

## 7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das Histidin-Triaden-Protein Hint2 funktionell charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass Hint2 als Homodimer vorliegt und hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert ist. Die Homodimerisierung erfolgt durch die Interaktion der C-terminalen Aminosäuren des Proteins. Zudem konnte gezeigt werden, dass Hint2 mit Hint1 und Hint3 heterodimere Proteinkomplexe ausbilden kann. Die Heterodimerisierung wird ebenfalls durch den C-Terminus von Hint2 vermittelt. Mit weiterführenden Untersuchungen konnten das Hint3-Homodimer und die Heterodimerisierung von Hint3 mit Hint1 nachgewiesen werden. Immunfluoreszenz-Experimente zeigten, dass Hint3 hauptsächlich im Zytosol von HEK293-Zellen lokalisiert ist. Bisher ist jedoch unklar, ob die Heterodimerisierungen unter physiologischen Bedingungen von funktioneller Relevanz ist.

Enzymatische Analysen mit Hint2 zeigten, dass Hint2 AMA zu AMP hydrolysieren kann. Die Hydrolaseaktivität wird durch  $Zn^{2+}$ -Ionen im Vergleich zu  $Mg^{2+}$ -Ionen inhibiert. Als optimaler pH für die enzymatische Aktivität von Hint2 wurde pH 5,5 ermittelt. Eine Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) von 28,3  $\mu M$  und eine katalytische Konstante ( $k_{cat}$ ) von 0,0067  $s^{-1}$  wurde bei pH 5,5 bestimmt. Im Rahmen der Charakterisierung von Hint2-Punktmutanten wurde herausgefunden, dass die Hint2-H149N-Mutante zwar homodimere Komplexe ausbilden kann, aber enzymatisch inaktiv ist. Hint2-Proteine mit einer S144A- oder einer H151N-Mutation zeigten eine im Vergleich zum Wildtyp-Protein verringerte Hydrolyseaktivität. Bei Messungen mit der Hint2-H147N-Mutante konnte vergleichbar zur H149N-Mutante keine enzymatische Aktivität gemessen werden. Als neuer Interaktionspartner von Hint2 konnte  $\beta$ -Catenin in *in vitro*-Assoziations- und in Immunpräzipitationsexperimenten nachgewiesen werden. Bei Reporteranalysen wurde eine modulatorische Rolle von Hint2 auf die TCF- $\beta$ -Catenin-induzierte Transkriptionsaktivität festgestellt, jedoch zeigten sich für unterschiedliche Promotoren entweder inhibierende oder aktivierende Effekte.

This work describes the functional characterization of the histidine triad protein Hint2. Hint2 was shown to homodimerize via its C-terminal amino acids and was localized predominantly in mitochondria. Furthermore, Hint2 forms heterodimeric complexes with Hint1 and Hint3. These interactions are also mediated by the C-Terminus of the Hint2-protein. Further experiments confirmed that Hint3 is also able to form homodimeric complexes and, moreover, is able to heterodimerize with Hint1. Immunofluorescence microscopy revealed that Hint3 is mainly localized in the cytosol of HEK293 cells. In enzyme assays, Hint2 was identified as an AMA hydrolase. Hint2 showed its highest enzymatic activity at a pH of 5.5. Zinc ions were found to inhibit the hydrolysis of AMA to AMP compared to magnesium ions. At a pH of 5.5, the Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) for the hydrolysis of AMA was determined to 28.3  $\mu$ M. The catalytic constant ( $k_{cat}$ ) was 0.0067  $s^{-1}$ . Analysis of mutated Hint2 proteins showed that the Hint2-H149N mutant was able to form homodimeric complexes, but lost its enzymatic activity. The mutated proteins Hint2-S144A and Hint2-H151N exhibited strongly reduced AMA hydrolase activity compared to the wild-type protein. Mutation of the histidine 147 similar to the H149N mutant resulted in the inability to hydrolyze AMA. Furthermore,  $\beta$ -catenin was identified as a new interaction partner of Hint2 in *in vitro* pull-down assays and in immunoprecipitation-experiments with endogenous proteins from cell lysates. In reporter gene assays Hint2 was found to modulate the TCF- $\beta$ -catenin-mediated transcriptional activity. However, both activating and inhibiting effects on promoters of different genes were observed.