

1. Einleitung

1.1 Der NF- κ B Signalweg

Essenzielle zelluläre Prozesse benötigen eine genaue Regulation. Wachstum, Differenzierung und die Reaktion auf Umwelteinflüsse erfordern in vielen Fällen eine Veränderung der Genexpression in der Zelle. Eine Vielzahl von Regulationsmechanismen auf verschiedenen Ebenen haben sich im Laufe der Evolution entwickelt, die effektivste Weise auf die Aktivität eines Gens Einfluss zu nehmen, ist jedoch die Regulation seiner Transkription. Spezialisierte Proteine, so genannte Transkriptionsfaktoren, steuern die Transkription von Genen; sowohl die differenzielle Genexpression unterschiedlicher Zelltypen, als auch die kurzfristige Induktion von Genen zur Reaktion auf ein extrazelluläres Signal.

Ein von außerhalb der Zelle kommendes Signal muss zunächst über Rezeptoren in der Zellmembran oder Transportmechanismen ins Zytoplasma weitergeleitet werden. Bis zur Initiation der Transkription ist häufig eine Vielzahl von Schritten notwendig, die schließlich die Lokalisation oder Aktivität der jeweiligen Transkriptionsfaktoren beeinflussen. Dazu gehört die Signalweitergabe durch die spezifische Rekrutierung von Partnerproteinen, Phosphorylierung oder Dephosphorylierung, Assoziation und Dissoziation von Proteinen oder Konformationsänderungen.

Basale Transkriptionsfaktoren sind generell für die Transkription jedes Gens notwendig und vermitteln die Assemblierung des Initiationskomplexes und die Rekrutierung der RNA-Polymerase II (zur Übersicht Roeder 1996). Genspezifische Transkriptionsfaktoren binden an regulatorische DNA-Elemente. Diese DNA-Sequenzen können direkt in der Promotorregion des regulierten Gens oder in weiter entfernten Enhancerregionen lokalisiert sein. Transkriptionsfaktoren besitzen eine DNA-Bindungsdomäne sowie Regionen, über die die Aktivierung oder Repression des Zielgens vermittelt wird (Transaktivierungsdomänen). Dies geschieht über Wechselwirkung mit der basalen Transkriptionsmaschinerie und weiteren aktivierenden oder reprimierenden Proteinen. Transkriptionsfaktoren lassen sich in Familien zusammen fassen, die durch konservierte Proteindomänen charakterisiert werden.

Die Familie der NF- κ B-/Rel-Proteine beschreibt eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle vor allem im Immunsystem von

Säugetern spielen, aber auch für die Regulation von Differenzierung, Zellproliferation und Apoptose benötigt werden.

1.1.1 DIE FAMILIE DER NF- κ B-/I κ B-PROTEINE

1986 wurde NF- κ B ("Nuclear Factor-kappaB") zunächst als ein induzierbarer Faktor beschrieben, der die Transkription des Immunglobulin κ Leichtkettenpromotors in reifen B-Zellen über einen „ κ B“-Enhancer reguliert (Sen und Baltimore 1986a). Die erkannte DNA-Sequenz lautet GGGACTTTCC. Schon bald wurde NF- κ B-Aktivität jedoch auch in anderen Zelltypen nach Stimulation mit Phorbol ester (PMA) (Sen und Baltimore 1986b), in T-Zellen (Cross et al. 1989) und Monozyten (Griffin et al. 1989) nachgewiesen. Eine inaktive Form von NF- κ B befindet sich im Zytoplasma, während nach PMA-Stimulation die zytoplasmatische Menge stark abnimmt und eine äquivalente Menge im Kernextrakt nachgewiesen wird (Baeuerle und Baltimore 1988a). Inaktives NF- κ B im Zytoplasma von unstimulierten 70Z/3 Pre-B Zellen wurde in Gelfiltrationsexperimenten in einem 120-130 kD großen Komplex mit einem als I κ B bezeichneten Inhibitorprotein gefunden. Anfangs wurde die Assoziation von einem 55-62 kD großen NF- κ B Protein mit einem 60-70 kD großen I κ B vermutet (Baeuerle und Baltimore 1988b). Das wichtigste I κ B Protein I κ B α wurde 1991 als MAD-3 kloniert und umfasst 317 Aminosäuren (Haskill et al. 1991). Die Assoziation im Zytoplasma erfolgt mit einem NF- κ B Dimer (Beg et al. 1992).

In Säugetieren sind fünf Proteine der NF- κ B-Familie von Transkriptionsfaktoren bekannt: p50, p52, p65 (RelA), c-Rel und RelB (zur Übersicht Ghosh et al. 1998). Die Gemeinsamkeit dieser Proteine zeigt sich in einer ca. 300 Aminosäuren umfassenden Rel-Homologie Domäne, die die Dimerisierung der Faktoren, die DNA-Bindung und die Interaktion mit den I κ B Proteinen ermöglicht. In *Drosophila* wurden drei Rel-Proteine identifiziert: Dorsal, Dif und Relish, die ebenfalls durch eine Rel-Homologie Domäne charakterisiert sind (Abb. 1).

Die DNA-Bindung an die NF- κ B Konsensussequenz 5'-GGGPuNNPyPyCC-3' (Baeuerle 1991) erfolgt über den aminoterminalen Bereich der Rel-Homologie Domäne, die Dimerisierung der Faktoren über den carboxyterminalen Bereich, wie durch die Aufklärung der Kristallstruktur von DNA-gebundenen Homo- und Heterodimeren gezeigt wurde (Ghosh et al. 1995, Muller et al. 1995, Chen et al. 1998). Mit Ausnahme von RelB können alle Rel-Proteine Homodimere und auch

Heterodimere miteinander bilden. Am häufigsten in einem Großteil der Zelltypen ist ein Heterodimer aus p65 und p50 oder p52. RelB kann nur mit p50 oder p52 dimerisieren.

p65, c-Rel und RelB besitzen so genannte transaktivierende Domänen im carboxyterminalen Teil des Proteins (Hannink und Temin 1989, Bull et al. 1990, Dobrzanski et al. 1993, Bours et al. 1994, Schmitz und Baeuerle 1994), die für die Aktivierung der Transkription zusätzlich zur DNA-Bindung benötigt werden. p50 und p52 besitzen keine Transaktivierungsdomänen, so dass Dimere aus diesen Proteinen eine Repression der Transkription vermitteln können. Für diese beiden Proteine gilt die Besonderheit, dass sie durch Prozessierung aus den Vorläuferproteinen p105 und p100 generiert werden (Fan und Maniatis 1991, Palombella et al. 1994, Betts et al. 1996). p105 und p100 besitzen neben dem aminoterminalen Rel-/p50-/p52-Bereich in der carboxyterminalen Hälfte so genannte "Ankyrin-Repeat"-Domänen, die sie mit den inhibitorischen Proteinen der I κ B-Familie gemeinsam haben. Das *Drosophila* Protein Relish zeigt einen ähnlichen Aufbau.

Die Familie der I κ B-Proteine hat als charakteristisches Merkmal eine "Ankyrin-Repeat"-Domäne (ARD), die aus sechs oder sieben "Repeats" von 33 Aminosäuren besteht und die spezifische Bindung an die Rel-Faktoren vermittelt. Zu den I κ B-Proteinen gehören die zytoplasmatischen Proteine I κ B α , β und ϵ (Haskill et al. 1991, Thompson et al. 1995, Whiteside et al. 1997), die Vorläuferproteine p100 und p105 (ebenfalls zytoplasmatisch) sowie die vorwiegend nukleären Proteine Bcl-3 und MAIL.

Die zytoplasmatischen I κ Bs haben die Funktion, durch Bindung der Rel-Faktoren ihre Aktivität zu regulieren. Am Carboxy-terminalen Ende der Rel-Homologie Domäne ist bei allen NF- κ B Proteinen ein Kernlokalisierungssignal (NLS) zu finden. Dieses vermittelt den Transport der Rel-Faktoren in den Kern (Torgerson et al. 1998), damit die Proteine dort transaktivierend wirken können. Die Translokation wird durch die Bindung der Ankyrin-Repeat Domäne an die Rel-Homologie Domäne verhindert. Das NLS von p65 in einem p50/p65/I κ B α Komplex wird durch die Bindung von I κ B α maskiert. Durch Protein-Protein Kontakte zwischen I κ B α und dem NLS von p65 erfolgt eine Konformationsänderung, die eine Erkennung durch für den Kerntransport verantwortliche Proteine verhindert (Huxford et al. 1998, Jacobs und Harrison 1998). Neuere Untersuchungen zeigen, dass NF- κ B-I κ B Komplexe in der Lage sind, sich zwischen Kern und Zytoplasma zu bewegen. Der Grund dafür könnte sein, dass nur

eines der NLS der im Komplex befindlichen Rel-Faktoren maskiert wird. Zum nukleären Export des Komplexes führt ein Kernexportsignal (NES), das sich im aminoterminalen Bereich von I κ B α befindet (Johnson et al. 1999, Huang et al. 2000, Huang et al. 2001, Birbach et al. 2002). Die Funktion von nukleären NF- κ B-I κ B Komplexen ist bisher nicht bekannt.

