

5 Diskussion

Humanes Hint2 wird zusammen mit den homologen Proteinen Hint1, Hint3, Aprataxin und DcpS dem Hint-Zweig der Superfamilie der Histidin-Triaden (HIT)-Proteine zugeordnet. Hint1 ist der bislang am besten charakterisierte Vertreter dieser Gruppierung von Enzymen, deren aktives Zentrum durch das Aminosäuremotiv His-X-His-X-His-XX (X = hydrophobe AS) charakterisiert wird [Seraphin, 1992]. Aufgrund intrafamiliärer struktureller Ähnlichkeiten wurden die Proteine auf drei Zweige aufgeteilt, dem Hint-, Fhit- und GalT-Zweig [Brenner, 2002]. Analog zu Fhit bildet Hint1 über eine α -Helix im C-terminalen Bereich ein Homodimer und zeigt eine Hydrolaseaktivität gegenüber Substraten, die sich allgemein als AMP-X-Verbindungen bezeichnen lassen [Lima et al., 1997; Brenner, 2002]. Bis heute existieren verschiedenste Untersuchungen, die Aufschluss über die zelluläre Funktion von Hint1 als transkriptionsregulierendes Protein geben [Korsisaari et Mäkelä, 2000; Bieganski et al., 2002; Korsisaari et al., 2003; Lee et al., 2004]. Hint1-Knockout-Mäuse lieferten die ersten Anzeichen für eine Tumorsuppressor-Wirkung eines Hint-Subfamilien-Proteins, jedoch bestehen Unterschiede zum verwandten Protein Fhit [Li et al., 2005]. In diesem Zusammenhang sind die Interaktion von Hint1 mit Komponenten des Wnt-Signalweges, die eine Inhibition der TCF- β -Catenin-vermittelten Transkriptionsaktivität bewirkt [Weiske et Huber, 2005] und die erst kürzlich entdeckte Apoptoseinduktion in Tumorzellen durch Hint1 [Weiske and Huber, 2006] von besonderem Interesse. Nach der Fertigstellung der in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden Ergebnisse veröffentlicht, die Hint2 als mitochondrialen Apoptose-„Sensitizer“ beschreiben, dessen Expression in hepatozellulären Karzinomzellen reduziert ist [Martin et al., 2006]. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen und die bisherigen Erkenntnisse über die Hint2-homologen Proteine werden im Folgenden mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten verglichen.

5.1 Hint2 bildet homodimere Komplexe und ist ein mitochondriales Protein

Die für Hint1 beschriebene Ausbildung eines Homodimers [Lima et al., 1997] konnte für Hint2 ebenfalls nachgewiesen werden. Rekombinant exprimiertes GST- und MBP-Hint2 bildeten in *in vitro*-Pull-down-Assays homomere Proteinkomplexe aus, die die direkte

Interaktion der Hint2-Fusionsproteine zeigten. Durch Co-Immünpräzipitationen ließen sich auch Hint2-Homodimere in Zelllysaten nachweisen. Zwar wurde Hint2 in den Mitochondrien (s.u.) lokalisiert, der in den hier beschriebenen Untersuchungen verwendete Lysepuffer enthielt jedoch ein Detergens, das die Zellbestandteile und somit auch mitochondriale Strukturen auflöst. Es kann deshalb keine Aussage darüber gemacht werden, aus welchen Zellorganellen die aus dem Zelllysate isolierten Hint2-Proteinkomplexe stammen. Zur weiteren Absicherung dieser Untersuchungen wurden HeLa-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die zu einer Überexpression von Hint2 mit N-terminal fusioniertem CFP und YFP führten. Bei diesen Experimenten war es möglich, mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie CFP- und YFP-Hint2 in den gleichen Kompartimenten der Tumorzellen zu lokalisieren. Nachdem Färbungen von endogenem Hint2 eine potenzielle Lokalisation in Organellen vermuten ließen und Sequenzanalysen einen Hinweis auf eine mögliche mitochondriale Lokalisation ergaben, konnte mit Hilfe von konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass C-terminal mit YFP getaggtes Hint2 in den Mitochondrien von HEK293-Zellen lokalisiert ist. Wurden Fusionsproteine für diese Experimente verwendet, bei denen Hint2 N-terminal an YFP fusioniert ist, wurde Hint2 im Zytosol nachgewiesen. Vergleichbare Ergebnisse wurden kürzlich von Martin et al. veröffentlicht, die Untersuchungen mit Hint2-GFP und GFP-Hint2 durchgeführt haben [Martin et al., 2006]. Es ist davon auszugehen, dass YFP das N-terminale Lokalisationssignal des Hint2-Proteins maskiert und deshalb keine Aufnahme in die Mitochondrien erfolgen kann. Somit ist erklärbar, warum CFP- und YFP-Hint2 sowohl im Zytosol als auch im Zellkern lokalisiert wurden. Des Weiteren würde sich das Vorliegen von Hint2-Homodimeren *in vivo* im Zellkern und im Zytosol damit erklären lassen, dass vom Hint2-Protein Splice-Varianten existieren, bei denen das Protein ohne die mitochondriale Lokalisationssequenz exprimiert wird. Erste Hinweise auf die Existenz solcher Splice-Varianten von Hint2 liegen in unserer Arbeitsgruppe vor.

