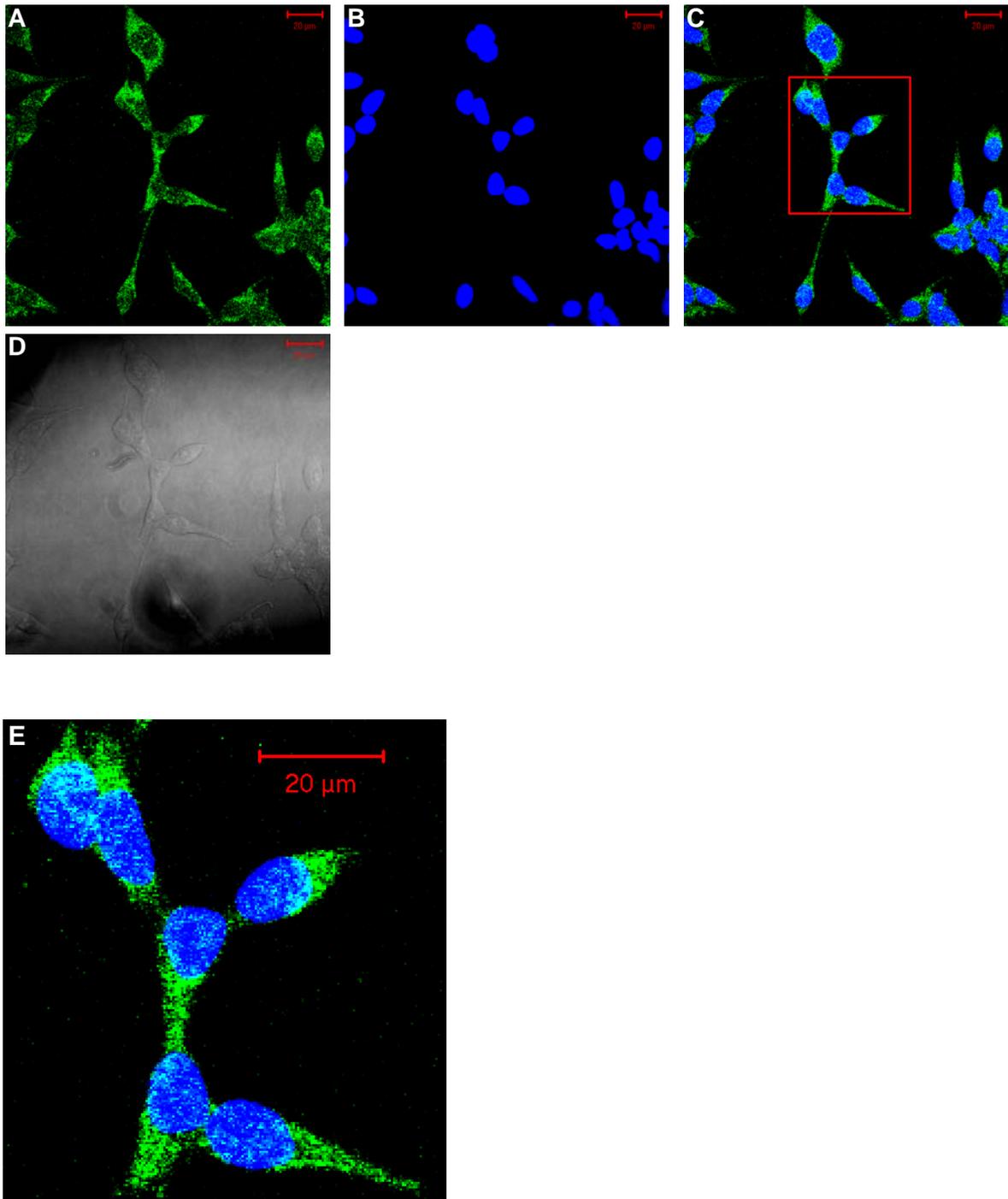


Abb. 4.26: Lokalisation von Hint2 in HEK293-Zellen durch konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Endogenes Hint2 wurde mit dem affinitätsgereinigten anti-Hint2-Antikörper (20 µg/ml) und einem Alexa Fluor™ 488 Ziege-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (0,2 µg/ml) detektiert, der Zellkern wurde mit DAPI (blau) nachgewiesen. **A)** Bei der Aufnahme des Präparates bei 488 nm ist Hint2 detektiert. **B)** DAPI-Färbung der Zellkerne. **C)** Überlagerung der Bilder aus A) und B). Hint2 ist im Zytosol in unregelmäßig geformten Strukturen und im Kern sichtbar. Eine vermehrte Konzentrierung des Proteins war in Kernnähe und an der Kernmembran detektiert. **D)** Phasenkontrastaufnahme der fixierten Zellen. **E)** Vergrößerung des in C) rot markierten Ausschnittes. Vergrößerung: A), B), C), D) und E) 63x, Scan-Zoom 0,8; E) zusätzlich 2x digitaler Zoom.

4.7.3 Nachweis von Hint2-YFP in den Mitochondrien von HEK293-Zellen

Nachdem bei den Untersuchungen zur Lokalisation von endogenem Hint2 in HEK293-Zellen festgestellt worden war, dass Hint2 eventuell in Zellorganellen lokalisiert sein könnte, wurden Experimente zum Nachweis von Hint2 in den Mitochondrien von HEK293-Zellen durchgeführt. Dazu wurden 10^5 HEK293-Zellen mit den Vektoren pcDNA3-Hint2-YFP oder pcDNA3-YFP-Hint2 transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert, die Mitochondrien mit einem spezifischen Antikörper angefärbt und die Zellen mit einem Zeiss LSM519 META analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass Hint2-YFP hauptsächlich mit den mitochondrialen Strukturen der HEK293-Zellen ko-lokalisiert (Abb. 4.27). Im Gegensatz dazu konnte das N-terminal mit YFP fusionierte YFP-Hint2 im Zytosol der HEK293-Zellen, nicht aber in deren Mitochondrien nachgewiesen werden (Abb. 4.28). Parallel dazu wurden die Experimente analog mit N- und C-terminal YFP-getagtem Hint3 durchgeführt. Sowohl YFP-Hint3 (Abb. 4.29) als auch Hint3-YFP (Abb. 4.30) wurden hauptsächlich im Zytosol der HEK293-Zellen nachgewiesen. Zur Kontrolle wurden HEK293-Zellen mit YFP-Leervektoren transfiziert, fixiert und mit einem Zeiss LSM510 META fotografiert (Abb. 4.31).