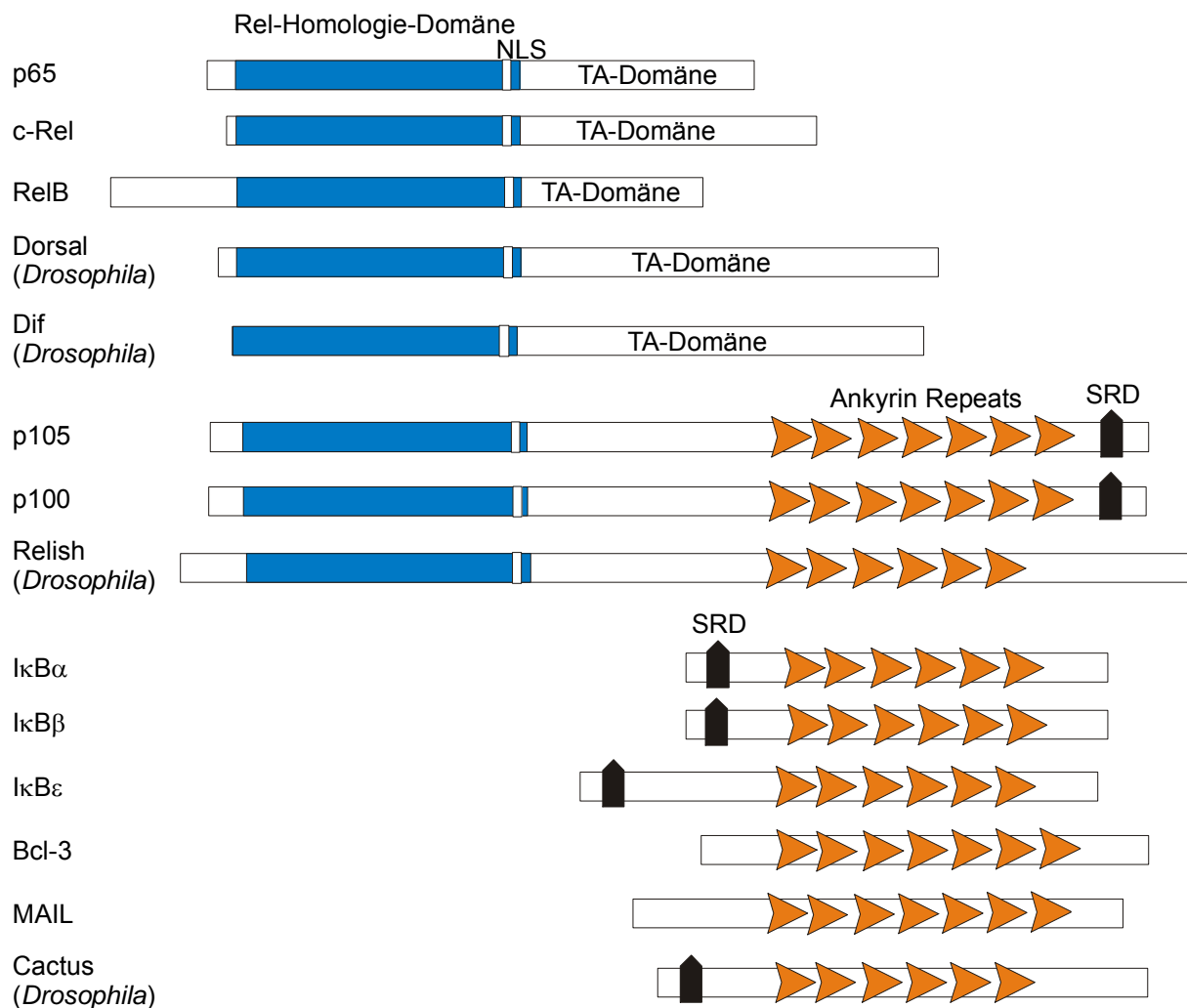


Abbildung 1: Übersicht über die Proteine der NF- κ B/I κ B-Familie aus *Mammalia* und *Drosophila*. Das charakteristische Merkmal der NF- κ B-Proteine ist die DNA-bindende Rel-Homologie-Domäne (RHD), in blau gezeigt. Das Kernlokalisierungssignal (NLS) befindet sich am Ende der RHD. Einige Rel-Faktoren besitzen außerdem im C-terminalen Bereich eine Transaktivierungsdomäne (TA-Domäne). Die 6-7 „Ankyrin-Repeats“ der I κ B-Proteine sind als orange Dreiecke dargestellt. Mit SRD wird die „Signal Response Domain“ der I κ B-Proteine bezeichnet, die während der Aktivierung phosphoryliert wird.

Wie bereits erwähnt, nehmen die Proteine p100, p105 sowie das *Drosophila*-Protein Relish eine Sonderstellung ein, da sie sowohl als Rel-Protein als auch als Inhibitor wirken können. So dient p100 RelB als Bindungspartner, und p105 bindet an p50,

wobei die Carboxy-terminale Hälfte des Proteins die Funktion des I κ B-Proteins übernimmt (Solan et al. 2002).

Die beiden nukleären I κ B Proteine wirken nicht als Inhibitoren der NF- κ B-Faktoren. Bcl-3 bindet im Kern an p50- oder p52-Homodimere (Rice et al. 1992, Wulczyn et al. 1992, Naumann et al. 1993) und kann so die Transkription aktivieren (Leonardo und Siebenlist 1994). Das Protein MAIL spielt vermutlich eine Rolle als nukleärer Aktivator der Interleukin-6 Produktion (Kitamura et al. 2000).

1.1.2 Die Aktivierung von NF- κ B durch Degradation von I κ B

Als aktiver Transkriptionsfaktor wurde NF- κ B in reifen B-Zellen entdeckt (Sen und Baltimore 1986). In anderen Zelltypen wird die Aktivierung von NF- κ B durch verschiedene Stimuli ausgelöst, wie zum Beispiel Zytokine, Mitogene, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), doppelsträngige RNA, UV-Bestrahlung oder durch Erkennung von Antigen in B- und T-Zellen (zur Übersicht Pahl 1999).

Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt durch die induzierte Degradation des I κ B Proteins (Verma et al. 1995, Baldwin 1996). Dies führt zur Freisetzung des NF- κ B Dimers, das nun zur Transaktivierung in den Zellkern translozieren kann, um an κ B Bindungsstellen in der Promotorregion von Zielgenen zu binden. Die Degradation von I κ B wird durch Signal-induzierte Phosphorylierung gesteuert. Dabei wird nach Aktivierung von spezifischen I κ B-Kinasen (IKK) I κ B α an zwei Serin-Resten (S32 und S36) (die anderen I κ B Proteine an entsprechenden Resten) phosphoryliert (Brockman et al. 1995, Brown et al. 1995). Das phosphorylierte I κ B α wird nun von Enzymen des Ubiquitin-/Proteasomsystems erkannt und degradiert.

Das Protein β -TRCP (β -Transducin-Repeat-Containing-Protein) erkennt über eine WD-Domäne das Strukturmotiv DS^PG Ψ XS^P von phosphoryliertem I κ B α (Yaron et al. 1998), das auch in den Proteinen HIV-Vpu (Margottin et al. 1998), β -Catenin (Aberle et al. 1997) und p105 (Heissmeyer et al. 2001) vorkommt, und vermittelt die Ubiquitinierung der Lysin-Reste 21 und 22 von I κ B α (Rodriguez et al. 1996). Anschließend erfolgt die proteasomale Degradation. Neben der Translokation von NF- κ B in den Kern beeinflussen außerdem weitere Ereignisse die Transkriptionsaktivierung. Dazu gehört die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren und der basalen Transkriptionsmaschinerie und

Phosphorylierung der Rel-Faktoren (insbesondere p65) nach Stimulation (Schmitz et al. 2001).

1.1.3 Der $\text{I}\kappa\text{B}$ Kinase Komplex

Der $\text{I}\kappa\text{B}$ Kinase Komplex ist der wichtigste Regulationspunkt im NF- κB Signalweg. Die $\text{I}\kappa\text{B}$ Kinasen katalysieren die signalinduzierte Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und steuern damit die Aktivierung von NF- κB .

Auf der Suche nach der Kinase, die Serin 32 und 36 von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ spezifisch phosphoryliert, wurde ein ubiquitin-abhängiger Komplex gefunden, der in der Lage war, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ zu phosphorylieren, jedoch von Stimulation unabhängig war (Chen et al. 1996). 1997 konnten zwei Zytokin-induzierbare Proteine aus einem 900 kD großen Proteinkomplex (aus $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten HeLa-Zellen) gereinigt werden (DiDonato et al. 1997, Mercurio et al. 1997, Zandi et al. 1997). Aufgrund der Fähigkeit, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ zu phosphorylieren, wurden die beiden Proteine $\text{I}\kappa\text{B}$ Kinase (IKK) α und β (auch IKK1 und IKK2) genannt. Das 85 kD große Protein IKK α war bereits zuvor unter dem Namen CHUK als putative Serin-/Threonin-Kinase kloniert worden, ohne dass die biologische Funktion bekannt war (Connelly und Marcu 1995). IKK β ist 87 kD groß und ist stark homolog zu IKK α . CHUK/IKK α wurde darüber hinaus in einem *Yeast-Two-Hybrid-Screen* als Interaktionsfaktor der Kinase NIK (NF- κB Inducing Kinase) gefunden (Régnier et al. 1997).

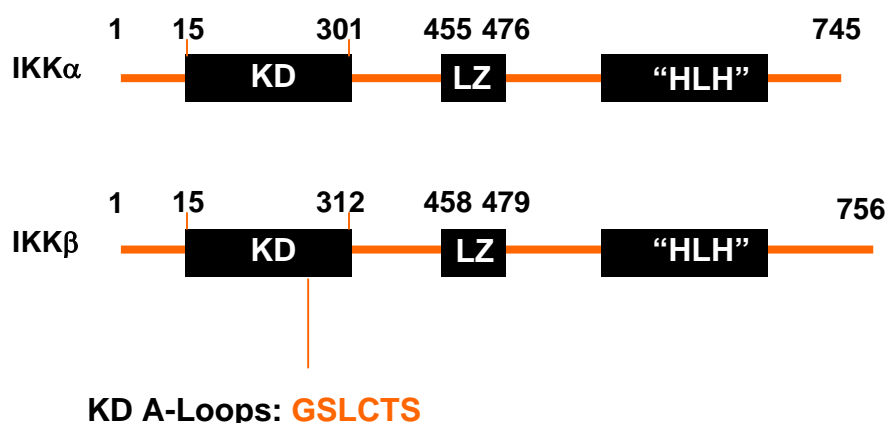


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der $\text{I}\kappa\text{B}$ Kinasen α und β .

Angegeben ist die Lage (nach Aminosäuren) der verschiedenen Domänen. KD=Kinasedomäne, LZ=Leucin-Zipper, HLH=Helix-Loop-Helix. GSLCTS ist die Sequenz der Aktivierungsschleife („*Activation-Loop*“), die bei der signalinduzierten Aktivierung an den Serin-Resten phosphoryliert wird.

Die Peptidsequenzen der beiden Kinasen zeigen homologe Strukturen: die Kinasedomäne am aminoterminalen Ende mit 64% identischen Aminosäuren, einen Leucin-„Zipper“ im mittleren Bereich und eine „Helix-Loop-Helix“-Domäne im carboxyterminalen Teil. Mutationen im „Leucin“-Zipper verhindern die Dimerisierung und die Aktivierung der Kinasen (Zandi et al. 1998). Sowohl IKK α als auch IKK β können durch eine Mutation eines Lysin-Rests (K44) in der ATP-Bindungsstelle inaktiviert werden (Woronicz et al. 1997).