Anhand von Röntgenstrukturanalysen wurde 1997 festgestellt, dass C-terminale Aminosäuren im Hint1-Protein eine α -Helix ausbilden, die die Homodimerisierung des Proteins vermitteln [Lima et al., 1996]. Zur Analyse der Dimerisierung des Hint2-Homodimers wurden die Sequenzen von humanem Hint1 und Hint2 verglichen und Deletionskonstrukte von Hint2 hergestellt. Diese Versuche brachten den Nachweis, dass Hint2 analog zu Hint1 über seinen C-Terminus homodimerisiert.

5.2 Hint2 heterodimerisiert mit Hint1 und Hint3

Da Hint2 zu Hint1 aus der Maus (*Mus musculus*) eine 61,3 %-ige Identität zeigt und Hint1 und Hint3 zu 21,3 % identisch sind, wurde 2003 untersucht, ob eine funktionelle Redundanz der Proteine bei Hint1-knockout-Mäusen zu beobachten ist [Korsisaari et al., 2003]. Allerdings konnten die Autoren nicht nachweisen, dass der Verlust von Hint1 durch Hint2 und/oder Hint3 kompensiert wird [Korsisaari et al., 2003]. Die Frage nach der Bedeutung von Hint2 und Hint3 konnte mit diesem Ansatz nicht erklärt werden. Im Rahmen der kürzlich veröffentlichten Ergebnisse wurde beschrieben, dass *Homo sapiens* Hint2 eine 61%-ige Identität zu *Homo sapiens* Hint1 aufweist [Martin et al., 2006]. Die strukturelle Ähnlichkeit der Proteine könnte die Ausbildung von Heterodimeren ermöglichen. Die Heterodimerisierung konnte in Pull-down-Experimenten mit GST-Hint2 und MBP-Hint1 sowie MBP-Hint3 gezeigt werden. Die Beobachtungen konnten durch Immunpräzipitationsexperimente in HEK293-Zellen bestätigt werden. Da Hint1 sowohl im Zytosol als auch im Kern von eukaryotischen Zellen lokalisiert wurde [Brenner, 2002], wäre eine Ausbildung von Proteinkomplexen mit ebenfalls im Zytosol vorliegendem Hint2 möglich (vgl. 5.1). Da im Rahmen der in dieser Arbeit beschriebenen Immunfluoreszenzuntersuchungen festgestellt werden konnte, dass Hint3 unabhängig von der Position des fusionierten YFP hauptsächlich im Zytosol von HEK293-Zellen vorliegt, wäre auch die Heterodimerisierung von Hint2 und Hint3 denkbar.