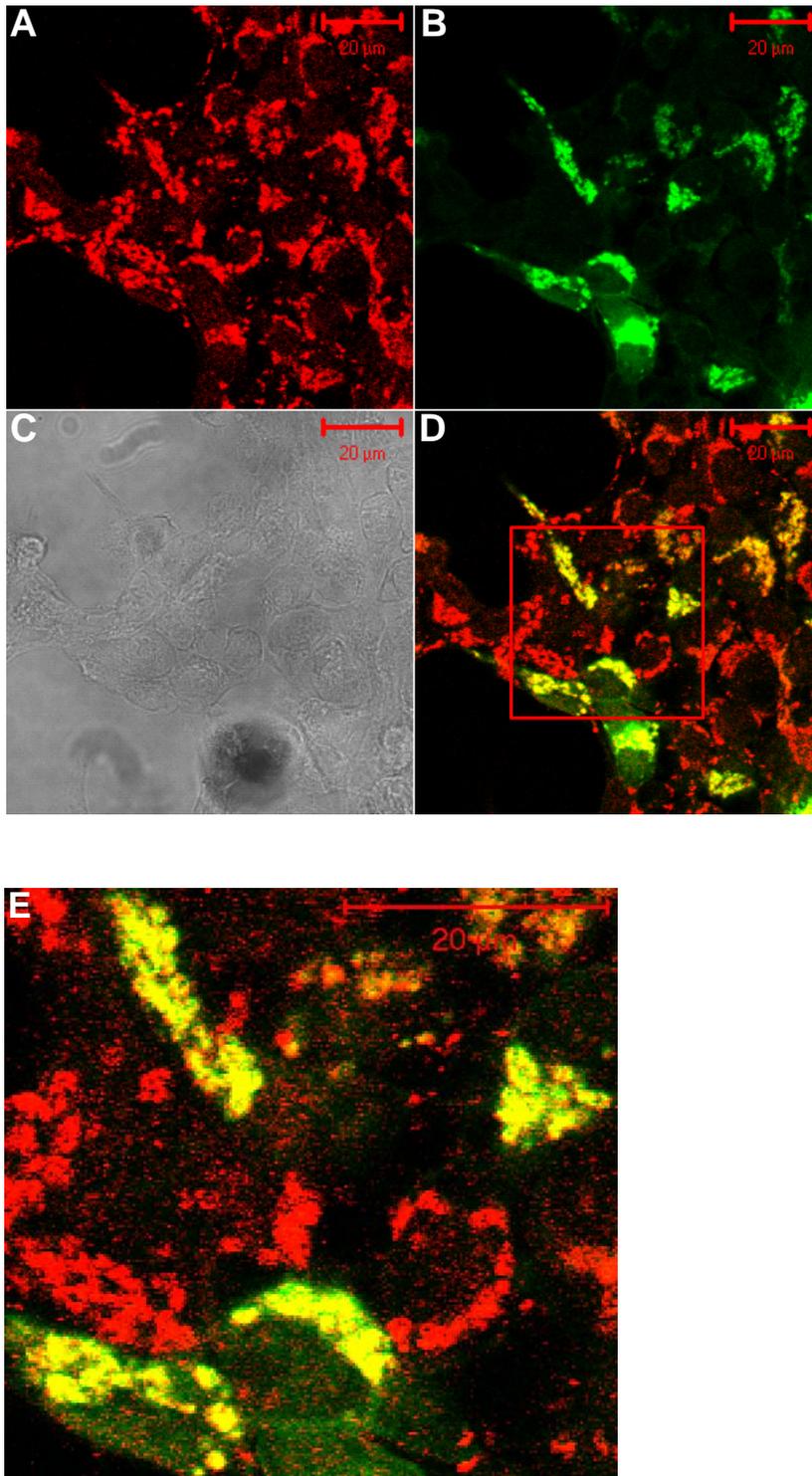


Abb. 4.27: Lokalisation von Hint2-YFP in den Mitochondrien von HEK293-Zellen. Die Zellen wurden mit 2 μg Hint2-YFP transfiziert und nach 48 h mit Methanol fixiert. Danach erfolgte die Anfärbung der Mitochondrien mit dem anti-OxPhos-Complex 4-Antikörper und dem Alexa Fluor™ 594 Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper (jeweils 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, rot). Die Anregung erfolgte bei 543 nm bzw. 514 nm (Hint2-YFP, grün). **A)** Färbung der Mitochondrien. **B)** Hint2-YFP. **C)** Phasenkontrastaufnahme der fixierten Zellen. **D)** Überlagerung der Bilder A) und B), Hint2-YFP ko-lokalisiert mit den mitochondrialen Strukturen (gelb). **E)** Vergrößerung des in D) rot markierten Ausschnittes. Vergrößerung: A), B), C), D) und E) 63x, Scan Zoom 1,4; E) zusätzlich 2x digitaler Zoom.