Als dritter Faktor in dem Proteinkomplex wurde die regulatorische Untereinheit IKK γ entdeckt (Rothwarf et al. 1998). Das über Ko-Immunopräzipitation mit einem Antikörper gegen IKK α identifizierte 52 kD große Protein ist das humane Homolog des Mausproteins NEMO (NF- κ B Essential Modulator), das zuvor in einem genetischen Komplementationsansatz in einer Zelllinie mit defizienter NF- κ B-Aktivierung identifiziert worden war (Yamaoka et al. 1998). Obwohl IKK γ keine enzymatische Aktivität besitzt, ist es dennoch essenziell für die Aktivierung von NF- κ B, in einer IKK γ -defizienten Zelllinie ist keine Aktivierung von NF- κ B möglich (Yamaoka et al. 1998).

Bezüglich der stöchiometrischen Zusammensetzung des 700-900 kD großen IKK Komplexes gibt es keine eindeutigen Daten. Auf der Basis stöchiometrischer Analysen von rekombinanten IKK Komponenten und Rekonstitution des Komplexes in *Saccharomyces cerevisiae* wurden stöchiometrisch gleiche Mengen von IKK α , IKK β und IKK γ vorgeschlagen (Krappmann et al. 2000, Miller und Zandi 2001). Unter der Voraussetzung, dass IKK α und IKK β über ein Leucin-Zipper (LZ) Motiv Homo- und Heterodimere bilden können und auch IKK γ dimerisieren kann (Rothwarf et al. 1998, Yamaoka et al. 1998), wurde angenommen, dass ein IKK α -IKK β Dimer von einem IKK γ Dimer gebunden wird (Rothwarf und Karin 1999, Krappmann et al. 2000). In neueren Arbeiten wurde IKK γ als Tetramer beschrieben, an das vier IKK α/β -Moleküle binden können (Tegethoff et al. 2003, Ran et al. 2004).

Verschiedene andere Proteine wurden zusammen mit dem IKK Komplex aufgereinigt. Einem als IKAP (IKK Komplex assoziiertes Protein) bezeichnetem Protein mit einem Molekulargewicht von 150 kD wurde zunächst eine Rolle als Gerüstprotein zugeordnet (Cohen et al. 1998). Weitere Analysen ergaben jedoch, dass die Anwesenheit von IKAP im IKK Komplex keine Bedingung für die Aktivierung von NF- κ B ist (Krappmann et al. 2000) und dass IKAP eine Untereinheit des

humanen Elongator Komplexes ist und bei der basalen Transkription von Genen eine Rolle spielt (Hawkes et al. 2002).

2002 wurde das Hitzeschockprotein Hsp90 zusammen mit seinem kinasespezifischen Partnerprotein Cdc37 als konstitutive Komponente des IKK Komplexes identifiziert (Chen et al. 2002).

Als weitere regulatorische Komponente des IKK Komplexes wurde das 105 kD große Protein ELKS vorgeschlagen (Ducut Sigala et al. 2004). Es kann sowohl mit IKK α und β interagieren, als auch mit IKK γ . Es wird eine Funktion in der Aktivierung des IKK Komplexes vermutet.

Die genetische Inaktivierung der I κ B Kinasen α und β in Mäusen zeigt deutliche Unterschiede in der Funktion der beiden Kinasen. Homozygote $ikk\beta^{-/-}$ „Knockout“-Mäuse sterben bereits als Embryonen an Tag 12-14, vermutlich aufgrund von massiver Apoptose der Leberzellen. In aus diesen Embryonen isolierten Fibroblasten ist keine Aktivierung von NF- κ B durch TNF α - oder IL-1-Stimulation möglich (Li et al. 1999a, Tanaka et al. 1999). Dahingegen sterben Mäuse mit inaktiviertem $ikk\alpha$ -Gen erst kurz nach der Geburt und zeigen einen auffälligen Phänotyp mit Skelett- und Hautabnormalitäten. Die Tiere haben eine dicke, glatte, hyperproliferierende Hautschicht. Die Aktivierung von NF- κ B durch TNF α ist nicht oder nur in geringem Maße beeinträchtigt (Hu et al. 1999, Li et al. 1999b, Takeda et al. 1999). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass IKK α und IKK β sich nicht gegenseitig ersetzen können und die NF- κ B-Aktivierung als Antwort auf unterschiedliche physiologische Signale vermitteln.

1.1.4 Aktivierung und Regulation des IKK Komplexes

Die beiden Kinasen des IKK Komplexes, IKK α und β besitzen wie andere Proteinkinasen in ihrer Kinasedomäne eine so genannte Aktivierungsschleife ("T-Loop"). Das Sequenzmotiv der Aktivierungsschleifen von IKK α und β ist identisch und besteht aus den Aminosäuren SLCTS. Diese Sequenz entspricht dem konservierten Aktivierungsmotiv von MAP Kinase Kinasen, SXXXS. Die Phosphorylierung beider Serinreste (S177 und S181) in IKK β führt zur Aktivierung der Kinase, während eine Mutation der beiden Aminosäuren zu Alanin eine Aktivierung verhindert (Mercurio et al. 1997). Ebenso verhält es sich für S176 und S180 in IKK α (Ling et al. 1998). Allerdings ist die Phosphorylierung des

Aktivierungsmotivs von IKK α nicht essenziell für die Aktivierung von NF- κ B durch proinflammatorische Stimuli (Delhase et al. 1999).

1.1.5 Aktivierung von IKK durch TNF α oder Interleukin-1 β (IL-1 β)

Die Aktivierung von NF- κ B durch die Entzündungsmediatoren TNF α und IL-1 β führt zur Transkriptionsaktivierung durch p50/p65 Heterodimere und stellt die am besten untersuchte Signalkaskade zur Aktivierung von NF- κ B dar (zur Übersicht Ghosh und Karin 2002, Hayden und Ghosh 2004). Beide Zytokine haben sehr ähnliche biologische Funktionen, führen aber über unterschiedliche Oberflächenrezeptoren zur Aktivierung des IKK Komplexes.

Die Bindung von TNF α an den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) führt zur Trimerisierung der Rezeptormoleküle, deren intrazellulärer Teil dann mit dem Adaptorprotein TRADD (TNF Receptor associated Death Domain) assoziieren kann (Hsu et al. 1995, Hsu et al. 1996b). Darüber wird die Rekrutierung der Proteine FADD (Fas Receptor associated Death Domain) (Chinnaiyan et al. 1995) oder TRAF2 (TNF Receptor associated factor 2) (Hsu et al. 1995) vermittelt. Während die Assoziation mit FADD zur Aktivierung von Caspase-Kaskaden und damit zu Apoptose führt, wird über TRAF2 das Rezeptor-interagierende Protein RIP gebunden, das für die Aktivierung von NF- κ B durch TNF α benötigt wird (Stanger et al. 1995, Hsu et al. 1996a, 1996b, Kelliher et al. 1998). RIP ist eine Serin-/Threonin Kinase, deren Kinaseaktivität jedoch für die Aktivierung des IKK Komplexes nicht erforderlich ist (Hsu et al. 1996a, Devin et al. 2000). Ergebnisse aus der Inaktivierung des Gens der MAPKKK MEKK3 weisen auf eine Rolle von MEKK3 zur Aktivierung von NF- κ B zwischen RIP und dem IKK Komplex hin; der genaue Mechanismus ist aber noch nicht bekannt (Yang et al. 2001).

Die Bindung von IL-1 β an den IL-1 Rezeptor (IL1R1) führt zur Heterodimerisierung des Rezeptors mit dem IL-1 Receptor associated protein (IL-1RacP) (Greenfeder et al. 1995). Zusammen mit MyD88 (*Myeloid Differentiation Factor*) wird die Serin-/Threonin Kinase IRAK (IL-1Receptor activated kinase) (Cao et al. 1996a, Wesche et al. 1997) und das Adaptorprotein TRAF6 rekrutiert (Cao et al. 1996b).

Zur Verknüpfung zwischen TRAF6 und der nachfolgenden IKK Aktivierung wurden verschiedene Vorschläge gemacht. Die Kinase TAK1 (Transforming growth factor activated kinase 1) wurde gemeinsam mit den beiden Adaptorproteinen TAB1 und TAB2 zusammen mit TRAF6 aufgereinigt (Takaesu et al. 2000). TRAF6 kann als

Ubiquitin-Ligase wirken und sich nach Stimulation selbst ubiquitinieren (Deng et al. 2000, Sun et al. 2004). Die Proteine TAB2 und TAB3 können anschließend an die Polyubiquitinketten binden und zur Aktivierung des IKK Komplexes beitragen (Kanayama et al. 2004). Das Protein ECSIT (*evolutionary conserved signaling intermediate in toll pathways*) wurde ebenfalls als Bindungspartner von TRAF6 gefunden und in RNA-Interferenz-Experimenten als notwendig für Toll-like-receptor (TLR) und IL-1 Signaltransduktion beschrieben (Kopp et al. 1999).

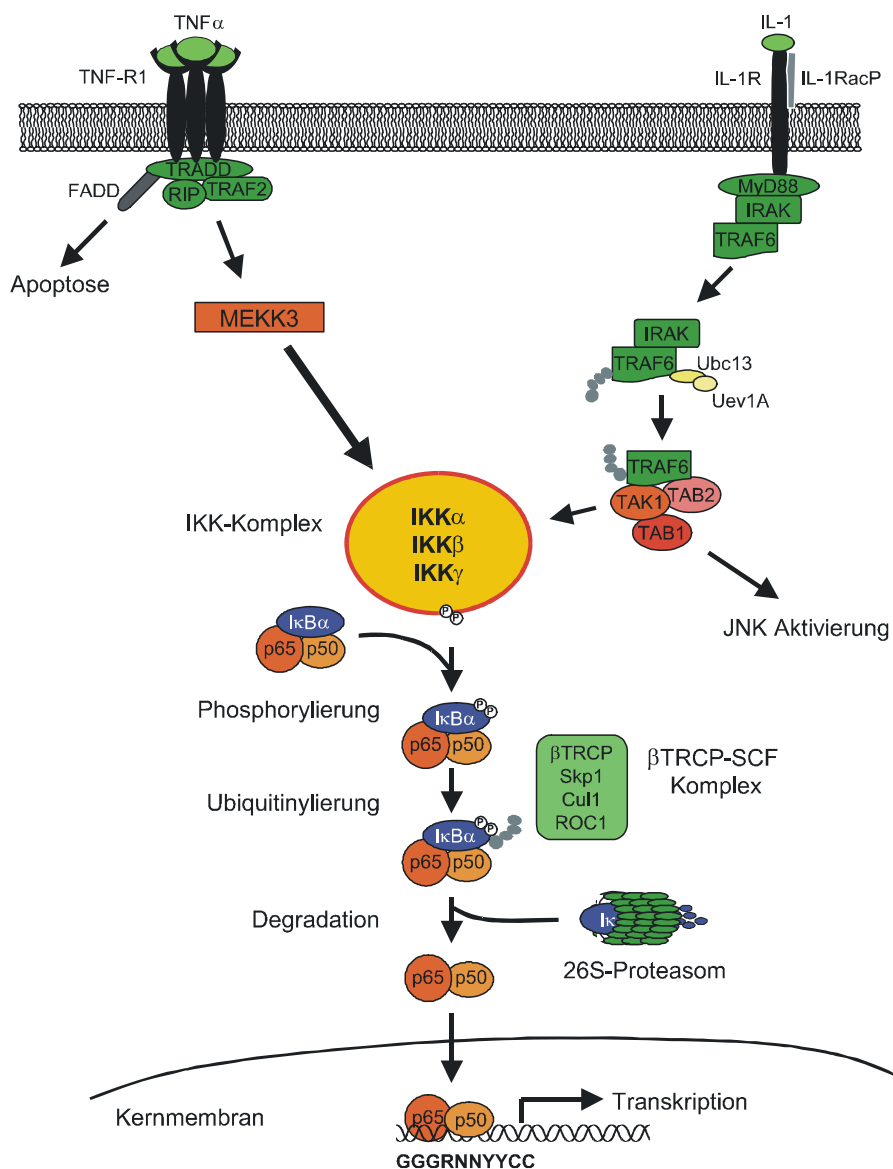


Abbildung 3: Aktivierung von IKK und NF- κ B durch TNF α und IL-1. Schematische Darstellung der an der Signaltransduktion über die Rezeptoren beteiligten Proteine und der zur Aktivierung von NF- κ B führenden Prozesse.

