

Die Regulation von I κ B Kinase-NF- κ B-Signalwegen durch das Hitzeschockprotein Hsp90 und dessen Ko-Chaperon Cdc37

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der
Freien Universität Berlin

**vorgelegt von
Meike Brömer**

**geb. am 07.11.1975
in Frankfurt am Main**

Berlin, im März 2005

Gutachter: Prof. Dr. Claus Scheidereit
Prof. Dr. Udo Heinemann

Disputation am 14. Juli 2005

1. EINLEITUNG	4
1.1 Der NF-κB Signalweg	4
1.1.2 Die Aktivierung von NF- κ B durch Degradation von I κ B	8
1.1.3 Der I κ B Kinase Komplex	9
1.1.4 Aktivierung und Regulation des IKK Komplexes	11
1.1.5 Aktivierung von IKK durch TNF α oder Interleukin-1 β	12
1.1.6. Aktivierung von IKK und NF- κ B durch andere Stimuli	14
1.1.7 Inaktivierung des I κ B Kinase Komplexes und Autoregulation von NF- κ B	15
1.1.8 Deregulation des NF- κ B-Signalwegs in Tumorzellen	15
1.1.9 Konstitutive NF- κ B-Aktivität im Hodgkin Lymphom	16
1.2 Molekulare Chaperone	19
1.2.1 Hsp90 im eukaryotischen System	20
1.2.2 Partnerproteine (Ko-Chaperone) von Hsp90	21
1.2.3 Struktur und Funktion von Hsp90	22
1.2.4 Hsp90 Substratproteine	23
1.2.5 Der Chaperon-Zyklus von Hsp90	24
1.2.6 Hsp90 und Cdc37 als Kinase-spezifische Chaperone	25
1.2.7 Hsp90-Inhibitoren	27
1.2.8 Hsp90 als Ziel pharmakologischer Intervention	28
1.2.9 Die Rolle von Hitzeschock-Proteinen im NF- κ B-Signalweg	29
2. ERGEBNISSE	32
2.1 Untersuchung der Aufgaben von Hsp90 für den NF-κB-Signalweg	32
2.1.1 Die Aktivierung von NF- κ B und IKK durch pro-inflammatorische und mitogene Stimuli benötigt die Funktion von Hsp90.....	32
2.1.2 Hsp90 spielt eine zweifache Rolle für den IKK-Komplex: Aktivierbarkeit und Stabilität der I κ B-Kinasen	34
2.1.3 Assoziation von Hsp90 mit dem IKK-Komplex	35
2.1.4 Einfluss von Kurzzeit-Hsp90-Inhibition auf die Aktivität des IKK-Komplexes	36
2.1.5 Hsp90 wird für die Stabilität und Biosynthese von IKK benötigt	39
2.2 Einfluss des Ko-Chaperons Cdc37 auf den IKK Komplex	44
2.2.1 Die Aktivität von IKK ist von dem Hsp90 Ko-Chaperon Cdc37 abhängig .	44
2.2.2 Bestimmung der Interaktionsregionen von Cdc37 mit IKK und Hsp90	46
2.2.3 Cdc37 wird durch die I κ B Kinasen phosphoryliert	49
2.3 Untersuchung der konstitutiven NF-κB Aktivität in Hodgkin-/ Reed- Sternberg Zellen	52
2.3.1 Hodgkin-/Reed-Sternberg Lymphomzellen besitzen konstitutiv aktives NF- κ B und sezernieren einen NF- κ B aktivierenden Faktor	52
2.3.2 Die Funktion des Hitzeschockproteins Hsp90 wird für die konstitutive Aktivität des I κ B-Kinase Komplexes (IKK) und NF- κ B in Lymphomzellen benötigt	54
2.3.3 Kurzzeit- und Langzeit-Effekte von Hsp90-Inhibition in HRS-Zellen.....	57
2.3.4 Die Geldanamycin-Derivate 17-AAG und 17-DMAG hemmen die konstitutive NF- κ B-Aktivität in HRS-Zellen	59

2.3.5 Hsp90-Inhibition beeinflusst die Expression von NF- κ B-Zielgenen	60
2.3.6 Hodgkin-/Reed-Sternberg Zellen benötigen Hsp90-Aktivität zum Schutz vor Apoptose	63
3. DISKUSSION	66
3.1 Hsp90 wird für die Biosynthese der IκB Kinasen benötigt	66
3.2 Die Bedeutung von Hsp90 und Cdc37 für die Aktivierung des IKK Komplexes	69
3.2.1 Regulation der Aktivität des IKK Komplexes durch Hsp90	69
3.2.2 Regulation des IKK Komplexes durch das Ko-Chaperon Cdc37	72
3.2.3 Cdc37 wird von IKK α und IKK β phosphoryliert.....	76
3.2.4 Aktivierungsmechanismen des IKK Komplexes	77
3.3 Hsp90 als Regulator der konstitutiven NF-κB Aktivität in Tumorzellen.....	79
3.4 Hsp90 und der NF-κB-Signalweg als Ziel pharmakologischer Intervention	82
4. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	84
5. MATERIAL	87
5.1 Geräte und Zubehör	87
5.2 Chemikalien	88
5.3 Enzyme und Kits.....	89
5.4 Bakterienstämme.....	89
5.5 Bakterienkulturmedien.....	89
5.6 Zelllinien	90
5.7 Antikörper	90
5.8 Plasmide.....	91
5.9 Rekombinante Proteine.....	91
5.10 Oligonukleotide	92
5.11 Puffer und Lösungen.....	92
6. METHODEN	93
6.1 Zellbiologische Methoden.....	93
6.1.1 Kultur adhärenter Zellen	93
6.1.2 Kultur von Suspensionszellen	93
6.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	93
6.1.4 Behandlung von Zellen mit Stimulatoren	94
6.1.5 Transiente Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA	94
6.1.6 Bestimmung der Apoptose mithilfe der Durchflusscytometrie	95