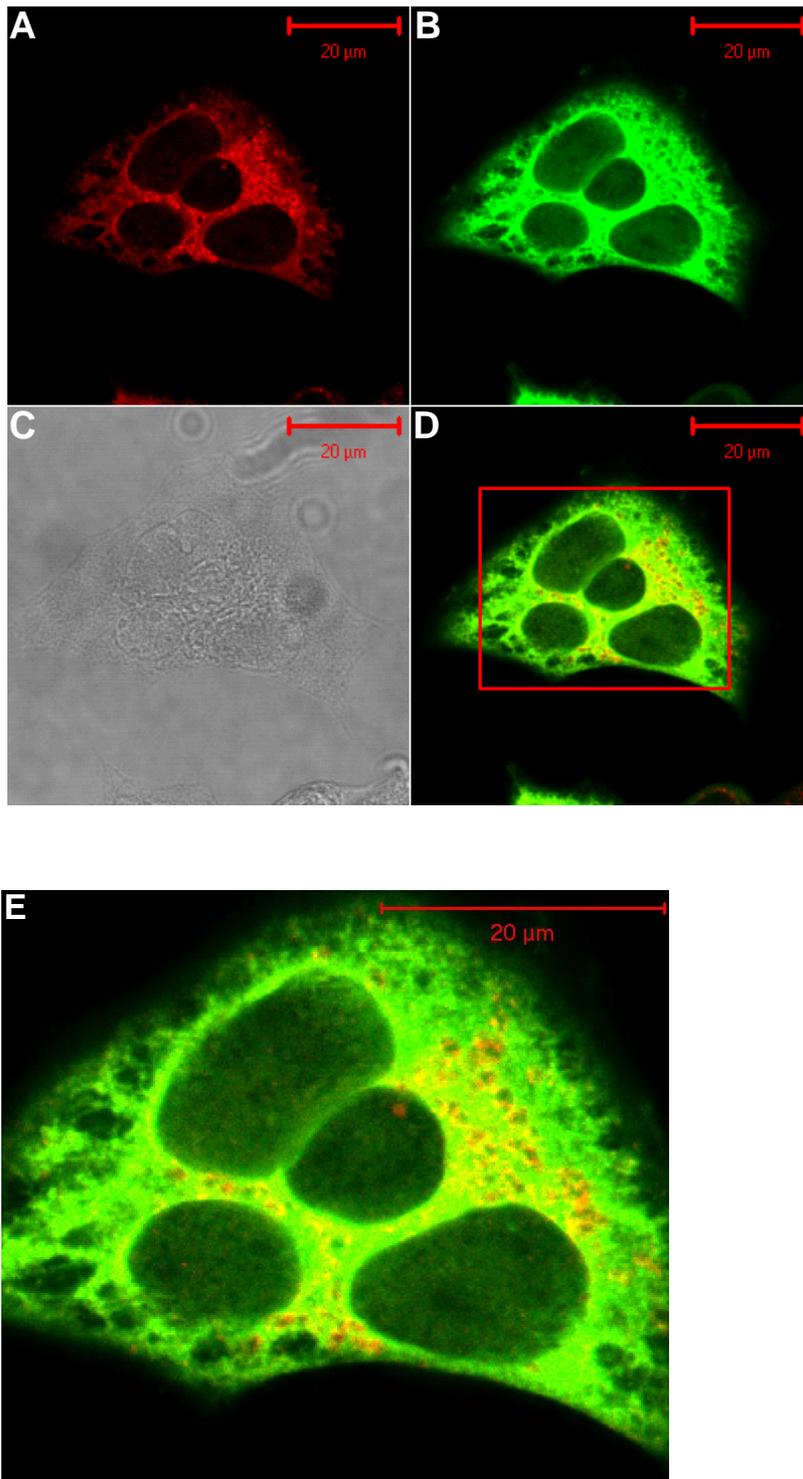


Abb. 4.28: YFP-Hint2 ist nicht in den Mitochondrien von HEK293-Zellen lokalisierbar. HEK293-Zellen wurden mit 2 μg YFP-Hint2 transfiziert. Nach 48 h erfolgten die Fixierung mit Methanol und anschliessend die Anfärbung der Mitochondrien (rot), YFP-Hint2 wurde bei 543 nm detektiert (grün). **A)** Färbung der Mitochondrien. **B)** YFP-Hint2. **C)** Phasenkontrastaufnahme der fixierten Zellen. **D)** Überlagerung der Bilder A) und B), YFP-Hint2 liegt im Zytosol der Zellen vor und kann nur in sehr geringem Ausmaß mit den mitochondrialen Strukturen ko-lokalisiert werden (gelb). **E)** Vergrößerung des in D) rot markierten Ausschnittes. Vergrößerung: A), B), C), D) und E) 63x, Scan-Zoom 2,0; E) zusätzlich 2x digitaler Zoom.

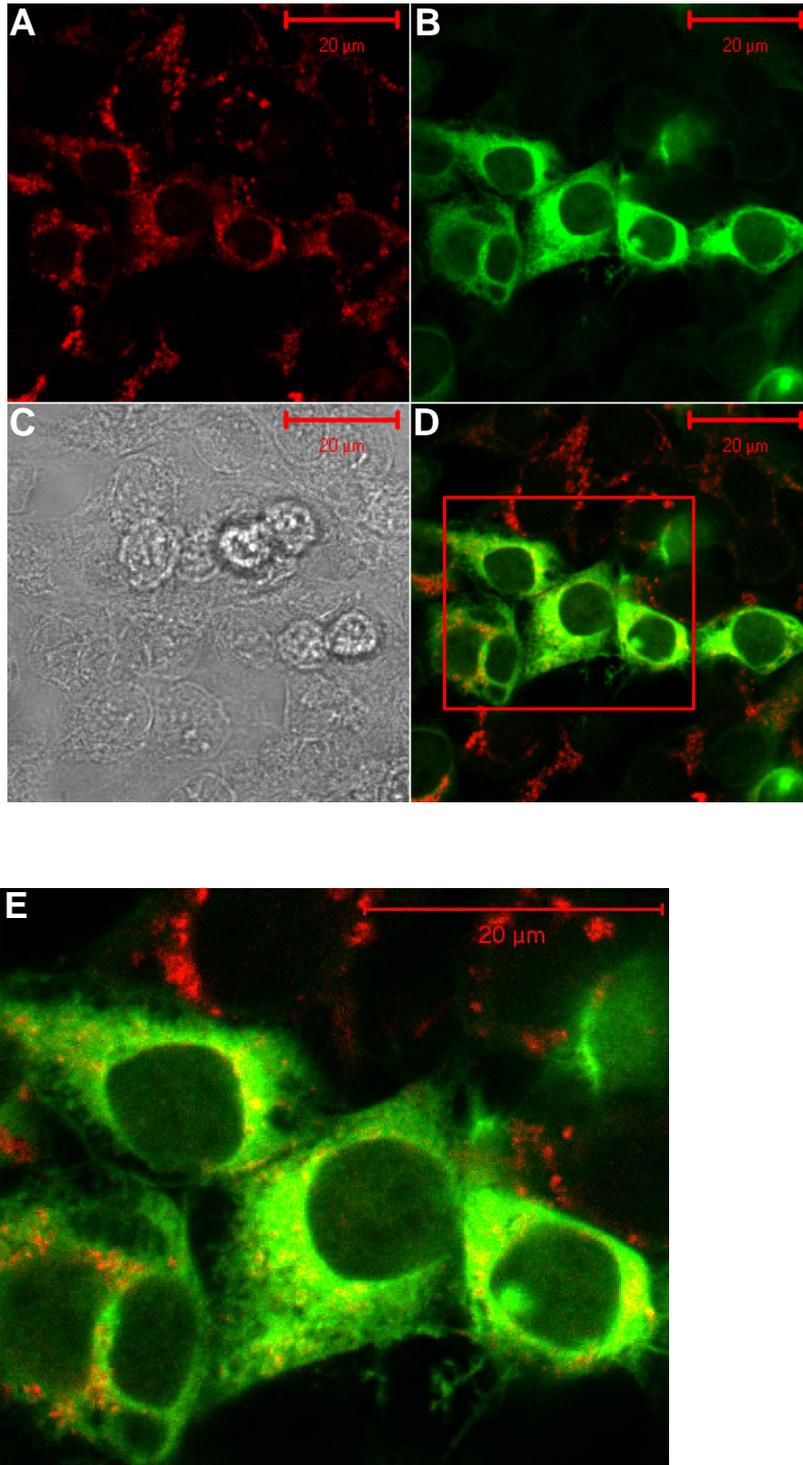


Abb. 4.29: Lokalisation von Hint3-YFP in HEK293-Zellen. Nach Transfektion von 2 μg pcDNA3-Hint3-YFP in HEK293-Zellen wurden die Zellen 48 h später fixiert und die Mitochondrien mit einem anti-OxPhos-Complex 4-Antikörper angefärbt (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Die Analyse erfolgte bei 543 nm und 514 nm. **A)** Färbung der Mitochondrien (rot). **B)** Hint3-YFP (grün). **C)** Phasenkontrastaufnahme der fixierten Zellen. **D)** Überlagerung der Bilder A) und B), Hint3-YFP kann im Zytosol, aber nur sporadisch in den Mitochondrien nachgewiesen werden (gelb). **E)** Vergrößerung des in D) rot markierten Ausschnittes. Vergrößerung: A), B), C), D) und E) 63x, Scan-Zoom 2,0; E) zusätzlich 2x digitaler Zoom.

