

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die vor Beginn der Arbeit durch Hefe 2-Hybridsystemanalysen gefundene Wechselwirkung zwischen dem Sp100-Protein, einer Komponente von sogenannten nukleären PML-Kerndomänen, und dem FLASH-Protein, das eine Signalkomponente der CD95-vermittelten Apoptose ist, zu erhärten sowie die Bedeutung dieser Interaktion aufzuklären. Die Arbeit sollte zum besseren Verständnis der molekularen Grundlage der Regulation der CD95-vermittelten Apoptose durch PML-Kerndomänen beitragen, über die zu Beginn der Arbeit nur sehr wenig bekannt war.

Im Rahmen dieser Studien konnte durch Immunpräzipitationsstudien gezeigt werden, dass das FLASH-Protein auch in humanen Zellen mit dem Sp100-Protein, nicht aber mit dem für PML-Kerndomänen essenziellen PML-Protein interagiert. Die an der Wechselwirkung beteiligten Domänen konnten grob eingegrenzt werden. Immunzytochemisch konnte FLASH zum Teil in PML-Kerndomänen, aber auch in anderen Kerndomänen sowie teilweise im Nukleoplasma und in extranukleären Kompartimenten lokalisiert werden.

Nach Auslösen CD95-vermittelter Apoptose wurde beobachtet, dass FLASH und ein Teil des Sp100-Proteins aus den nukleären PML-Kerndomänen in das Zytoplasma translozieren. Dort akkumulierte FLASH dann an Mitochondrien, die von zentraler Bedeutung innerhalb der Apoptoseregulation sind. Die Translokation des FLASH- und des Sp100-Proteins konnte durch Inhibition des Crm1-abhängigen Kernexports verhindert werden. Dies weist auf die Induktion eines aktiven Transports beider Proteine in das Zytoplasma nach CD95-Rezeptor Aktivierung hin. Dass dieser Kernexport durch einen Signalweg vermittelt wird, der durch die am CD95-Rezeptor aktivierte Caspase-8 ausgelöst wird, konnte durch den Nachweis der Inhibition der CD95-induzierten Translokation von FLASH und Sp100 in das Zytoplasma mittels des Caspase-8 spezifischen Inhibitors zIETD-fmk sowie durch stabile Expression einer transdominant negativen Deletionsmutante des FADD-Proteins gezeigt werden.

Detaillierte subzelluläre Lokalisationsanalysen ergaben, dass das nach Aktivierung des CD95-Rezeptors im Zytoplasma vorgefundene FLASH-Protein an den Mitochondrien akkumuliert und dort mit der endogen exprimierten Caspase-8 kolokalisiert. Immunpräzipitationsstudien zeigten darüberhinaus, dass FLASH während der CD95-Rezeptor vermittelten Apoptose an die nicht Rezeptor-gebundene Caspase-8 bindet. Diese

Beobachtungen legten die Vermutung nahe, dass FLASH mit Caspase-8 an Mitochondrien interagiert.

Um die molekularen Grundlagen für die Regulation der CD95-vermittelten Apoptose durch FLASH näher zu charakterisieren, wurden auch Studien mit dem anti-apoptotisch wirkenden adenoviralen E1B 19K-Protein, welches als Interaktionspartner des FLASH-Proteins bekannt war, durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass in eigens dafür hergestellten HT1080-Zellen mit stabiler E1B 19K-Proteinexpression das E1B 19K-Protein vor allem an Mitochondrien lokalisiert und das endogene FLASH-Protein aus den PML-Kerndomänen an die Mitochondrien transloziert war. Desweiteren konnte durch Koimmunpräzipitationsexperimente demonstriert werden, dass FLASH einen trimeren Komplex mit E1B 19K und Pro-Caspase-8 bildet. Hierdurch kommt es wahrscheinlich zu Konformationsänderungen einer oder beider Komponenten des Pro-Caspase-8/FLASH-Proteinkomplexes, wodurch die Pro-Caspase-8-Aktivierung inhibiert werden könnte.

Bei der exogenen Expression von FLASH durch Vektoren wurde gefunden, dass in einer Reihe von Zellen ein erheblicher Teil des Proteins in filamentösen Strukturen im Zytoplasma lokalisierte. Diese Strukturen kolokalisierten mit sogenannten Todeseffektor-Filamenten, deren Bildung bekannt ist für die Überexpression von Proteinen mit sogenannten Todeseffektordomänen. Das Vorhandensein einer Todeseffektor-ähnlichen Domäne im FLASH-Protein ist konsistent mit diesem Befund. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass zytoplasmatisches FLASH-Protein Pro-Caspase-8 in diese Filamente rekrutiert und hierdurch Apoptose auslöst, wohingegen PML-Kerndomänen-assoziiertes FLASH keine pro-apoptotische Aktivität offenbarte. Die Reduktion der Sp100-Expression mittels einer spezifischen siRNA konnte mit einer zunehmenden zytoplasmatischen Lokalisation von FLASH und einer damit einhergehenden Sensibilisierung für CD95-vermittelte Apoptose korreliert werden. Dies spricht für eine negative Regulatorfunktion des Sp100-Proteins bei der FLASH-vermittelten Apoptose.

Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse auf eine bisher nicht bekannte regulatorische Rolle von Sp100 in der CD95-vermittelten Apoptose schließen. Das FLASH-Protein wurde erstmals als ein mögliches molekulares Bindeglied zwischen PML-Kerndomänen und dem Signalübertragungsweg des CD95-Todesrezeptors identifiziert. Der Export von spezifischen Kernproteinen in das Zytoplasma als Modulator von apoptotischen Prozessen stellt einen neuen, bisher nicht beschriebenen biologischen Signalübertragungsweg dar.