Ausgehend von Überexpressionsstudien wurden auch die Kinasen MEKK1 und NIK für die Aktivierung von IKK über TRAF ins Gespräch gebracht (Malinin et al. 1997, Baud et al. 1999). Dagegen spricht, dass genetische Inaktivierung von MEKK1 und NIK die IKK oder NF- κ B Aktivierung durch TNF oder IL-1 nicht beeinträchtigen (Shinkura et al. 1999, Xia et al. 2000, Yin et al. 2001).

1.1.6. Aktivierung von IKK und NF- κ B durch andere Stimuli

Analog zu der bereits beschriebenen Aktivierung über den IL-1 Rezeptor erfolgt die Aktivierung von IKK über die "Toll-like"-Rezeptoren (TLR). Diese Rezeptoren sind homolog zum Toll-Rezeptor aus *Drosophila* und werden für die Erkennung von mikrobiellen Oberflächenstrukturen wie Lipopolysaccharide (LPS), Peptidglykanen und Lipoproteinen benötigt (Krutzik et al. 2001). Die Aktivierung von NF- κ B durch LPS erfolgt zum Beispiel über den "Toll-like"-Rezeptor TLR4 (Chow et al. 1999).

Eine wichtige Rolle spielt die Aktivierung von IKK und NF- κ B in Zellen des Immunsystems. Die Aktivierung von NF- κ B nach Stimulation des B- und T-Zell-Rezeptors führt zur Antigen-spezifischen Proliferation und Reifung von Lymphozyten. Auch hier ist nicht genau geklärt, wie die Aktivierung des IKK Komplexes erfolgt. Die Stimulation des Rezeptors führt zur Rekrutierung von Adaptoren wie den Tyrosin-Kinasen der Syk-Familie, Lck und ZAP70. In den letzten Jahren wurden einige Proteine identifiziert, die für die Signalübertragung zum IKK Komplex eine Rolle spielen, dazu gehören PKC θ , CARMA1/CARD11, Bcl10 und MALT1 (zur Übersicht Lucas et al. 2004, Simeoni et al. 2004, Thome 2004), wenngleich auch hier der direkt aktivierende Schritt für die Aktivierung von IKK nicht bekannt ist. Insgesamt ist die Aktivierung von NF- κ B über den T-Zell-Rezeptor sehr viel langsamer als zum Beispiel über den TNFR1.

Einen anderen Aktivierungsmechanismus für NF- κ B wird für die Aktivierung durch UV-Bestrahlung vermutet (Bender et al. 1998, Li und Karin 1998). Die Degradation von I κ B α erfolgt sehr viel langsamer und scheint von einer Aktivierung des IKK Komplexes unabhängig zu sein. Die induzierbare I κ B α -Degradation konnte durch Mutation der beiden Serine 32 und 36 nicht gehemmt werden. Stattdessen wurde die Phosphorylierung von C-terminalen Serinresten durch Casein Kinase 2 (CK2) vorgeschlagen (Barroga et al. 1995, Lin et al. 1996, McElhinny et al. 1996, Kato et al. 2003).

Ein weiterer, anders verlaufender Aktivierungsmechanismus ist der so genannte "Alternative Pathway" (zur Übersicht Bonizzi und Karin 2004). Dieser ist unabhängig von IKK β und IKK γ (Claudio et al. 2002, Dejardin et al. 2002) und führt zur Prozessierung von p100. IKK α Homodimere phosphorylieren selektiv p100, das mit RelB assoziiert ist, so dass nach Prozessierung von p100 transkriptionell aktive NF- κ B Dimere aus p52 und RelB entstehen (Dejardin et al. 2002, Xiao et al. 2004). Die Aktivierung von IKK α erfolgt in diesem Fall durch die NF- κ B induzierende Kinase (NIK) (Senftleben et al. 2001, Xiao et al. 2001). Die Ereignisse, die zur Aktivierung von NIK führen sind jedoch unklar.

1.1.7 Inaktivierung des I κ B Kinase Komplexes und Autoregulation von NF- κ B

Die Aktivierung des IKK Komplexes und von NF- κ B ist normalerweise nur vorübergehend. Eine dauerhafte Aktivierung kann schädliche Folgen für die Zelle und den Organismus haben und die Ursache für verschiedene Krankheiten sein.

In den meisten Zelltypen erfolgt die Aktivierung (zum Beispiel über den TNF Rezeptor) innerhalb von 5-15 Minuten, nach ca. 15 Minuten ist die Degradation von I κ B α komplett. Zur schnellen Autoregulation erfolgt eine Autophosphorylierung der Helix-Loop-Helix (HLH) Region im C-terminalen Bereich von IKK α und IKK β (Delhase et al. 1999). Zur Reduktion der Kinaseaktivität könnte dann entweder eine durch die Phosphorylierungen induzierte Konformationsänderung oder die Rekrutierung einer Phosphatase führen.

Ein wichtiger Mechanismus zur Abschaltung von NF- κ B ist die Regulation der Gene für I κ B α und der Vorläuferproteine p100 und p105 durch NF- κ B selbst (Meyer et al. 1991, Ten et al. 1992, Brown et al. 1993, Cogswell et al. 1993, Le Bail et al. 1993, Sun et al. 1993, Ito et al. 1994, Liptay et al. 1994). Neu synthetisiertes I κ B α wandert in den Zellkern und bindet transkriptionell aktive NF- κ B Dimere. Dadurch erfolgt eine Dissoziation von der DNA und ein Export des trimeren Komplexes vermittelt durch ein Kernexportsignal (NES) von I κ B α (Arenzana-Seisdedos et al. 1997).

1.1.8 Deregulation des NF- κ B-Signalwegs in Tumorzellen

Aufgrund seiner Funktion in der Regulation von empfindlichen Prozessen wie Zellproliferation, Schutz vor Apoptose und Differenzierung stellt der NF- κ B-Signalweg einen möglichen Angriffspunkt für zelluläre Transformation dar. Ein virales Mitglied

der NF- κ B Familie, das Onkoprotein v-Rel des Rev-T-Retrovirus, verursacht in Vögeln Lymphome und Leukämien (Stephens et al. 1983, Rice et al. 1986). Vogel-Zelllinien können *in vitro* durch v-Rel transformiert und immortalisiert werden (Gilmore 1999). Andere onkogene Viren aktivieren NF- κ B als Teil des Transformationsprozesses, wie das Humane T-Zell Leukämie Virus Typ1 (HTLV-1) und das Epstein-Barr Virus (EBV) (Cahir McFarland et al. 1999, Sun und Ballard 1999). Chromosomale Aberrationen der humanen Gene für c-Rel, RelA, NF- κ B1 und NF- κ B2 wurden in einer Vielzahl von hematopoetischen und soliden Tumoren gefunden (zur Übersicht Rayet und Gélinas 1999).

Zunehmend werden Tumorzellen mit einer konstitutiven nukleären NF- κ B-Aktivität identifiziert. Diese Aktivität kann entweder durch eine Hyperaktivierung des Signalweges oder durch inaktivierende Mutationen in den regulatorischen I κ B Proteinen zustande kommen.

Ein gut untersuchtes Beispiel für eine Tumor-Erkrankung mit konstitutiver NF- κ B Aktivität ist das Hodgkin Lymphom.

1.1.9 Konstitutive NF- κ B-Aktivität im Hodgkin Lymphom

Die als Morbus Hodgkin bezeichnete Erkrankung (Hodgkin Disease, HD) ist ein malignes Lymphom. Charakteristisch ist das Vorkommen von multinukleären Reed-Sternberg Riesenzellen. Zusammen mit den mononukleären Hodgkinzellen stellen sie die malignen Zellen des Lymphoms dar, bilden aber weniger als 1% der Zellpopulation der betroffenen Lymphknoten. Die Hodgkin-/Reed-Sternberg (HRS) Zellen sind umgeben von Granulozyten, Plasmazellen und reaktiven Lymphozyten. Der Ursprung der HRS-Zellen war lange Zeit unklar, da sie Eigenschaften verschiedener hämatopoetischer Zellen zeigen. So können HRS-Zellen T-Zell-Marker wie CD2 oder CD4 exprimieren, B-Zell-Marker wie CD19 oder CD20, oder CD15 und c-fms, die als Kennzeichen myeloider Zellen gelten (Drexler 1993, Trumper et al. 1993). Auffällig ist jedoch, dass in den Zellen des häufigsten Hodgkin-Subtyps (Noduläre Sklerose) eine Umordnung der V, D und J Segmente im Gen der schweren Immunoglobulin-Kette stattgefunden hat, was auf eine Abstammung von B-Lymphozyten hinweist (Tamaru et al. 1994). Die Entdeckung von somatischen Mutationen in den umgeordneten Immunoglobulin-Genen lässt auf eine B-Zelle des Keimzentren- oder Post-Keimzentren-Stadiums als Vorläufer der Hodgkin-Zellen schließen, da somatische Mutationen typischerweise in diesem B-Zell-

Entwicklungsstadium in Immunglobulin-Gene eingeführt werden (Jacob et al. 1991). Allerdings gibt es auch seltene Hodgkin-Fälle, in denen eine Umordnung der Gene des T-Zell-Rezeptors stattgefunden hat und die somit auf eine transformierte T-Zelle zurückgehen (Müschen et al. 2000, Seitz et al. 2000). Welche primären Transformationsvorgänge die Entstehung der malignen Zellen jedoch auslösen, ist für beide Zelltypen bisher nicht bekannt.