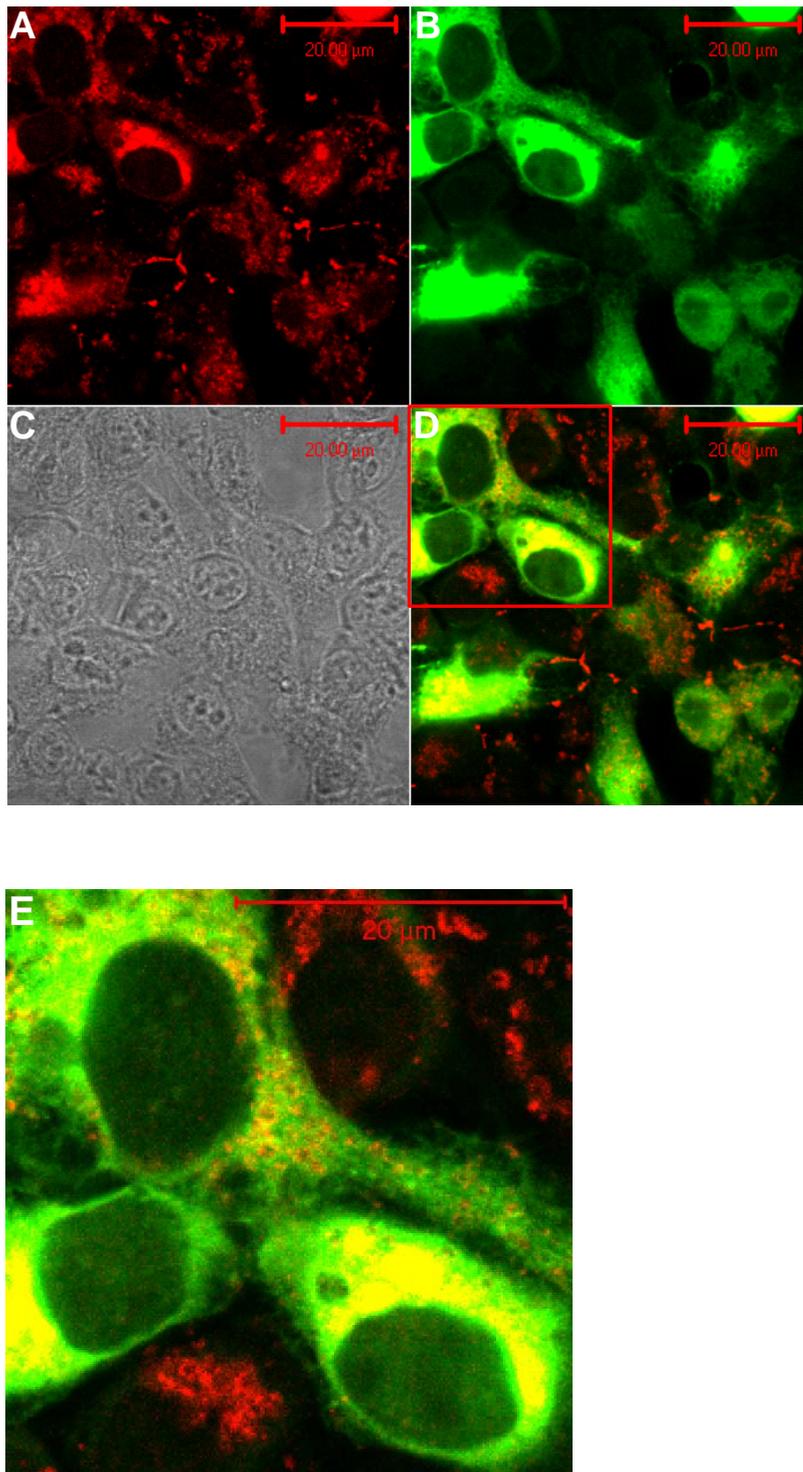


Abb. 4.30: Immunfluoreszenz zum Nachweis von YFP-Hint3 in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit 2 µg pcDNA3-NYFP-Hint3 transfiziert, mit Methanol fixiert und nach Anfärbung der Mitochondrien (s.o.) mit dem konfokalen Mikroskop Zeiss LSM510 Meta fotografiert. **A)** Färbung der Mitochondrien (rot). **B)** YFP-Hint3 (grün). **C)** Phasenkontrastaufnahme der fixierten Zellen. **D)** Überlagerung der Bilder A) und B), N-terminal YFP-getaggttes Hint3 liegt vornehmlich im Zytosol und weniger in den Mitochondrien vor (gelb). **E)** Vergrößerung des in D) rot markierten Ausschnittes. Vergrößerung: A), B), C), D) und E) 63x, Scan-Zoom 2,0; E) zusätzlich 2x digitaler Zoom.

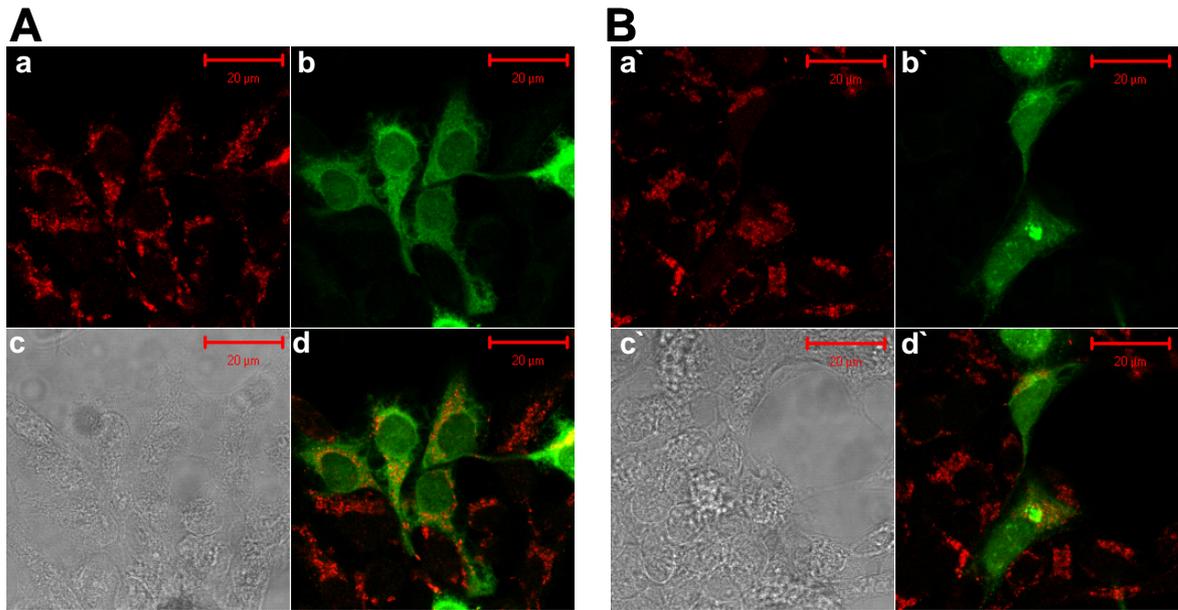


Abb. 4.31: Kontroll-Immunfluoreszenz zum Nachweis der Spezifität der C- und N-terminalen YFP-Konstrukte. Die Zellen wurden mit jeweils 2 μg der pcDNA3-YFP-Leervektoren transfiziert, fixiert und die Mitochondrien mit dem anti-OxPhos-Complex 4-Antikörper angefärbt (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). **A)** HEK293-Zellen transfiziert mit pcDNA3-NYFP (grün). **B)** Transfektion der Zellen mit pcDNA3-YFP (grün). **a, a')** Mitochondrien (rot) **b, b')** pcDNA3-NYFP (grün), **b')** pcDNA3-YFP (grün). **c, c')** Phasenkontrastaufnahmen der fixierten Zellen. **d, d')** Überlagerung der Bilder a) und b) bzw. a') und b'), die Fluoreszenzproteine sind diffus in den fixierten Zellen verteilt und zeigen kein spezifisches Lokalisationsmuster. Vergrößerung: a, a'), b, b'), c, c') und d, d') 63x, Scan Zoom 1,4.