Im Hint1-Molekül konnte 1996 der C-terminale Aminosäurebereich als Dimerisierungsmodul identifiziert werden [Lima et al., 1996]. In dieser Arbeit konnte ebenfalls der C-Terminus von Hint2 als homodimerisierende Teilstruktur nachgewiesen werden (vgl. 5.1). Als logische Folgerung aus diesen und den oben beschriebenen Ergebnissen ergibt sich die Frage, über welchen Abschnitt des Hint2-Proteins die Bildung der Heterodimere vermittelt wird. Aufgrund der hohen Aminosäuresequenzhomologie lag wiederum die Vermutung nahe, dass der C-Terminus von Hint2 für die Heterodimerisierung verantwortlich ist. In der Tat konnte dies in Pull-down-Assays mit Hint1, Hint3 und Hint2-Deletionskonstrukten gezeigt werden. Zusammengefasst geben diese Ergebnisse Hinweise darauf, dass über die Aminosäuren im C-terminalen Bereich von Hint2 einerseits die Ausbildung des Homodimers und andererseits die Bindung an Hint1 und Hint3 zur Heterodimerisierung erfolgt. Das könnte bedeuten, dass die N-Termini der homo- und heterodimerisierenden Hint-Proteine für die Interaktion mit anderen Proteinen oder für unterschiedliche Funktionen in den Zellen zur Verfügung

stehen. In Übereinstimmung damit wurde gezeigt, dass die Interaktion von Hint1 mit Pontin und Reptin über dessen N-terminale Aminosäuren verläuft [Weiske and Huber, 2005]. Im N-Terminus von Hint2, der 35 Aminosäuren länger als der N-Terminus von Hint1 ist, ist das mitochondriale Lokalisationssignal lokalisiert [Martin et al., 2006]. Hint3 unterscheidet sich sowohl im N- als auch im C-Terminus von denen der anderen beiden Hint-Proteine, allerdings ist über die zelluläre Funktion von Hint3 bisher nichts bekannt (vgl. 1.1.3.1).

5.3 Untersuchungen zu Hint1 und Hint3

Da Hint2 mit Hint1 und Hint3 heterodimerisiert, sollte nun in ähnlichen Experimenten mit Hint1 und Hint3 potenzielle Interaktionen untersucht werden. Es zeigte sich, dass GST-Hint3 sowohl mit MBP-Hint1 als auch mit MBP-Hint3 interagiert. Zur weiteren Bestätigung dieser Befunde wurden die heterodimere Komplexbildung von Hint1 und Hint3 und ebenso die homodimere Interaktion von Hint3 mittels Immunpräzipitation in HEK293-Zellen nachgewiesen. Diese Ergebnisse untermauern die oben beschriebene Theorie dahin gehend, dass Hint3 analog zu Hint1 und Hint2 homodimerisiert und die Möglichkeit zur Heterodimerisierung nicht auf Hint2 beschränkt ist, obwohl Hint2 eine weitaus höhere Homologie zu Hint1 aufweist als Hint3. Aufgrund der bevorzugten Lokalisation von YFP-getagten Hint3-Proteinen im Zytosol der Zelle ist eine physiologisch relevante Heterodimerisierung wahrscheinlich. Eine weitere Aufklärung der Funktion von Hint3 in eukaryotischen Zellen ist allerdings erforderlich, um eine Aussage über die Funktion der Heterodimerisierung mit Hint1 und Hint2 machen zu können.

