

## 6 Ausblick

Der Nachweis der Homodimerisierung von Hint2 erfolgte anhand von Interaktionsstudien mit rekombinant exprimierten, gereinigten Proteinen. Mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen wäre es möglich, die Tertiär- und Quartärstrukturen sowohl des Hint2-Homodimers, als auch der Heterodimere zwischen Hint1, Hint2 und Hint3 aufzuklären. So wäre ein Vergleich mit den HIT-Proteinen Hint1 und Fhit hinsichtlich eventueller struktureller Unterschiede und Gemeinsamkeiten möglich. Um die homo- und heterodimeren Komplexbildungen *in vivo* zu untersuchen, könnten Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)-Experimente durchgeführt werden. Dabei können aber folgende Probleme auftreten. Für die Untersuchung von mitochondrial lokalisierten Konstrukten kann die Fusion mit CFP bzw. YFP nur über den C-Terminus erfolgen, da sonst das mitochondriale Lokalisationssignal nicht funktionell ist. Andererseits kann eine C-terminale Fusion von CFP bzw. YFP eventuell die Dimerisierung von Hint2 aufgrund sterischer Effekte verhindern. Für die Untersuchung der potenziell zytosolisch lokalisierten Splice-Varianten könnte eine N-terminale Verknüpfung durchgeführt werden, die jedoch zu einer Blockierung von am N-Terminus lokalisierten Interaktionsstellen führen könnte. Angesichts der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse sollte die Frage nach einer möglichen funktionellen Redundanz der Hint-Proteine erneut gestellt werden, obwohl bei Untersuchungen an Hint1<sup>-/-</sup>-Mäusen keine Hinweise auf eine Redundanz gefunden werden konnten [Korsisaari et al., 2003]. Es wurde bis heute noch nicht analysiert, welche phänotypischen Auswirkungen der Knockout von zwei oder allen Hint-Proteinen hat. Derartige Experimente könnten zunächst in Zellkulturexperimenten mit der RNAi-Methode durchgeführt werden, um die Auswirkungen der Unterbrechung der Expression der Hint-Proteine auf kultivierte Zellen zu beobachten. Für Untersuchungen am lebenden Organismus müssten Doppel- oder Dreifach-Knockout-Mäuse hergestellt werden. Im Rahmen dieser Analysen muss auch die Expression von Hint2-Splice-Varianten berücksichtigt werden, um Aufschluss über deren Bedeutung in den Zellen zu erhalten. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass Hint1 eine proapoptotische Funktion hat [Weiske and Huber, 2006]. Für Fhit wurde ebenfalls eine proapoptotische Funktion beschrieben [Ishii et al., 2001; Roz et al., 2002; Seignani et al., 2003]. Kürzlich wurde für Hint2 eine Apoptose-sensibilisierende Wirkung beschrieben [Martin et al., 2006]. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Hint-Proteine eine wichtige Rolle bei der Regulation

von Apoptoseprozessen spielen. Ein besonders interessanter Aspekt ist dabei die Aufklärung der Rolle von Hint2 und dessen Beeinflussung des Wnt-Signalwegs. Mit Reporteranalysen wurde gezeigt, dass Hint2 eine dosisabhängige Inhibition von TCF- $\beta$ -Catenin-regulierten Promotoren vermittelt. Um herauszufinden, ob auch enzymatisch inaktive Formen von Hint2 diese transkriptionsregulierenden Eigenschaften haben, könnten Reporteranalysen mit den mutierten Hint2-Varianten durchgeführt werden. So würden die neuesten Untersuchungen berücksichtigt werden, die mit einer enzymatisch inaktiven Mutante von Hint1 durchgeführt wurden und die Erhaltung der Fähigkeit zur Apoptoseinduktion durch das mutierte Protein beschrieben [Weiske and Huber, 2006]. Ebenso wurde gezeigt, dass eine enzymatisch inaktive Mutante von Fhit weiterhin die Apoptose induzieren kann [Siprashvili et al., 1997].

Außerdem sollte in diesem Zusammenhang geklärt werden, welcher Teil des Hint2-Proteins für die Interaktion mit  $\beta$ -Catenin verantwortlich ist. Da für Hint1 gezeigt wurde, dass es über N-terminale Aminosäuren mit Pontin und Reptin interagiert [Weiske and Huber, 2005], wäre es nicht überraschend, bei Hint2 ähnliche Beobachtungen machen zu können. Andererseits müsste auch analysiert werden, in welcher funktionellen Region von  $\beta$ -Catenin Hint2 bindet. Eine weitere wichtige, noch offene Frage besteht darin, wie der einerseits inhibierende, andererseits aktivierende Einfluss von Hint2 auf verschiedene Promotoren zu erklären ist. Letztendlich sind umfangreiche Experimente *in vitro* und *in vivo* erforderlich, um die in dieser Arbeit postulierte potenzielle Tumorsuppressorfunktion von Hint2 zu manifestieren.