4.8 Interaktion von Hint2 mit β -Catenin

Bisher konnte gezeigt werden, dass Hint2 wie Hint1 und Hint3 ein Homodimer ausbildet und darüber hinaus die Hint-Proteine in der Lage sind Heterodimere auszubilden. Außerdem wurde nachgewiesen, dass Hint2 enzymatisch aktiv und in den Mitochondrien von HEK293-Zellen lokalisiert ist. Da für Hint1 ein transkriptionsregulierender Effekt auf Zielgene des Wnt-Signalweges nachgewiesen werden konnte [Weiske and Huber, 2005], wurde nun untersucht, ob Hint2 auf eine vergleichbare Weise durch Interaktion mit Proteinen des Wnt-Signalweges die Transkription von Wnt-Zielgenen zu beeinflussen vermag.

4.8.1 Immunpräzipitation von Hint2/ β -Catenin-Komplexen aus HEK293-Zelllysaten

Zunächst sollte die Assoziation von Hint2 an β -Catenin als essentielle Komponente der Wnt-Signaltransduktion untersucht werden. Dazu wurden HEK293 Zellen mit pCMV4-Hint2-FLAG und pCS2+ β -CateninS35A-myc₆ transfiziert. Die S35A-Mutation in der Aminosäuresequenz von β -Catenin verhinderte den Abbau des überexprimierten Proteins in den Zellen. Da die Interaktion von Hint1 mit Pontin und Reptin über dessen N-Terminus vermittelt wird [Weiske and Huber, 2005], wurde ein Hint2-Konstrukt mit C-terminalem FLAG-Tag verwendet, um zu vermeiden, dass die N-terminalen Aminosäuren von Hint2 durch den Tag maskiert werden und so die potentielle Interaktion mit β -Catenin verhindert wird.

48 h nach der Transfektion wurden die HEK293-Zellen lysiert und ausgebildete Proteinkomplexe mit spezifischen Antikörpern isoliert, mit Protein A-Sepharose aus den Lysaten präzipitiert und mittels Western Blot analysiert. Die Abbildung 4.32 A zeigt, dass Komplexe aus Hint2 und β -Catenin in HEK293-Zelllysaten vorliegen. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Immunpräzipitation mit anti-FLAG-Antikörper oder anti-myc-Antikörper durchgeführt wurde. In beiden Fällen konnten Komplexe der beiden Proteine aus den Lysaten isoliert werden. Die vor der IP vorgenommene Western Blot-Analyse wies darauf hin, dass Hint2-FLAG und β -CateninS35A-myc₆ in den für die Experimente

verwendeten Zelllysaten vorlagen (Abb. 4.32 B). Der Versuch wurde mit vergleichbarem Ergebnis zweimal reproduziert.

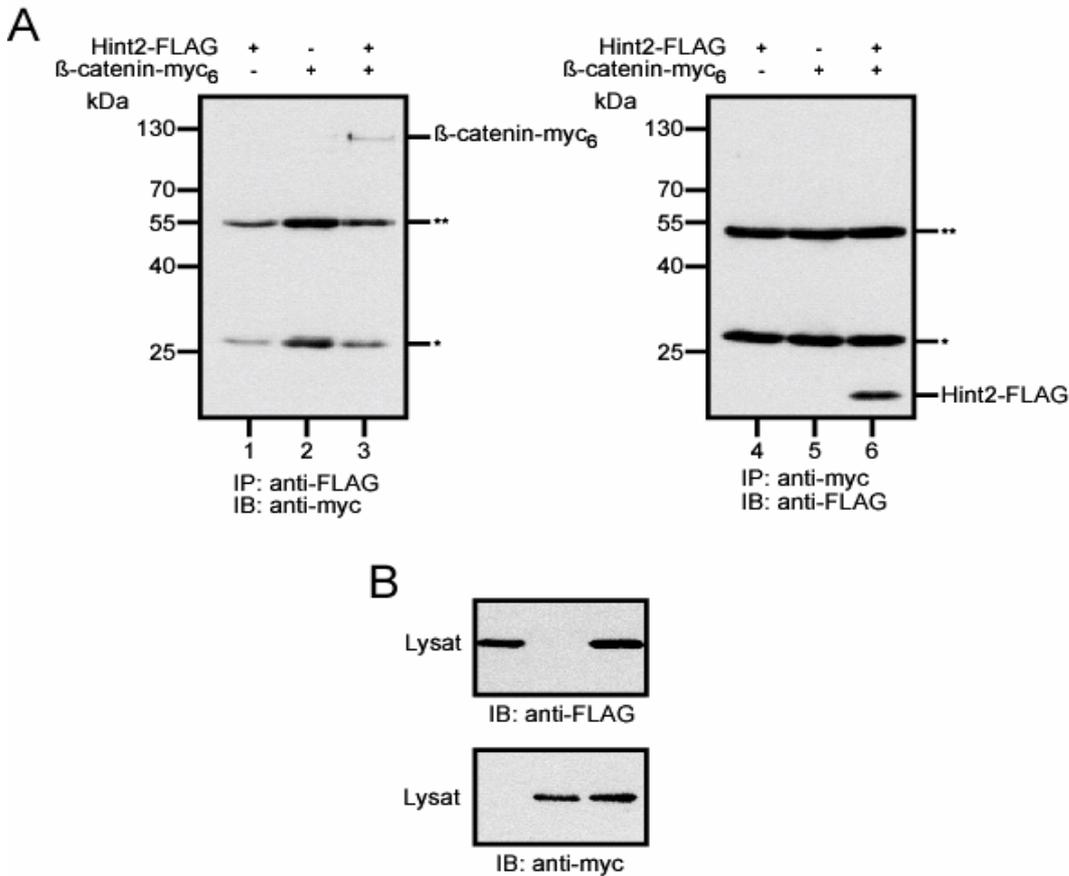


Abb. 4.32: Co-Immunpräzipitation von Hint2-FLAG und β -CateninS35A-myc₆ in HEK293-Zellen. **A)** HEK293-Zellen wurden mit jeweils 2 μ g Expressionsplasmid für Hint2-FLAG und/oder β -CateninS35A-myc₆ transfiziert. Mittels Immunpräzipitation mit 2 μ g anti-FLAG-M2- oder 2 μ g anti-myc-Antikörpern (Klon 9E10) konnten die Komplexe der beiden Proteine isoliert werden (Spur 3 und 6). In den Lysaten der Zellen, die nur mit jeweils einem Plasmid transfiziert wurden, konnten keine Proteine nachgewiesen werden (Spur 1, 2, 4 und 5). **B)** Transfektionskontrolle mit den Lysaten der transfizierten HEK293-Zellen.
* schwere und **leichte Kette des präzipitierenden Antikörpers.

4.8.2 Darstellung endogener Hint2/ β -Catenin-Komplexe

Als nächstes wurde untersucht, ob auch endogenes, nicht überexprimiertes Hint2 und β -Catenin in einem Komplex vorliegen. Da HEK293-Zellen wenig β -Catenin exprimieren, wurden SW480-Kolonkarzinomzellen für diese Experimente benutzt. Die Zellen einer konfluent gewachsenen Schale wurden lysiert, mit 2 μ g des selbst hergestellten anti-Hint2-Antikörpers inkubiert und mit Protein A-Sepharose die durch den Antikörper gebundenen

Proteinkomplexe isoliert. Zur Immundetektion wurde ein monoklonaler anti- β -Catenin-Antikörper verwendet. So konnte gezeigt werden, dass in den SW480-Zellen endogene Komplexe aus Hint2 und β -Catenin vorliegen (Abb. 4.33).