5.4 Hint2 ist eine AMP-NH₂-Hydrolase

Bei den Mitgliedern der HIT-Proteinfamilie handelt es sich um Nukleotid-Hydrolasen und Nukleotid-Transferasen. In der Literatur sind bereits viele Substrate beschrieben worden [Brenner, 2002]. So konnte das Tumorsuppressorprotein Fhit als Ap₃A- und Ap₄A-Hydrolase identifiziert werden [Lima et al., 1997]. Das Hint1-homologe Protein Aprataxin hydrolysiert sowohl AMA als auch Ap₄A [Seidle et al., 2005]. Hint1 ist eine AMP-NH₂-Hydrolase, die darüber hinaus *in vitro* mehrere Nukleotide bindet, darunter AMP, ADP und die Diadenosin-Polyphosphate Ap₃A und Ap₄A [Lima et al., 1997; Bieganowski et al., 2002]. Seit kurzem ist über Hint2 bekannt, dass es AMP-para-Nitroanilin (AMP-pNA) hydrolysieren kann [Martin et al., 2006]. Wurde dieses Substrat mit Hint2-H149N inkubiert, konnte keine Hydrolaseaktivität mehr festgestellt werden [Martin et al., 2006]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun erstmalig nachgewiesen, dass rekombinantes Hint2 AMA zu AMP hydrolysieren kann. Das rekombinante Hint2-Protein wurde hinsichtlich seiner enzymatischen Aktivität genauer charakterisiert. So konnte gezeigt werden, dass Zink-Ionen die enzymatische Aktivität im Vergleich zu Magnesium-Ionen hemmen. Dafür könnte die bei Untersuchungen mit Hint1 beschriebene Beeinflussung der Proteinstruktur durch Zink-Ionen verantwortlich sein [Pearson et al., 1990; Mozier et al., 1991; Brenner et al., 1999]. Als pH-Optimum für die enzymatische Hydrolyse von AMA zu AMP wurde in den durchgeführten Untersuchungen der pH 5,5 bestimmt, bei diesem pH wurden auch der K_m- und der k_{cat}-Wert für Hint2 mit 28,3 μM bzw. 0,0067 s⁻¹ ermittelt. Martin et al. beschreiben in ihren Untersuchungen mit AMP-pNA als Substrat für Hint2 einen K_m-Wert von 128 μM und einen k_{cat}-Wert von 0,0223 s⁻¹ [Martin et al., 2006]. Der in dieser Arbeit bestimmte K_m-Wert ist niedriger als der von Martin et al. beschriebene und gibt somit eine höhere Substratspezifität von Hint2 für AMA als für AMP-pNA an. Der Grund hierfür könnte sein, dass AMA im Gegensatz zu AMP-pNA ein natürlich vorkommendes Substrat ist [Fankhauser et al., 1981]. AMP-pNA wurde von den Autoren bei früheren Untersuchungen aus experimentellen Gründen synthetisiert [Krakowiak et al., 2004]. Der in dieser Arbeit dargestellte k_{cat}-Wert, der die pro Sekunde durch das Enzym umgesetzte Zahl an Substratmolekülen angibt, ist ebenfalls niedriger als der von Martin et al. bestimmte Wert. Ein Vergleich der k_{cat}-Werte ist allerdings aufgrund der unterschiedlichen und nur zum Teil bekannten experimentellen Bedingungen schwierig. Betrachtet man die in der Literatur beschriebenen Werte für Hint1, so fällt auf, dass es sich bei den charakterisierten Enzymen um Kaninchen- und Hefe-Hint1 handelt, die mit Hilfe von

radioaktiv markierten Substraten untersucht wurden. Die für Aprataxin ermittelten Werte sind den Hint2-Werten ähnlich, allerdings wurden diese Daten für ein anderes Substrat bestimmt.

Weiterhin zeigen bisherige Untersuchungen zu einigen HIT-Proteinen, dass diese als enzymatisch aktive Homodimere vorliegen. Im speziellen konnte dieses Phänomen anhand von Kristallstrukturanalysen für Fhit und Hint1 bestätigt werden [Pace et al., 1998; Lima et al., 1996]. Für die nun folgenden Untersuchungen wurden enzymatische Mutanten von Hint2 generiert, deren Aktivität mit dem Wildtyp-Enzym verglichen werden sollte. Dazu sollte im Vorfeld der Nachweis erbracht werden, dass auch die mutierten Enzyme in der Lage sind, zu homodimerisieren und gezeigt werden, dass eine eventuelle Beeinflussung der Hydrolaseaktivität nicht auf die unterbleibende Dimerisierung des Enzyms zurückzuführen ist. Das Hint2-Wildtyp-Enzym und die Hint2-H149N-Mutante wurden mittels Gelfiltration analysiert und nachgewiesen, dass beide Proteine homodimere Komplexe ausbilden können.