In den letzten Jahren ist die Deregulation des NF- κ B Signalwegs als ein wichtiges Charakteristikum des Hodgkin-Lymphoms entdeckt und bestätigt worden (zur Übersicht Staudt et al. 2000). Sowohl in HRS-Zelllinien als auch in Primärproben wurde eine konstitutive nukleäre NF- κ B DNA-Bindungsaktivität von p50/p65-Heterodimeren festgestellt (Bargou et al. 1996). Dafür kommen verschiedene Ursachen in Frage.

Am wichtigsten ist vermutlich die dauerhafte Aktivität der I κ B Kinasen (Krappmann et al. 1999), die eine permanente Signalgebung zur Degradation des Inhibitors I κ B α zur Folge hat, was die damit verbundene nukleäre Lokalisation von aktiven NF- κ B Proteinen bewirkt. Die genauen Gründe für die konstitutive Kinaseaktivität sind nicht bekannt. Basierend auf Überexpressionsstudien wurde vorgeschlagen, dass starke CD30-Expression und die zytoplasmatische Aggregation von TRAF2 und TRAF5 IKK und NF- κ B in HRS-Zellen aktiviert (Horie et al. 2002a, Horie et al. 2002b). Eine weitere Möglichkeit ist die Aktivierung durch IL-13 (Skinnider et al. 2001), wobei das Gen für IL-13 selbst durch NF- κ B kontrolliert wird (Hinz et al. 2002).

In einigen Hodgkin-Fällen und den HRS-Zelllinien KM-H2 und L428 führen Mutationen im I κ B α -Gen dazu, dass nur instabile oder trunkierte I κ B α -Proteine vorhanden sind, die nicht mit NF- κ B Heterodimeren assoziieren können (Wood et al. 1998, Cabannes et al. 1999, Emmerich et al. 1999). In diesen Fällen beobachtet man jedoch zusätzlich auch immer konstitutive IKK Aktivität (Krappmann et al. 1999).

Bei etwa 50% der Hodgkin-Patienten wird eine Infektion mit Epstein-Barr-Virus (EBV) festgestellt (Weiss et al. 1987). Das virale Protein LMP1 (*Latent Membrane Protein 1*) wirkt wie ein aktivierter CD40-Rezeptor und führt so zur Aktivierung von NF- κ B (Herrero et al. 1995, Gires et al. 1997). Dennoch ist NF- κ B auch in den EBV-negativen Fällen permanent aktiviert.

Die konstitutive NF- κ B DNA-Bindungsaktivität in Hodgkin-/Reed-Sternberg-Zellen führt zur transkriptionellen Aktivierung einer großen Anzahl von Zielgenen, die die Eigenschaften der Zellen entscheidend prägen und somit eine wichtige Rolle für das

Krankheitsbild spielen. Zu den Zielgenen gehören Chemokine und Zytokine, Zelloberflächenrezeptoren, Apoptose-Regulatoren, Adhäsionsmoleküle, Signalmoleküle sowie Transkriptionsfaktoren (Hinz et al. 2001, Hinz et al 2002). Vor allem der Schutz vor Apoptose scheint eine Schlüsselfunktion der konstitutiven NF- κ B-Aktivität in HRS-Zellen zu sein. Die Expression von Zyto- und Chemokinen führt zu typischen klinischen und histopathologischen Eigenschaften der Hodgkin-Erkrankung, die mit einer anormalen Immunantwort einhergehen. Die Infiltration von Immunzellen in befallene Lymphknoten und deren Aktivierung wird parakrinen Mechanismen durch die Expression von Zytokinen/Chemokinen und Adhäsionsmolekülen zugeschrieben.

Neben der konstitutiven Aktivierung des NF- κ B Signalwegs zeigen HRS-Zellen auch eine ständige Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1, die unabhängig von MAP Kinase Signalgebung ist (Mathas et al. 2002). Einige der in HRS-Zellen hochregulierten Gene werden durch NF- κ B und AP-1 gemeinsam reguliert.

Aufgrund der fundamentalen Bedeutung von NF- κ B für die Hodgkin-Erkrankung stellt die pharmakologische Intervention in dieses Signalsystem eine wichtige Therapiemöglichkeit dar. Inhibition von IKK durch As₂O₃ führte zu verstärkter Apoptose von HRS-Zellen *in vitro* und zum Rückgang von xenotransplantierten L540Cy-Tumoren in NOD/SCID-Mäusen (Mathas et al. 2003).

1.2 Molekulare Chaperone

Während der Synthese eines Proteins wird die noch ungefaltete Polypeptidkette ins Lumen des Endoplasmatischen Reticulums frei gesetzt. Dabei besteht die Gefahr, dass es zur Bildung von intra- und intermolekularen Aggregaten von hydrophoben Peptidsegmenten kommt, bevor eine Faltung des Proteins in seine native Konformation erfolgen kann. Proteine, die spezifisch ungefaltete Peptidketten binden und damit eine Aggregation verhindern, nennt man molekulare Chaperone (zur Übersicht: Walter und Buchner 2002). Geschützt durch das Chaperon wird Zeit für die Faltung des Proteins gewonnen. Die Dauer bis zur Freisetzung des Substratproteins wird durch einen ATPase-abhängigen Zyklus des Chaperons bestimmt. Der ADP-Chaperon-Komplex besitzt eine hohe Affinität für ungefaltete Polypeptidketten, aber nicht für native Proteine. Die Bindung eines entfalteten Peptidsegments führt zur Freisetzung von ADP und dem Eintritt von ATP in die Nukleotid-Bindungsstelle des Chaperons. Anschließend wird das Peptidsegment aus dem Komplex entlassen und die Hydrolyse des ATP versetzt das Chaperon wieder in die Lage, ein ungefaltetes Segment zu binden (Erbse et al. 2004).

Homologieuntersuchungen zeigen, dass sich die meisten molekularen Chaperone in fünf Klassen gliedern lassen, die nahezu ubiquitär zu finden sind. Gemeinsam haben diese Proteine die Fähigkeit, hydrophobe Oberflächen ihrer Substratproteine zu erkennen und zu binden. Chaperone werden auch als Hitzeschockproteine (Hsp) bezeichnet, da ihre Expression durch zelluläre Stressbedingungen, wie zum Beispiel Hitzestress, induziert wird (Ellis et al. 1987). Viele der so genannten Hitzeschockproteine sind allerdings auch wichtiger konstitutiver Bestandteil der Zelle. Am stärksten als aktive Faltungshelfer wirken die Proteine der Hsp60-Familie. Dazu gehören das *E. coli* Protein GroEL und das humane Protein CCT (*chaperonin containing the T-complex polypeptide-1*). Diese Proteine bilden hocholigomere Komplexe, in denen sie aggregationsanfällige Proteine schützen und die Faltungsreaktion unterstützen (Hartl 1995, Fink 1999).

Die umfangreichste Klasse wird von den Hsp70-Proteinen gebildet, die für eine Vielzahl zellulärer Prozesse benötigt werden, wie zum Beispiel die Translokation von Proteinen durch Membranen (Ungermann et al. 1994), die Rückfaltung von aggregierten Proteinen (Goloubinoff et al. 1999) und den Schutz des Cytoskeletts bei Hitzeschock (Liang und MacRae 1997). Mitglieder der Hsp70-Familie sind das

Hsp70-Protein im Cytosol von Säugerzellen, BiP im Endoplasmatischen Reticulum von Eukaryoten, Grp75 in Mitochondrien sowie DnaK im Cytosol von Bakterien.

Die "kleinen Hitzeschockproteine" (15-42 kD) bilden dynamische, oligomere Strukturen und sind vor allem dafür erforderlich, Aggregationsprozesse zu vermeiden oder zu kontrollieren (Haslbeck 2002).

Den Hsp100-Proteinen wird die Funktion zugeschrieben, bereits bestehende Aggregate wieder aufzulösen und die darin enthaltenen Proteine mit Hilfe anderer Chaperone (Hsp70 und Hsp40) wieder zurückzufalten (Glover und Lindquist 1998, Goloubinoff et al. 1999).

Hsp90-Proteine haben neben der grundsätzlichen Fähigkeit, nicht-native Proteine zu stabilisieren, die Funktion, die Reifung komplexer Proteine zu fördern. Viele Substratproteine von Hsp90 sind Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren oder Steroidhormonrezeptoren und an Signaltransduktionsprozessen in der Zelle beteiligt (Pratt 1997). Hsp90-Proteine besitzen eine N-terminale ATP-Bindungsstelle (Prodromou et al. 1997) sowie eine C-terminale Dimerisierungsdomäne. (Meng et al. 1996) Neben Hsp90 im Cytosol von Eukaryoten existieren Grp94 im Endoplasmatischen Reticulum und Hsp90 in Bakterien (Gupta et al. 1995, Bardwell und Craig 1987). Das Protein TRAP-1 wurde bisher in *A. thaliana*, *D. dictyostelium*, *D. melanogaster* und *H. sapiens* gefunden; es wird in die Mitochondrien importiert und ähnelt strukturell den prokaryotischen Hsp90-Proteinen. (Song et al. 1995, Cechetto und Gupta 2000, Felts et al. 2000) Ein pflanzliches Hsp90-Protein wurde in Chloroplasten nachgewiesen (Schmitz et al. 1996).

1.2.1 Hsp90 im eukaryotischen System

In Eukaryoten ist Hsp90 das häufigste lösliche cytosolische Protein (1% des Gesamtproteins), mit zellulären Konzentrationen je nach Zelltyp von 10-150 μM (Lai et al. 1984, Nollen und Morimoto 2002) und es wird nur in geringem Umfang durch Hitzeschock induziert. Während Prokaryoten nur ein Hsp90-codierendes Gen besitzen, kennt man bei *S. cerevisiae* zwei Gene für nahezu identische Hsp90-Isoformen. Dagegen tritt bei *C. elegans* und *D. melanogaster* jeweils nur eine Form auf, bei *A. thaliana* sind es vier (Krishna und Gloor 2001). Bei Vertebraten werden durchgängig zwei cytosolische Hsp90-Isoformen gefunden, die in eine *alpha*- und eine *beta*-Gruppe eingeteilt werden und innerhalb dieser Gruppen stark konserviert sind. Die Expression ist differenziell reguliert: Hsp90 β ist nicht durch Hitzestress

induzierbar, sondern durch Wachstumsfaktoren reguliert (Hansen et al. 1991, Ripley et al. 1999). Die Expression von Hsp90 α dagegen ist durch den Hitzeschockfaktor HSF kontrolliert und durch Hitzeschock induzierbar (Zhang et al. 1999).