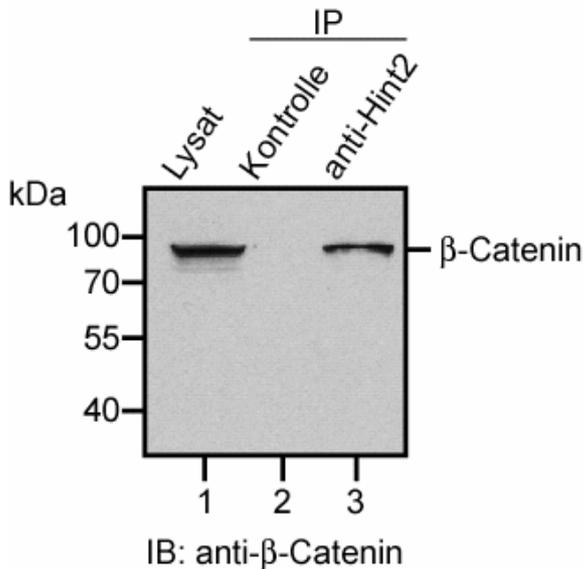


Abb. 4.33: Nachweis endogener Hint2/ β -Catenin-Komplexe.

SW480-Zellen wurden lysiert und 10 μ l des Lysates zum Nachweis des endogenen β -Catenin aufgetragen (Spur 1). Im Präzipitat des anti-Hint2-Antikörpers konnte β -Catenin mit einem monoklonalen anti- β -Catenin-Antikörper (Klon 14, 1 μ g/ml) nachgewiesen werden (Spur 3). In der parallel durchgeführten Kontrolle, die nur Protein A-Sepharose enthielt, ist β -Catenin nicht nachweisbar (Spur 2). Die Abbildung zeigt repräsentativ eines von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

4.8.3 Pull-down mit Proteinen des Wnt-Signalweges und Hint2

Zur weiteren Untersuchung des Hint2/ β -Catenin-Komplexes sollte die direkte Interaktion der beiden rekombinanten Proteine im Pull-down gezeigt werden. Zusätzlich wurden in diesem Experiment die GST-getaggten Proteine Pontin, Reptin, LEF-1 und die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin mit Hint2 inkubiert, um weitere Hinweise auf potenzielle Interaktionen zwischen Hint2 und wichtigen Komponenten des Wnt-Signalweges zu erhalten [Aberle et al., 1996; Bauer et al., 2000]. So konnte die direkte Interaktion von MBP-Hint2 mit β -Catenin, LEF-1 und ECT *in vitro* nachgewiesen werden (Abb. 4.34). Das MBP-getaggte Hint2 assoziierte in diesen Versuchen aber nicht mit GST-Pontin oder GST-Reptin.

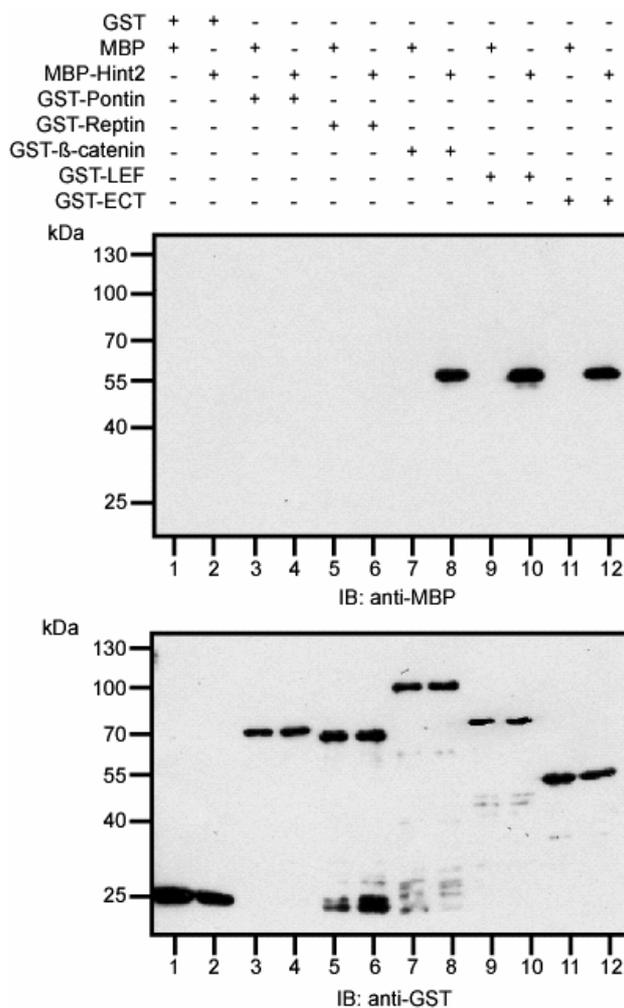


Abb. 4.34: Hint2 bindet direkt an β-Catenin, LEF-1 und ECT. Die Proteine GST, GST-Pontin, GST-Reptin, GST-β-Catenin, GST-LEF-1, GST-ECT, MBP und MBP-Hint2 wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert und jeweils 4 µg für fünf unabhängige Pull-down-Experimente eingesetzt. Entstandene Proteinkomplexe wurden mit GSH-Agarose Beads gefällt und durch Western Blotting mit anti-MBP (0,25 µg/ml)- und anti-GST (0,5 µg/ml)-Antikörpern analysiert. Hint2 interagiert spezifisch mit β-Catenin, LEF-1 und ECT (Spuren 8, 10 und 12). Durch die Kontrollexperimente konnten keine unspezifischen Interaktionen der GST-getaggen Proteine mit MBP nachgewiesen werden (Spuren 3, 5, 7, 9 und 11). Auch eine Assoziation von MBP oder MBP-Hint2 an GST war unter diesen Bedingungen nicht detektierbar (Spur 1).

4.8.4 Hint2 moduliert die Wnt-induzierte Transkription

Mit Hilfe von Reporteranalysen sollte ein erster Einblick erhalten werden, ob die Komplexbildung von Hint2 mit β-Catenin einen Einfluss auf die β-Catenin-vermittelte Transkription ausübt. Dazu wurden jeweils 5×10^5 HEK293-Zellen kultiviert, transfiziert und nach 48 h lysiert. Wenn Hint2 durch Komplexbildung die Bindung von Proteinen an die Wnt-Ziel-Promotoren modulieren würde, dann sollte sich dies in der Expression der in den Reporterkonstrukten kodierten Luziferase widerspiegeln. Die Quantifizierung der aus den durch die Luziferase katalysierten Chemolumineszenzreaktionen emittierten Lichtsignale erfolgte mit Hilfe eines Luminometers.