Bei der Beschreibung von Hint1-Proteinen mit mutierten Aminosäuren konzentrierten sich die Autoren zunächst auf das mittlere Histidin der Histidin-Triade [Bieganowski et al., 2002] und in späteren Arbeiten zusätzlich auf das dem aktiven Zentrum benachbarte Serin [Krakowiak et al., 2004]. Martin et al. fanden heraus, dass Hint2-H149N das Substrat AMP-pNA nicht hydrolisieren kann [Martin et al., 2006]. Angelehnt an diese Ergebnisse wurden die Hint2-Mutanten S144A, H147N, H149N und H151N generiert, um ähnliche Untersuchungen durchführen zu können. Die Proteine Hint2-H147N und Hint2-H149N zeigten keine Hydrolaseaktivität mehr, wohingegen Hint2-S144A eine im Vergleich zum Wildtyp-Hint2 nur geringfügig verminderte Aktivität zeigte. Wesentlich weniger AMP wurde durch die Hint2-H151N-Mutante gebildet. Diese Erkenntnisse stimmen mit den für Hint1 und den kürzlich für Hint2 veröffentlichten Daten überein. In dieser Arbeit konnte aber erstmalig beobachtet werden, dass die Mutation des ersten Histidins analog zur Mutation der mittleren Aminosäure der Triade zu einem totalen Verlust der Enzymaktivität unter den hier verwendeten Bedingungen führte. Ebenso neu ist der Nachweis einer Restaktivität beim Austausch des letzten Histidins der Triade. Dieser Befund lässt vermuten, dass das dritte Histidin gegenüber den anderen beiden Histidinen eine untergeordnete Rolle bei der Hydrolasereaktion spielt. Diese Hinweise sind vor allem vor dem Hintergrund interessant, dass Hint2-überexprimierende HepG2-Leberkrebszellen bei Apoptosestimulation signifikant höher sensibilisiert waren als HepG2-Leberkrebszellen, die Hint2-H149N überexprimierten [Martin et al., 2006]. Diese Ergebnisse stehen im

Gegensatz zu dem bislang ungeklärten Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und physiologischer Funktion der Hint2-verwandten Tumorsuppressor Proteine Fhit und Hint1. Beide Proteine behalten ihre apoptotische Wirkung bei, wenn das mittlere Histidin mutiert wurde und keine enzymatische Aktivität mehr nachweisbar ist [Siprashvili et al., 1997; Weiske and Huber, 2006]. Bei der Charakterisierung des Hint2-homologen Proteins Aprataxin wurde allerdings herausgefunden, dass enzymatisch inaktive Mutanten mit dem Krankheitsbild der AOA1 einhergehen [Seidle et al., 2005; Kijas et al., 2006]. Diese Ergebnisse geben Anlass zu der Vermutung, dass der Zusammenhang zwischen der enzymatischen Aktivität und der physiologischen Funktion der einzelnen HIT-Proteine unterschiedlich sein kann.

5.5 Hint2 interagiert mit β -Catenin

Nachdem in dieser Arbeit zunächst intrafamiliäre Protein-Protein-Interaktionen und die enzymatische Aktivität von Hint2 charakterisiert wurden, sollten nun Untersuchungen zu seiner möglichen zellulären Funktion durchgeführt werden. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Hint1 mit Pontin und Reptin, zwei Komponenten des Wnt-Signalweges interagiert und die TCF- β -Catenin-vermittelte Transkriptionsaktivität inhibiert [Weiske and Huber, 2005]. Zudem führt die Transfektion von Hint1 in Tumorzellen zur Induktion der Apoptose [Weiske and Huber, 2006]. Diese Befunde waren besonders vor dem Hintergrund interessant, dass einerseits eine Fehlregulation des Wnt-Signalweges in Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren steht [Giles et al., 2003] und andererseits Hint1 eine Tumorsuppressoraktivität bei Mäusen zugeschrieben wurde [Li et al., 2005]. Hint2 wurde kürzlich als Apoptose-sensibilisierendes Protein in Leberkrebszellen beschrieben [Martin et al., 2006]. Die im Folgenden dargestellten Untersuchungen konzentrierten sich auf die Interaktion zwischen Hint2 und β -Catenin, einer essentiellen Komponente des Wnt-Signalweges.