Hsp90 ist essenziell für das Überleben von Hefezellen (Borkovich et al. 1989), von *Drosophila* (van der Straten et al. 1997, Yue et al. 1999) und von *C. elegans* (Birnbay et al. 2000). In Hefezellen ist eine der beiden Hsp90-Isoformen für das Überleben der Zellen ausreichend (Borkovich et al. 1989). In Mäusen, bei denen nur das Hsp90 β -Gen deletiert wurde, sterben die Embryonen aufgrund letaler Fehler bei der Plazentaentwicklung (Voss et al. 2000).

Dagegen verursacht die Deletion von HtpG bei *E. coli* lediglich einen temperatursensitiven Phänotyp (Bardwell und Craig 1988).

1.2.2 Partnerproteine (Ko-Chaperone) von Hsp90

In allen untersuchten cytosolischen eukaryotischen Hsp90-Systemen wurden spezifische akzessorische Proteine nachgewiesen, so genannte "Ko-Chaperone" oder Partnerproteine. Über diese Partnerproteine wird in vielen Fällen eine stabile Bindung des Substrats vermittelt. Durch die Assoziation mehrerer Partnerproteine entstehen Multi-Chaperon-Komplexe, die Hsp90 auch mit Hsp70 verbinden können. Daran beteiligt sind zum Beispiel die Proteine Hsp40, Hip und Hop. Hip ist ein Hsp70-spezifischer Ko-Faktor, der auch die ATPase-Aktivität von Hsp70 reguliert (Frydman und Höhfeld 1997). Die Funktion von Hop (p60) scheint hauptsächlich in der Verknüpfung der Chaperon-Komplexe von Hsp70 und Hsp90 zu liegen, um den Transfer von Substraten zwischen den beiden Systemen zu gewährleisten. Wie auch andere Partnerproteine von Hsp90 besteht Hop zu einem Großteil aus Helix-*turn*-Helix *Tetratricopeptiderepeat*-(TPR)-Motiven, die häufig eine spezifische Interaktion von Proteinen vermitteln (Chen und Smith 1998, Johnson et al. 1998).

Die Bindungsstelle für TPR-Domän-enthaltende Ko-Chaperone liegt im äußersten C-terminalen Bereich von Hsp90. Die Ubiquitin-Ligase CHIP (*Carboxyl-terminus of Hsc70 interacting protein*) bindet über ein TPR-Motiv sowohl an Hsp70 als auch an Hsp90 und verknüpft die Chaperon-Komplexe mit der proteasomalen Degradationsmaschinerie (Connell et al. 2001). So wird eine Qualitätskontrolle der Chaperon-Substratproteine ermöglicht.

Weitere Partnerproteine von Hsp90 in höheren Eukaryoten mit eigener Chaperon-Aktivität sind p23 und die Prolylisomerasen FKBP51, FKBP52 und Cyp40.

Das Partnerprotein Cdc37/p50 wurde ausschließlich in Komplexen mit Proteinkinasen gefunden und beeinflusst in diesen Komplexen auch den Hsp90-Chaperon Zyklus (Siligardi et al. 2002). Kürzlich wurde ein weiteres Partnerprotein von Hsp90 identifiziert, HARC, das zu 31% mit Cdc37 identisch ist, jedoch keine Kinasen bindet (Scholz et al. 2001).

1.2.3 Struktur und Funktion von Hsp90

Für Hsp90 sind drei wichtige Domänen beschrieben worden: eine im aminoterminalen Bereich des Proteins lokalisierte 25 kD große ATP-Bindungsdomäne, eine strukturell flexible Mittelregion (35 kD) und eine 12 kD umfassende Dimerisierungsdomäne im carboxyterminalen Teil (Prodromou et al. 1997, Stebbins et al. 1997, Maruya et al. 1999). Zwischen der N-terminalen ATP-Bindungsdomäne und dem mittleren Bereich befindet sich eine hydrophile Verbindungsregion, die hauptsächlich aus Aminosäuren mit geladenen Seitenketten besteht. Die Dimerisierung über den C-terminalen Bereich führt zu einem länglichen antiparallelen Homodimer von Hsp90-Proteinen (Maruya et al. 1999).

Die Bindung von Substratproteinen an Hsp90 erfolgt vermutlich an den mittleren Bereich von Hsp90 (Sato et al. 2000, Fontana et al. 2002, Meyer et al. 2003). Nachdem lange Zeit Zweifel darüber herrschten, ob Hsp90 in der Lage sei, ATP zu hydrolysieren, konnte diese Frage durch die Aufklärung der Kristallstruktur der N-terminalen Domäne von Hsp90 beantwortet werden (Prodromou et al. 1997, Stebbins et al. 1997). In einem Strukturmotiv, das vorher nur bei der GyraseB bekannt war (Bergerat et al. 1997, Wigley et al. 1991), wird das ATP-Molekül so in einer Spalte gebunden, dass nur das γ -Phosphat dem Lösungsmittel zugänglich ist. Das gebundene Nukleotid wird mit einer sehr geringen Hydrolyserate hydrolysiert, bei Hsp90 aus *S. cerevisiae* und *E. coli* mit 0,5 ATP pro Minute, bei humanem Hsp90 ist die Rate sogar um den Faktor 10 geringer (McLaughlin et al. 2002, Owen et al. 2002). Allerdings wird durch die Bindung eines Substratproteins die Hydrolyserate vermutlich deutlich erhöht (McLaughlin et al. 2002).

Des Weiteren wurde eine zweite, C-terminale ATP-Bindungsstelle identifiziert, die eine niedrigere Affinität besitzt und sich nur öffnet, wenn die N-terminale Bindungsstelle besetzt ist (Marcu et al. 2000, Garnier et al. 2002, Soti et al. 2002). Auch für eine für die ATP-Hydrolyse essenzielle Konformationsänderung wird der C-terminale Bereich benötigt. Die Bindung von ATP führt zu einer Assoziation der N-

terminalen Domänen eines Hsp90-Dimers, so dass das ATP-Molekül eingeschlossen wird (Prodromou et al. 2000). Diese Beobachtungen wurden mit Hsp90 aus Hefe gemacht. Für das humane Hsp90-Protein wurden etwas andere Schlussfolgerungen aus biophysikalischen Messungen gezogen (McLaughlin et al. 2004). Die N-terminale Dimerisierung scheint nicht unbedingt benötigt zu werden. Stattdessen wurde eine Veränderung der Konformation nach Bindung von ATP vorgeschlagen, die möglicherweise die Bindung von Substratproteinen erleichtert.

Wie reguliert nun die ATPase-Aktivität die Bindung von Substratproteinen an Hsp90? Es wird vermutet, dass – in Analogie zur Gyrase – die ATP-gebundene Form von Hsp90 eine "molekulare Klammer" um das Substrat oder einzelne Domänen des Substrats bildet. Das Öffnen dieser "Klammer" wird durch die Hydrolyse des ATP erreicht (Prodromou et al. 2000).

1.2.4 Hsp90 Substratproteine

Die Anzahl der Proteine, für die eine Assoziation mit Hsp90 nachgewiesen wurde, steigt stetig an. Dabei sind im Gegensatz zu anderen Chaperonen die Mehrzahl der bekannten Hsp90 Substrate Proteine, die in der zellulären Signaltransduktion eine Rolle spielen, wie Steroid Hormon Rezeptoren und Proteinkinasen (Picard et al. 1990, Xu und Lindquist 1993). Hsp90 wird für die Aktivität und Stabilität dieser Substratproteine benötigt und hat daher eine wichtige Funktion für zahlreiche Signalwege in der Zelle.

Im Fall der Steroid Hormon Rezeptoren bindet Hsp90 an die inaktive cytosolische Form des Rezeptors. Dabei fungiert das Chaperon nicht als Repressor, sondern hält den Rezeptor in einem inaktiven, aber durch Hormonbindung aktivierbaren Zustand. Die Bindung des Steroid Hormons führt zur Dissoziation von Hsp90 und Dimerisierung des Rezeptors (Pratt 1997).

Die erste Kinase, die als Hsp90 Substrat identifiziert wurde, war die virale pp60^{src} Kinase (v-Src). Auch hier bindet Hsp90 eine inaktive, lösliche Vorstufe der Kinase, während die aktive, Membran-gebundene Form nicht mit Hsp90 assoziiert ist (Xu und Lindquist 1993).

Ein gemeinsames Strukturmotiv der Hsp90 Substratproteine konnte bisher nicht identifiziert werden. Es wird vermutet, dass ein besonderer Faltungszustand für die Assoziation mit Hsp90 verantwortlich ist (Jakob und Buchner 1994, Buchner 1996).

Kinasen	Transkriptionsfaktoren	Andere Proteine
<p>Akt/PKB Aurora B</p> <p>Bcr-Abl Casein kinase IIa, catalytic subunit Cdk4, Cdk6, Cdk9 Chk1 c-Mos Death domain kinase RIP1 eEF-2 kinase eIF2-α kinases HRI, Gcn2, Perk, PKR ErbB2 and mutant EGF-receptor</p> <p>Flt3 GRK2</p> <p>IκB kinases α, β γ and ϵ</p> <p>Insulin receptor Ire1 KSR Lkb1</p> <p>MEK MEKK1 and MEKK3</p> <p>Mik1</p> <p>MLK3 MOK, MAK, MRK NIK Nucleophosmin-Anaplastic Lymphoma kinase PDK1 Pim-1 Pik1 Plk1 Pp60v-src, c-src src related Tyrosin-Kinasen: yes, fps, fes, fgr, lck Raf-1, B-Raf, Ste11 TAK1 TBK1 trkB VEGFR2 Wee1, Swe1</p>	<p>12(S)-HETE receptor all vertebrate steroid-receptors (GR, MR, ER, PR, AR) CAR cytoplasmic v-erbA PPARα (PPARβ) PXR Hap1 HSF-1 Mal63 p53 PAS family members: Dioxin Rezeptor (=AhR), Sim, HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α Stat3 water mold <i>Achlya</i> steroid (antheridiol) receptor</p>	<p>Annexin II ANP receptor</p> <p>Apaf-1 ApoB Bid Calcineurin (Cna2, catalytic subunit) Calmodulin Calponin CFTR Ctf13/Skp1 component of CBF3 cytoskelettal proteins: Actin, Tubulin , Myosin DNA Polymerase α eNOS, nNOS (?)</p> <p>ether-a-gogo-related cardiac potassium channel free $\beta\gamma$ subunit of G-protein Gα_0, Gα_{12} GERp95 glutathion S-transferase subunit 3 (KS-type) Histone H1, H2A, H2B, H3, H4 knob complexes (in the membrane of Plasmodium-infected erythrocytes) macromoleculare aminoacyl-tRNA synthetase complex Macrophage scavenger receptor Mdm2 MMP2 MTG8</p> <p>NB-LRR proteins RPM1 und RPS2 Neuropeptide Y P2X$_7$ purinergic receptor PB2 subunit of influenza RNA pol. Proteasom Rab-αGDI</p> <p>Ral-binding protein 1 reovirus protein σ1 reverse transcriptase of hepatitis B virus SKP2 complexes Survivin SV40 large T-antigen Tau-protein telomerase thiopurine S-methyltransferase Thrombin receptor (PAR-1) TLR4/MD-2 complex Vaccinia core protein 4a</p>

Tabelle 1: Hsp90-abhängige Proteine

Nach D. Picard, <http://www.picard.ch/DP/Hsp90interactors.pdf>, Stand Dezember 2004.