4.8.4.1 Reprimierung der TCF- β -Catenin-Transkriptionsaktivität durch Hint2

Es sollte untersucht werden, ob Hint2 in der Lage ist, die Aktivität von TCF-4/ β -Catenin-regulierten Promotoren zu beeinflussen. Dazu wurden Reporteranalysen mit den Topflash/Fopflash (pGL3-OT/OF)- und S5/S0-Siamois-Luziferase-Konstrukten durchgeführt. Bei dem pGL3-OT/OF-System handelt es sich um Reporterkonstrukte, bei denen die Transkription des Luziferase-Reportergens durch einen artifiziellen, drei LEF-1/TCF-Bindungsstellen enthaltenden Promoter gesteuert wird (pGL3-OT). Als Kontrolle wird das pGL3-OF-Konstrukt verwendet, in dem die LEF-1/TCF-Bindungsstellen mutiert sind. Im Gegensatz dazu verwendet das Siamois-Luziferase-System den Promoter des endogenen Wnt-Zielgens Siamois aus *Xenopus*, der fünf LEF-1/TCF-Bindungsstellen enthält. In dem S5-Konstrukt sind alle Bindungsstellen vorhanden, in dem S0-Konstrukt sind alle Bindungsstellen mutiert. In diesen Assays konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Hint2 in den mit TCF-4 und β -Catenin transfizierten HEK293-Zellen zu einer dosisabhängigen Inhibierung des pGL3-OT-Reporterkonstruktes führte (Abb. 4.35). In den Kontrollexperimenten mit dem pGL3-OF-Plasmiden konnte keine Aktivität detektiert werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden in den Analysen mit den S5/S0-Siamois-Luziferase-Reporterkonstrukten erzielt (Abb. 4.36).

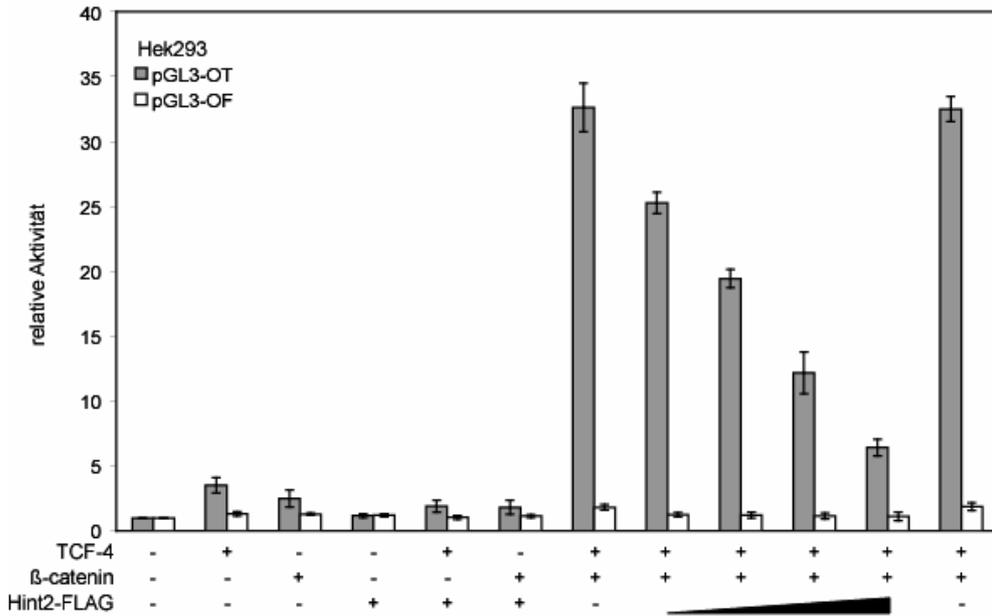


Abb. 4.35: Dosisabhängige Inhibierung der TCF-4- β -Catenin-Aktivität durch Hint2.

HEK293-Zellen wurden in vier unabhängig durchgeführten Experimenten mit TCF-4 (0,5 μ g), β -Catenin (0,5 μ g) und steigenden Mengen (0,5–2,0 μ g) Hint2-FLAG transfiziert. Die relativen Aktivitäten der pGL3-OT/OF (1,0 μ g)-Konstrukte wurden in Doppelbestimmungen gemessen und gemittelt, die Signale der pGL3-OT (1,0 μ g)-Luziferase verringerten sich gegenüber denen der TCF-4 und β -Catenin exprimierenden Zellen dosisabhängig zur transfizierten Menge an Hint2-Plasmid. Bei den parallel durchgeführten Experimenten mit dem pGL3-OF-Kontrollplasmid war kein Effekt detektierbar.

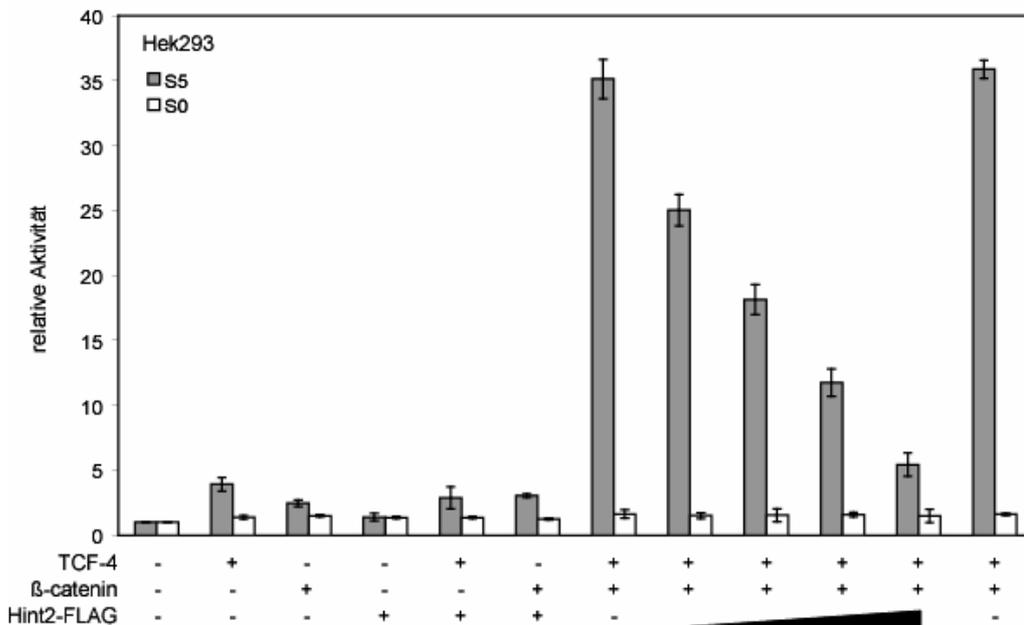


Abb. 4.36: TCF-4- β -Catenin vermittelte Siamois-Luziferaseexpression wird durch Hint2 inhibiert.

In analog durchgeführten Experimenten wurden die S5/S0-Siamois-Luziferase-Reportergenkonstrukte (1,0 μ g) transfiziert. Auch hier konnte der reprimierende Effekt von Hint2 abhängig von der Menge transfizierter Hint2 Plasmid-DNA (0,5 – 2,0 μ g) bestätigt werden.

4.8.4.2 Hint2 beeinflusst nicht die durch LEF-VP16 aktivierte Transkription

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Hint2 einen reprimierenden Effekt auf die TCF-4- β -Catenin-regulierte Luziferaseaktivität ausübt, sollte nun untersucht werden, ob diese Wirkung von β -Catenin abhängig ist. Dazu wurden HEK293-Zellen mit LEF-VP16-Konstrukten transfiziert, in denen die LEF-1-Sequenz direkt mit der transkriptionsaktivierenden Domäne des *Herpes simplex*-Virusprotein VP16 verknüpft ist. Dadurch wird die Transkription von Zielgenen konstitutiv und unabhängig von β -Catenin induziert. Bei diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Hint2 die durch LEF-VP16 induzierte Aktivität des S5-Siamois-Luziferase-Promotors nicht reprimiert (Abb. 4.37). Das als Kontrolle verwendete Δ N-LEF-1-Plasmid mit der fehlenden β -Catenin-Bindungsstelle zeigte keine Transkriptionsinduktion und wurde nicht durch das co-exprimierte Hint2 beeinflusst. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass β -Catenin für den in den vorherigen Experimenten (vgl. 4.8.4.1) festgestellten unterdrückenden Effekt von Hint2 auf den TCF-4/ β -Catenin-regulierten Promotor wichtig ist.