Im ersten Schritt wurden HEK293-Zellen für Immunpräzipitationsexperimente mit pCMV4-Hint2-FLAG und pCS2+ β -CateninS35A-myc₆ transfiziert. Im Gegensatz zu den bisherigen Präzipitationsexperimenten wurde nun ein Hint2-Konstrukt in den Zellen überexprimiert, das einen C-terminalen FLAG-Tag aufwies. Diese Veränderung wurde als Folge aus der Entdeckung vorgenommen, dass Hint1 über seine N-terminalen Aminosäuren mit Pontin und Reptin interagiert [Weiske et Huber, 2005]. Da die bisher in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse eine strukturelle Homologie von Hint2 zu Hint1 vermuten lassen, sollte bei den Immunpräzipitationen eine Maskierung des N-Terminus und damit eine Protein-Protein-Interaktions-einschränkende Wirkung durch den fällenden Antikörper verhindert werden. Die S35A-Mutation im β -Catenin-Molekül verhinderte die Phosphorylierung und Degradierung des überexprimierten Proteins in den HEK293-Zellen. Die Immunpräzipitationen zeigten erstmalig, dass Hint2 an β -Catenin binden kann. Als weitere Bestätigung dieser Beobachtung konnten im nächsten Schritt in SW480-Tumorzellen, die durch eine Mutation im APC-Gen β -Catenin akkumulieren, endogene Proteinkomplexe aus Hint2 und β -Catenin nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass Hint2 und β -Catenin in Multiproteinkomplexen vorliegen und nicht direkt aneinander binden, wurden Pull-down-Assoziationstests durchgeführt. So wurde die direkte

Interaktion von Hint2 mit β -Catenin nachgewiesen. Es kann davon ausgegangen werden, dass Hint2-FLAG ebenso in die Mitochondrien transloziert wie Hint2-YFP. In epithelialen Dünndarmzellen wurde beschrieben, dass nach der Stimulation durch Leukotrien D4 (LTD4) β -Catenin in den Zellen akkumuliert und in die Mitochondrien importiert wird [Mezhybovska et al., 2006]. Eine Interaktion von Hint2 und β -Catenin wäre *in vivo* in den Mitochondrien möglich, eventuell vorliegende Komplexe aus Hint2 und β -Catenin im Zytosol und/oder Zellkern könnten auf der Existenz von Splice-Varianten von Hint2 beruhen (vgl. 5.1). Um einen endgültigen Beweis für eine Komplexbildung von β -Catenin und Hint2 in Mitochondrien zu führen, müssten die beschriebenen Immunpräzipitationen an Lysaten von isolierten Mitochondrien und an zytosolischen Fraktionen durchgeführt werden.

Es ist bekannt, dass nach der Stimulierung von Zellen durch Wnt-Proteine β -Catenin in den Zellkern transloziert, um dort durch die Interaktion mit dem LEF-1/TCF-Transkriptionskomplex die Transkription spezifischer Wnt-Zielgene zu aktivieren [Cadigan and Nusse, 1997]. Da nun zum ersten Mal die Interaktion eines Hint-Proteins mit β -Catenin nachgewiesen werden konnte, sollte als nächstes untersucht werden, ob Hint2 wie Hint1 dazu in der Lage ist, die TCF- β -Catenin-vermittelte Transkriptionsaktivität zu beeinflussen. Die Untersuchungen zeigten, dass Hint2 die Aktivität von TCF- β -Catenin-regulierten Promotoren dosisabhängig inhibieren konnte. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass diese Promotor-Modulierung abhängig von β -Catenin zu sein scheint, da konstitutiv aktive LEF-Promotorkonstrukte nicht beeinflusst wurden. Hint2 war außerdem in der Lage, die Aktivität des Cyclin D1-Promotors dosisabhängig zu induzieren. Vor dem Hintergrund der Beschreibung von Hint2 als mitochondriales, Apoptose-sensitivierendes Protein in HepG2-Leberkrebszellen [Martin et al., 2006], geben die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse Anlass zu der Spekulation, dass Hint2 ähnlich wie Hint1 Tumorsuppressor-Eigenschaften besitzt. In LTD4-stimulierten Dünndarmzellen akkumuliert β -Catenin und wird in den Zellkern und die Mitochondrien importiert [Mezhybovska et al., 2006]. Dies führte in den betroffenen Zellen einerseits zur Aktivierung der TCF- β -Catenin-vermittelten Transkriptionsaktivität und andererseits zur Stabilisierung des anti-apoptischen Proteins Bcl-2 in den Mitochondrien. Dünndarmzellen, bei denen eine Transkriptionsaktivierung durch erhöhte LTD4-Konzentrationen ähnlich der Stimulierung durch Wnt-Proteine nachgewiesen wurde, zeigen ein erhöhtes Malignitätsrisiko [Mezhybovska et al., 2005]. Die physiologische

