

Sylvia Zayer

Dr.med.

Untersuchung der Verknüpfung des Caspase-8 assoziierten Proteins FLASH mit dem Zytoskelett

Geboren am 30.04.1981 in Saarbrücken

Staatsexamen am 09.11.2009 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie

Doktorvater: PD Dr.med. Ralph Nawrothki

Das Ziel dieser Arbeit war es, die in unserer Arbeitsgruppe beobachtete zytoplasmatische Lokalisation von rekombinantem FLASH näher zu charakterisieren und durch Studien mit Deletionskonstrukten die Region in FLASH zu bestimmen, über die seine Interaktion mit Mikrotubuli stattfindet.

In dieser Arbeit wurde durch heterologe Expression von GFP-markiertem FLASH in Zelllinien (COS-7 und MCF-7) sowie in primären Hippocampusneuronen gezeigt, dass rekombinantes FLASH mit Mikrotubuli kolokalisiert, nicht jedoch mit anderen Bestandteilen

des Zytoskeletts (wie Aktin- oder Intermediärfilamenten). Zusätzlich konnte durch biochemische Kopolymerisation von rekombinantem FLASH mit Tubulin eine Assoziation mit Mikrotubuli bestätigt werden. Um die genaue Position dieser Assoziation in FLASH zu

bestimmen, wurden verschiedene GFP-markierte FLASH-Fragmente in Zelllinien ektopisch

exprimiert und sodann deren subzelluläre Verteilung hinsichtlich des Mikrotubuli-Zytoskeletts untersucht. Es wurden drei Bereiche identifiziert, die jeweils für sich ausreichten, um eine Kolokalisation mit Mikrotubuli zu vermitteln. Interessanterweise scheint

die aminoterminalen *coiled-coil* Region von FLASH keine Rolle bei der Interaktion mit Mikrotubuli zu spielen, da ein kurzes Fragment mit dieser Region nicht mit Mikrotubuli kolokalisierte. Mit einer Ausnahme zeigten alle Fragmente, die mit Mikrotubuli kolokalisierten, auch eine Kopolymerisation mit Tubulin *in-vitro*. In einem Nebenbefund

wurde geklärt, dass nur eine der zwei vorhergesagten nukleären Lokalisationssequenzen in

FLASH funktionell bedeutsam ist. Die Ergebnisse dieser Dissertation weisen rekombinantes FLASH demnach als ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein aus, das über drei verschiedene Bereiche mit Mikrotubuli interagieren kann.

Vor dem Hintergrund kürzlich publizierter Daten (Milovic-Holm et al., 2007) wäre ein Modell denkbar, in dem FLASH nach Stimulation von CD95/Apo-1 aus dem Kern ins Zytoplasma transloziert und über die Verknüpfung mit Mikrotubuli zu Mitochondrien transportiert wird. Dort könnte es mit Caspase-8 interagieren und die extrinsische Apoptoseinduktion regulieren. Neben dieser Funktion scheint FLASH klinisch bedeutsam zu sein. Kürzlich wurde gezeigt, dass eine hohe Expression von FLASH in malignen Lymphoblasten mit einer geringeren Wachstumsrate dieser Zellen und so einem besseren therapeutischen Ansprechen korrelierte (Flotho et al. 2006). Des Weiteren wurde beobachtet, dass gastrointestinale Tumore häufig Mutationen im Bereich von nicht-kodierenden Regionen im FLASH-Gen aufzuweisen (Park et al. 2002). Weitere Untersuchungen zur Funktion von FLASH sollten deshalb zum besseren Verständnis wichtiger physiologischer, pathologischer und klinisch-prognostischer Vorgänge beitragen.