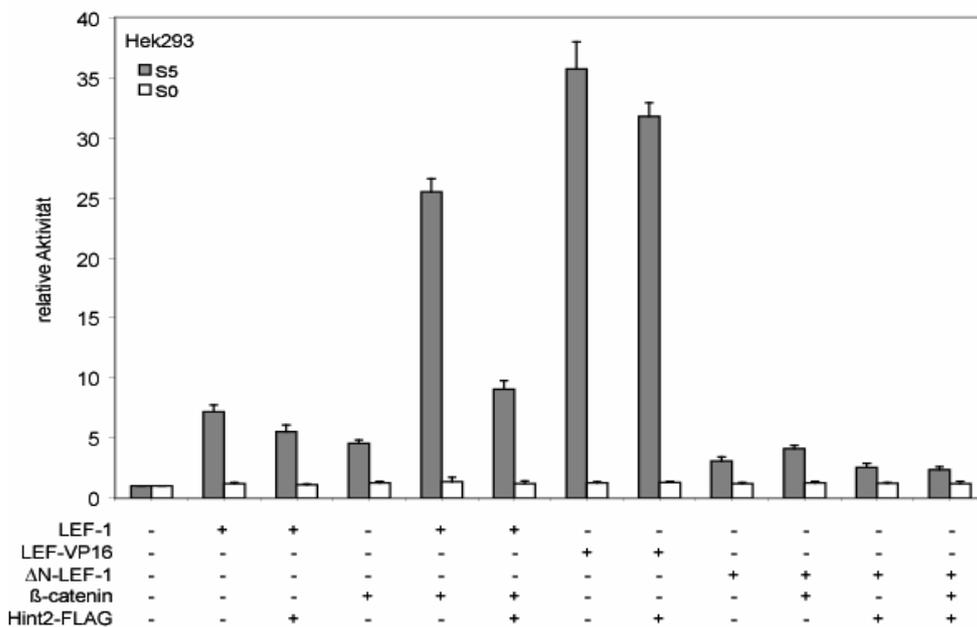


Abb. 4.37: Die LEF-VP16-vermittelte Transkriptionsaktivierung wird nicht durch Hint2 reprimiert. 5 x 10⁵ HEK293-Zellen wurden mit LEF-1, LEF-VP16 und Δ N-LEF-1 (jeweils 1,0 μ g) transfiziert. Hint2 (1,0 μ g) verringerte die relative Aktivität des S5-Siamois-Luziferasepromotors nur bei Co-Transfektion von LEF-1 und β -Catenin (0,5 μ g), aber nur geringfügig bei Co-Transfektion mit LEF-VP16. Das Δ N-LEF-1-Konstrukt zeigte keinen Effekt, geringe Anstiege der relativen Aktivitäten in den Kontrollen sind auf endogen vorhandenes β -Catenin zurück zu führen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus den Doppelbestimmungen vier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente.

4.8.4.3 Dosisabhängige Induktion des Cyclin D1-Promotors durch Hint2

In den in diesem Kapitel beschriebenen Reporteranalysen konnte gezeigt werden, dass Hint2 die Aktivität von TCF- β -Catenin-regulierten Promotoren inhibiert und dieser Effekt von β -Catenin abhängig ist. Um herauszufinden, ob dieses reprimierende Verhalten auch für weitere endogene LEF-1/TCF- β -Catenin-regulierte Zielgene zutrifft, wurden Cyclin D1-Luciferase Reporterassays durchgeführt. Interessanterweise war in diesen Experimenten eine Induktion des Cyclin D1-Wildtyp-Promotors nachweisbar, wobei die Expression des Zielgens mit steigenden Mengen von Hint2 zunahm. In Kontrollen mit einem Reporterkonstrukt mit mutierten TCF-4-Bindungsstellen wurde die Aktivität der Cyclin D1-Luciferase-Konstrukte nicht beeinflusst (s. Abb. 4.38).

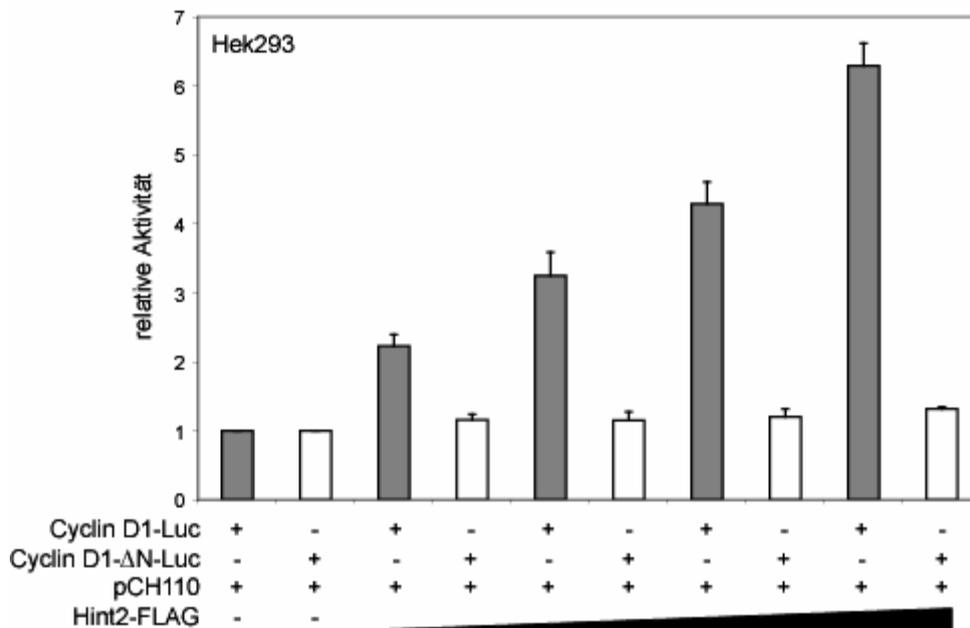


Abb. 4.38: Die Aktivität des Cyclin D1-Promotors wird von Hint2 dosisabhängig induziert. 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 μ g pCMV4-Hint2-FLAG wurden in 5×10^5 HEK293-Zellen transfiziert. Die Cyclin D1-Luc-Aktivität stieg im Vergleich zu der des Cyclin D1- Δ N-Luc-Konstrukts proportional zur transfizierten Menge Hint2-DNA. Von beiden Luziferase-Plasmiden wurde jeweils 1,0 μ g eingesetzt. Die Grafik zeigt die repräsentativen Mittelwerte aus vier Analysen, die Werte wurden in Doppelbestimmungen ermittelt. β -Galactosidase (pCH110, 0,1 μ g) diente als interner Standard zur Normalisierung der Transfektionseffizienz.