Aufgabe von Hint2 könnte sein, zum einen durch die Interaktion mit β -Catenin, die durch Splice-Varianten von Hint2 ohne das Mitochondrien-Lokalisationssignal vermittelt werden könnte, die Transkriptionsaktivierung im Zellkern zu reprimieren. Zum anderen könnte eine Interaktion von Hint2 mit β -Catenin in den Mitochondrien die Stabilisierung von Bcl-2 unterdrücken und die Zellen somit wie kürzlich beschrieben für die Apoptose zu sensibilisieren [Martin et al., 2006]. Bei diesen Untersuchungen wurde darüber hinaus gezeigt, dass Hint2 in den HepG2-Leberkrebszellen nicht mehr exprimiert wurde. Allerdings konnte durch die Re-expression von Hint2 in diesen Zellen bei Apoptosestimulation mit anti-Fas-Antikörper und Aktinomycin oder Ethanol wieder der sensibilisierende Effekt beobachtet werden. Bezieht man die neuen Ergebnisse zu Hint1 aus der Arbeitsgruppe auf diese Theorie zu Hint2, so kann die Hypothese aufgestellt werden, dass sich Hint1 und Hint2 in ihren tumorsupprimierenden Eigenschaften ergänzen. Hint1 moduliert die Apoptosesignalwege in Darm- und Brustkrebszellen durch die Induzierung der p53- und Bax-Expression, die beide als Apoptose-induzierende Proteine bekannt sind [Weiske and Huber, 2006]. Außerdem konnte bei diesen Untersuchungen die Unterdrückung der Bcl-2-Expression und die Assoziation mit dem Tip60-Histon-Acetyltransferase-Komplex festgestellt werden. Frühere Arbeiten zeigen eine Interaktion von Hint1 mit Pontin und Reptin, nicht aber mit β -Catenin [Weiske and Huber, 2005]. Analog zu den Ergebnissen zu Hint2 konnte bei einem Knockdown von Hint1 in den Hint1-überexprimierenden Krebszellen die Induktion der Apoptose aufgehoben werden. Interessanterweise blieb dabei aber die Bcl-2 Expression unverändert [Martin et al., 2006; Weiske and Huber, 2006]. Hint1 und Hint2 könnten somit zwei wichtige Tumorsuppressormoleküle der eukaryotischen Zellen sein, da der Verlust der Expression beider Proteine das Malignitätsrisiko von Zellen mit aktivierter, Proliferationsbeeinflussender Zielgen-Expression erhöht.

Das Wnt-Zielgen Cyclin D1 ist in vielen Tumoren induziert [Tetsu and McCormick, 1999]. Die in dieser Arbeit beschriebene dosisabhängige Induktion des Cyclin D1-Promotors steht im direkten Widerspruch zu der dargestellten Theorie, dass Hint2 als Tumorsuppressormolekül in der Zelle fungieren könnte. Möglicherweise induziert Hint1 in seiner Assoziation mit Tip60 promotorspezifische Effekte. Zur detaillierten Aufklärung dieses Ergebnisses werden deshalb weiterführende Untersuchungen notwendig sein.