6.1.7 Präparation von Zellextrakten.....	95
6.2 Nukleinsäuretechniken	96
6.2.1 Agarosegelelektrophorese.....	96
6.2.2 Ethanolpräzipitation von DNA.....	96
6.2.3 Reinigung von DNA.....	96
6.2.4 Restriktionsanalyse	97
6.2.5 Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	97
6.2.6 Ligation.....	98
6.2.7 Hybridisierung von Oligonukleotiden	98
6.2.8 Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA.....	98
6.2.9 Polymerase-Kettenreaktion	99
6.2.10 Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	100
6.2.11 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA.....	101
6.2.12 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	101
6.2.13 Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien nach der Calciumchlorid-Methode	101
6.2.14 Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien nach der Hitzeschock-Methode	102
6.2.15 DNA-Kapillar-Sequenzierung	102
6.2.16 Präparation von RNA.....	103
6.2.17 Northern Blotting.....	103
6.3 Proteinchemische und immunologische Techniken	104
6.3.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	104
6.3.2 SDS-PAGE.....	104
6.3.3 Coomassiefärbung	104
6.3.4 Proteintransfer auf PVDF-Membranen (Western Blot)	105
6.3.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen.....	105
6.3.6 Expression rekombinanter Proteine.....	105
6.3.7 Aufreinigung über Glutathion-Sepharose	106
6.3.8 Immunopräzipitation (IP) von Proteinen	106
6.3.9 Gelretardationsexperiment (EMSA).....	108
6.3.10 <i>In vitro</i> -Phosphorylierungsexperiment	108
6.3.11 <i>Pulse-Chase</i> Experiment.....	109
6.3.12 Nachweis von Ubiquitin-konjugierten Proteinen	110
7. ABKÜRZUNGEN	111
8. LITERATUR	113
9. ANHANG.....	133
9.1 Publikationen	133
9.2 Lebenslauf.....	134
9.3 Danksagung	135

9. Anhang

9.1 Publikationen

Teile dieser Arbeit sind eingegangen in folgende Publikation:

Broemer M., Krappmann D., Scheidereit C (2004). Requirement of Hsp90 activity for I κ B kinase (IKK) biosynthesis and for constitutive and inducible IKK and NF- κ B activation. *Oncogene* 23(31): 5378-86.

9.2 Lebenslauf

Name: Meike Brömer
Geburtstag: 07.11.1975
Geburtsort: Frankfurt am Main

Schulbildung: 1982-1986 Auefeldschule Kassel,
1986-1988 Luisenschule Kassel,
1988-1995 Albert-Schweitzer-Schule Kassel,
1995 Abitur

Hochschulstudium: 10/95 - 08/00 Biochemie-Studium an der Universität Hannover

07/99 - 09/99 Praktikum: Kennedy Institute for Rheumatology,
London; Prof. J. Saklatvala

02/00 - 08/00 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von PD Dr.
Michael Kracht, Medizinische Hochschule Hannover mit dem
Titel: „Signaltransduktion entzündungsrelevanter Zytokine auf
Ebene der MAPK Kinase Kinasen“

11/00 - 07/01 Mitarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Claus
Scheidereit am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin,
Berlin-Buch

Promotion: seit 08/01: Experimentelle Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von
Prof. Claus Scheidereit am Max-Delbrück-Centrum für
Molekulare Medizin, Berlin-Buch

9.3 Danksagung

Vielen Dank an alle, die mich in den vergangenen Jahren unterstützt haben.

Dabei danke ich vor allem Claus für die Betreuung und das Interesse an meiner Arbeit sowie viele hilfreiche Diskussionen über verschiedenste Fragestellungen. Diese Gespräche haben entscheidend zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Vielen Dank an Prof. Udo Heinemann für die Begutachtung meiner Arbeit.

Daniel danke ich für seine Übersicht und Erfahrung beim Beurteilen von Ergebnissen, viele gute Ideen und praktische Tipps.

Einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit leistete die gute Arbeitsatmosphäre und die Zusammenarbeit mit den Kollegen der Arbeitsgruppe, bei denen ich mich auf diesem Wege herzlich bedanken möchte. Vielen Dank an: Andrea, Anke, Annette, Benjamin, Christian, Daniela, Daniel, Diana, Elmar, Erika, Eva, Felix, Jan, Karin, Liron, Michael, Mira, Norbert, Rudolf, Ruth, Sabine, Sebastian, Seda, Vigo und Yoshi!

Last but not least möchte ich mich bei Thomas und Bärbel, Jens und Tine Brömer bedanken, die immer wieder mit für sie unverständlichen Labordetails konfrontiert wurden! Und vielen Dank fürs Korrekturlesen!

DANKE!