1.2.5 Der Chaperon-Zyklus von Hsp90

Hsp90 kann in ATP- oder ADP-gebundener Form vorliegen. Der Wechsel zwischen beiden Formen ermöglicht die Bindung unterschiedlicher Ko-Chaperone und die Regulation von Substratproteinen. Die meisten Untersuchungen zum so genannten Chaperon-Zyklus von Hsp90 wurden mit Steroidhormon-Rezeptoren durchgeführt (Smith et al. 1990, Dittmar et al. 1997, Dittmar et al. 1998, Kosano et al. 1998). Man geht jedoch davon aus, dass der Chaperon-Zyklus für Kinase-Substrate von Hsp90

ähnlich abläuft. Zunächst assoziiert ein Hsp90-Substratprotein mit einem Hsp70/Hsp40-Chaperon-Komplex (Hernandez et al. 2002). Die Verbindung zu Hsp90 erfolgt über das Ko-Chaperon Hop, das sowohl mit Hsp70 als auch mit Hsp90 interagieren kann (Chen und Smith 1998, Johnson et al. 1998). Dieses geschieht in der ADP-gebundenen Konformation von Hsp90. Durch die Bindung von ATP erfolgt eine Konformationsänderung, die zur Freisetzung von Hop und Hsp40/Hsp70 führt und die Assoziation von anderen Ko-Chaperonen wie p23, Immunophilinen oder Cdc37 ermöglicht (Isaacs et al. 2003). In diesem "reifen" Komplex kann das Substratprotein dann durch Bindung eines Liganden (Steroidhormonrezeptoren) oder als Reaktion auf einen Stimulus (Kinasen) aktiviert werden. Dabei wirkt Cdc37 inhibierend auf die ATPase-Aktivität von Hsp90 (Siligardi et al. 2002). Erfolgt keine Aktivierung des Substratproteins, wird durch ATP-Hydrolyse die Komplex-Zusammensetzung wieder zugunsten der Ko-Chaperone verändert, die präferenziell an die ADP-gebundene Form von Hsp90 binden. Das Substratprotein liegt dann wieder in einer inaktiven Form vor und kann über Ubiquitinierung für proteasomale Degradation markiert werden.

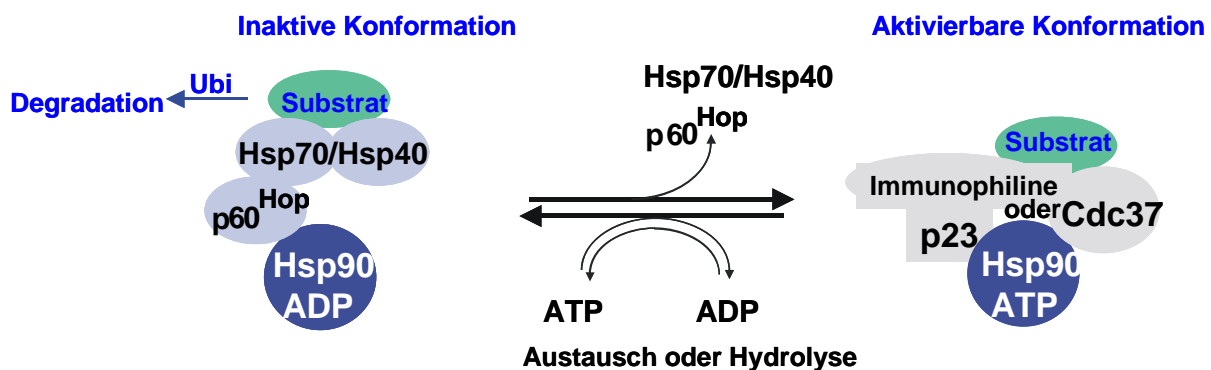


Abbildung 4: Modell für den Chaperon-Zyklus von Hsp90.
Erläuterung im Text

1.2.6 Hsp90 und Cdc37 als Kinase-spezifische Chaperone

Wie oben aufgeführt (siehe Tabelle 1), ist für eine große Anzahl an Kinasen eine Assoziation mit Hsp90 beschrieben worden. In fast allen Fällen wurde außerdem das 50 kD Protein Cdc37 gefunden, das als Kinase-spezifisches Partnerprotein von Hsp90 gilt. Während sich in der Mehrzahl der Hsp90-Kinase-Komplexe also auch Cdc37 befindet, scheint es umgekehrt auch Fälle zu geben, in denen Cdc37 alleine

zu einer Stabilisierung des Substratproteins führt (Scholz et al. 2000, Lee 2002, Tatebe und Shiozaki 2003). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass Cdc37 auch für Proteine eine Rolle spielt, die keine Kinasen sind (Fliss et al. 1997, Rao et al. 2001, MacLean und Picard 2003).

Cdc37 wurde ursprünglich als Kandidaten-Gen für Zellzyklus-Mutanten in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert (Reed 1980) und erst später als Partnerprotein von Hsp90 erkannt (Cutforth und Rubin 1994). Cdc37 besteht aus einer N-terminalen Kinase-Bindungsstelle und einem C-terminalen Bereich, über den die Hsp90-Bindung erfolgt (Grammatikakis et al. 1999). In Circular dichroismus-Messungen und analytischer Ultrazentrifugation wurde Cdc37 als Dimer gesehen (Siligardi et al. 2002), so dass sich zumindest *in vitro* ein $(\text{Hsp90})_2\text{-(Cdc37)}_2$ -Komplex bilden kann (Roe et al. 2004).

Cdc37 beeinflusst aktiv den Hsp90 ATPase-Zyklus (ähnlich wie auch das Ko-Chaperon Hop/Sti) (Prodromou et al. 1999, Siligardi et al. 2002, Richter et al. 2003) und begünstigt dadurch die Bindung des Substratproteins an Hsp90. Durch Aufklärung der Struktur des Hsp90-Cdc37-Komplexes konnte der Mechanismus verstanden werden: Cdc37 hält den "Deckel" der Nukleotid-Bindungsstelle in einer offenen Position und verzögert so die ATP-Hydrolyse. Gleichzeitig hält Cdc37 die "Arme" der "molekularen Klammer" offen, so dass das Substratprotein im mittleren Bereich von Hsp90 gebunden werden kann. Das anschließende Lösen der C-terminalen Domäne von Cdc37 aus der "Klammer" des Hsp90-Proteins scheint erforderlich, damit der ATP-Zyklus fortgesetzt werden kann (Roe et al. 2004).

Für die Bindung von Kinasen, nicht jedoch für die Interaktion von Cdc37 mit Hsp90, soll die Phosphorylierung des Serins an Position 13 von Cdc37 durch CK2 (*Casein Kinase II*) von Bedeutung sein. Allerdings führt die Inhibition der Cdc37-Phosphorylierung auch zu einer Beeinträchtigung der Kinase-Hsp90-Interaktion (Shao et al. 2003b, Miyata und Nishida 2004).

In welcher Weise Hsp90 und Cdc37 – neben allgemeiner Chaperon-Funktion – die Aktivierung von Kinasen beeinflussen, ist nicht genau bekannt. Möglich ist, dass sie die Kinasen in einer aktivierbaren Konformation halten, wie zum Beispiel bei der Häm-regulierten eIF2 α -Kinase (Shao et al. 2001). Die Rekrutierung von Aktivatoren oder Adaptorproteinen ist eine weitere mögliche Aufgabe.

1.2.7 Hsp90-Inhibitoren

Ein wichtiges Mittel zur Untersuchung von Hsp90-Funktion und Hsp90-Abhängigkeit von Substratproteinen sind natürliche und synthetische Hsp90-Inhibitoren. Die in Aktinomyzeten gefundenen so genannten Benzoquinon-Ansamycine Geldanamycin, Herbimycin und Macbecin wurden zunächst für Tyrosinkinase-Inhibitoren gehalten. Tatsächlich binden sie an die ATP-Bindungsstelle von Hsp90 und blockieren damit die ATPase-Aktivität (Whitesell et al. 1992, Whitesell et al. 1994, Prodromou et al. 1997). Der Eingriff in den Hsp90-Chaperon-Zyklus hat zur Folge, dass die Substratproteine nicht mehr in eine aktivierbare Form gebracht werden können, sondern in den meisten Fällen proteasomal degradiert werden. Die Kristallisation eines Geldanamycin-Hsp90-Komplex erfolgte durch Stebbins et al. (Stebbins et al. 1997).

Zwei synthetische Derivate von Geldanamycin, 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) und das wasserlösliche 17-Desmethoxy-17-N,N-dimethylaminoethylamino-geldanamycin (17-DMAG), wurden für den klinischen Einsatz von Hsp90-Inhibitoren entwickelt (siehe unten).

Das von Streptomyces gebildete Radicicol ist strukturell nicht mit den Benzoquinon-Ansamycinen verwandt, bindet jedoch ebenfalls an die ATP-Bindungsstelle von Hsp90 und inhibiert ATPase abhängige Vorgänge von Hsp90 (Roe et al. 1999).

Eine Gruppe von kleinen Molekülen, die eine ähnliche Struktur wie an Hsp90 gebundenes ATP haben, wurden als neue Hsp90-Inhibitoren entwickelt. Dazu gehört zum Beispiel das Purin PU3, das in vielen Eigenschaften mit den klassischen Hsp90-Inhibitoren übereinstimmt (Chiosis et al. 2003).

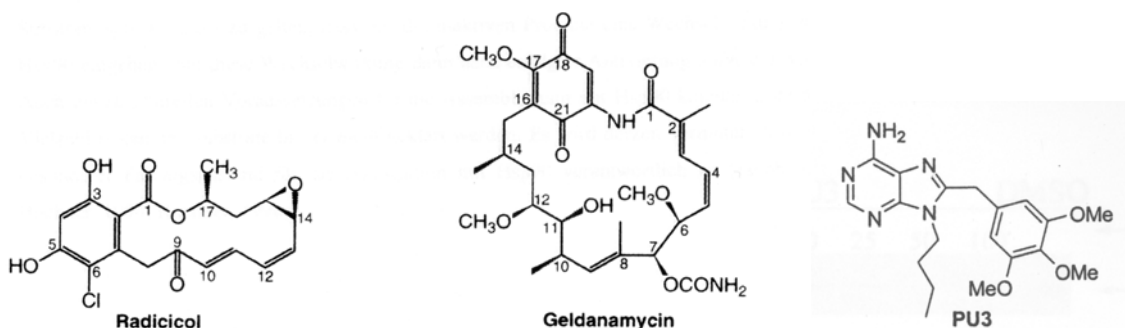


Abbildung 5: Strukturformeln von Radicicol, Geldanamycin und PU3.

1.2.8 Hsp90 als Ziel pharmakologischer Intervention

Eine Vielzahl von Hsp90 Substratproteinen sind an zellulären Prozessen wie Zellzykluskontrolle (Cdk4, Polo-1 Kinase), Zellproliferation, MAPK Signaltransduktion (Raf-1, MEK) und der Regulation weiterer Signalwege beteiligt. Da diese Vorgänge in vielen Fällen eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung und für das Tumorwachstum spielen, bietet sich durch den Einsatz von Hsp90-Inhibitoren in der Krebstherapie die Möglichkeit, mehrere Ziele gleichzeitig anzugreifen (zur Übersicht: Maloney und Workman 2002).

Der Mechanismus der antitumoralen Wirkung von Hsp90-Inhibitoren liegt vermutlich im Zusammenspiel mehrerer Faktoren und ist außerdem abhängig vom molekularen Hintergrund der Tumorzellen. In einer Vielzahl von Tumorzellen wurde durch Hsp90-Inhibition die Blockade von Signalwegen beobachtet, was zu Veränderungen des Zellzyklus und zu Apoptose führen kann (Hostein et al. 2001, Munster et al. 2001).

Eingriffe in die Zellzykluskontrolle sind über verschiedene Signalwege denkbar. So ist die Transkription von Cyclin D1 gesteuert über Ras und ERK, deren Aktivatoren c-Raf1 und Rezeptor-Tyrosinkinase wie ErbB2 Hsp90-Substratproteine sind, ebenso wie auch der EGF-Rezeptor. Einfluss auf die Translation von Cyclin D1 hätte die durch Hsp90-Inhibition bewirkte Depletierung von Akt/PKB im Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Signalweg. Die Blockade beider Signalwege durch 17-AAG wurde in Colon-Krebszelllinien gezeigt (Hostein et al. 2001). Des Weiteren sind einige Kinasen als Hsp90-Substrate identifiziert worden, die am Kontrollpunkt der G2-Phase des Zellzyklus beteiligt sind, wie WEE1, MYT1 und Polo-1 Kinase (PLK) (Goes und Martin 2001, De Carcer 2004). Auch Tubulin ist abhängig von Hsp90 (Garnier et al. 1998), so dass Geldanamycin oder 17-AAG wie klassische Mikrotubuli-Inhibitoren auch eine Blockade der Mitose verursachen könnten.

Hitzeschock-Proteine sind am Schutz der Zelle vor Apoptose in Stresssituationen beteiligt. Dabei könnten Hsp70 und Hsp90 die Funktion haben, Apoptose zu verhindern, um der Zelle Zeit für die Reparatur von Stress-induzierten Schäden zu geben (Maloney und Workman 2002). Die Behandlung von humanen Leukämie-Zellen mit Geldanamycin verursachte die Degradation der Tyrosin-Kinase Bcr-Abl und von Akt/PKB, was zu verstärkter Apoptose und Differenzierung der Zellen führte (Nimmanapalli et al. 2001). Auch in anderen Zelltypen wurde Apoptose nach Depletion der Kinase Akt beobachtet (Hostein et al. 2001), wobei auch hier wieder ein Zusammenwirken verschiedener molekularer Ereignisse wahrscheinlich ist.

Obwohl Hsp90 in großer Menge in fast allen Zelltypen vorhanden ist, akkumulieren Ansamycine als Hsp90-Inhibitoren selektiv in humanen Tumor-*Xenografts in vivo* (Workman 2003). Für Hsp90 aus Tumorzellen wurde eine bis zu 100fach erhöhte Bindungsaffinität zu 17-AAG im Vergleich zu Hsp90 aus normalen humanen Zellen gemessen. Ein Grund könnte sein, dass die gesamte Menge an Hsp90 in Tumorzellen im Komplex mit den Ko-Chaperonen p23 und Hop vorliegt, während es in normalen Zellen größtenteils ungebunden ist. Die absoluten Mengen dieser Proteine und von Hsp90 unterscheiden sich jedoch nicht. Auch die ATPase-Aktivität von Tumor-Hsp90 ist erhöht (Kamal et al. 2003). Diese Befunde verstärken die Relevanz für den Einsatz von Hsp90-Inhibitoren in der Krebsbehandlung.

Da Geldanamycin wegen Lebertoxizität (Supko et al. 1995) nicht als Medikament verwendet werden kann, wurde das besser verträgliche Derivat 17-AAG in einem gezielten *Screening-Ansatz* des *US National Cancer Institute* gefunden (Schulte und Neckers 1998) und wird derzeit in umfangreichen klinischen Tests eingesetzt.

1.2.9 Die Rolle von Hitzeschock-Proteinen im NF- κ B-Signalweg

Wie alle Proteine benötigen auch die Komponenten des NF- κ B-Signalwegs die Funktion von Chaperonen zur korrekten Faltung während der Proteinsynthese. Darüber hinaus gibt es jedoch Hinweise auf spezifische Beteiligung von verschiedenen Hitzeschock-Proteinen an Prozessen, die zur Aktivierung oder Repression von NF- κ B führen.

Die Bedeutung von Hsp90 für die Aktivierung von NF- κ B wurde durch die Verwendung des spezifischen Hsp90-Inhibitors Geldanamycin erkannt. So hemmt die Vorbehandlung mit Geldanamycin die Taxol- und LPS-induzierte Aktivierung von NF- κ B in Makrophagen sowie die TNF α -Produktion (Byrd et al. 1999). In Milz-Zellen wurde die Inhibition der Mitogen-induzierten NF- κ B-Aktivierung nach Geldanamycin-Behandlung beobachtet (Sugita et al. 1999).

Erste Anhaltspunkte für einen direkten Einfluss auf Komponenten des NF- κ B-Signalwegs wurden mit der Identifikation der Kinase RIP1 (*Receptor interacting protein*) als Hsp90 Substratprotein gefunden (Lewis et al. 2000). Geldanamycin bewirkt den Verlust der TNF α -induzierten I κ B-Kinase-Aktivierung und I κ B α -Degradation, was durch die Degradation des für TNF α -Signaltransduktion benötigten Proteins RIP1 erklärt wird.

Durch Hitzeschock kann die Aktivierung von NF- κ B verhindert werden. Die Ursache dafür ist vermutlich unter anderem die verstärkte Expression von Hsp70, die durch den Transkriptionsfaktor HSF-1 (*Heat shock factor 1*) gesteuert wird (Guzhova et al. 1997, Curry et al. 1999, Andres et al. 2002, Malhotra und Wong 2002). Die Hitzeschock unabhängige Überexpression von Hsp70 in Zellen reduziert die Aktivität der I κ B Kinasen und die Transkription eines NF- κ B-abhängigen Reportergens (Ran et al. 2004). Der Grund dafür ist die Assoziation von Hsp70 mit der regulatorischen Untereinheit des IKK-Komplexes, IKK γ . Dabei bindet Hsp70 an die *Coiled-Coil*-Region von IKK γ , die für die tetramere Oligomerisierung von IKK γ essenziell ist (Tegethoff et al. 2003). Durch die Verhinderung der Oligomerisierung wird die NF- κ B-Aktivierung blockiert.

Ein weiteres Hitzeschock-Protein, für das eine Assoziation mit dem IKK Komplex beschrieben wurde, ist das zur Gruppe der kleinen Hitzeschock-Proteine gehörende Hsp27. Hsp27 interagiert in nicht stimulierten HeLa-Zellen mit IKK α und IKK β . Durch Stimulation der Zellen mit TNF α wird die Bindung von IKK β verstärkt, während die Menge an gebundenem IKK α konstant bleibt. Die Behandlung der Zellen mit Interleukin-1 hat keinen Effekt auf die Assoziation von IKK β mit Hsp27. Die Überexpression von Hsp27 führt zu einer Suppression der TNF α - und IKK β -induzierten Aktivierung von NF- κ B, während die Reduktion des zellulären Hsp27 durch inhibitorische RNA-Moleküle (*siRNA*) die Verstärkung der NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation zur Folge hat (Park et al. 2003). Hsp27 scheint folglich die Rolle eines negativen Regulators für den NF- κ B-Signalweg einzunehmen.

Der I κ B Kinase Komplex spielt eine Schlüsselrolle für die Regulation des NF- κ B-Signalwegs. Deshalb stellt die Identifizierung molekularer Mechanismen, die der transienten Aktivierung unter normalen physiologischen Bedingungen und der konstitutiven Aktivierung des IKK Komplexes in transformierten Tumorzellen zugrunde liegen, einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Signalwegs dar.

Das Hitzeschockprotein Hsp90 wurde als Ko-Faktor vieler Kinasen identifiziert, die an Signaltransduktionsvorgängen beteiligt sind. Daher stellte sich die Frage, ob Hsp90 auch für die Stabilisierung und Aktivierung des IKK Komplexes eine Rolle spielt und darüber die Regulation des NF- κ B Signalwegs beeinflusst. Es sollte die transiente Aktivierung durch proinflammatorische und mitogene Stimuli untersucht werden, aber

auch die konstitutive Aktivierung des IKK Komplexes in den malignen Zellen des Hodgkin-Lymphoms. In Bezug auf die Deregulation von NF- κ B in transformierten Zellen sollte ermittelt werden, ob die Hsp90-Inhibition neue Möglichkeiten der pharmakologischen Intervention für diesen Signalweg eröffnen könnte.