

4. Zusammenfassung / Summary

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B bestimmt die Aktivität von Genen in Immun- und Stressreaktion, Wachstum und Entwicklung. In der Regulation des zur Aktivierung von NF- κ B führenden Signalwegs spielt der I κ B Kinase (IKK) Komplex eine Schlüsselrolle. Alle bekannten aktivierenden Signale konvergieren in der Aktivierung dieses Komplexes. Die I κ B Kinasen steuern die Phosphorylierung und anschließende Degradation des NF- κ B-Inhibitorproteins I κ B α , was die Translokation von NF- κ B-Proteinen und die Transkription von Zielgenen bewirkt.

Das Hitzeschockprotein Hsp90 ist ein spezialisiertes Chaperon, das besonders die Reifung komplexer Proteine wie Steroidhormonrezeptoren und Kinasen fördert. Zusammen mit dem Ko-Chaperon Cdc37 beeinflusst Hsp90 auch die Aktivität von Kinasen.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Hsp90 und Cdc37 auf die Stabilität und Aktivierbarkeit des IKK Komplexes untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass Hsp90 auf zwei verschiedenen Ebenen für die Funktion des IKK Komplexes benötigt wird, zum einen für die Aktivierung der Kinasen, zum anderen für deren Biosynthese.

Die Aktivierung von NF- κ B und IKK durch IL-1 β , TNF α und Phorbolester wird durch Hsp90-Inhibition mit den spezifischen Inhibitoren Geldanamycin (GA) und Radicol gehemmt. Eine Untersuchung des Zeitverlaufs der Inhibition ergab, dass bereits nach 60-minütiger Vorbehandlung mit GA die I κ B-Kinaseaktivität beeinträchtigt war, während nach 14-stündiger Vorbehandlung eine komplette Hemmung, einhergehend mit dem Verlust an IKK α und IKK β Protein, zu beobachten war. In *Pulse Chase* Experimenten wurde nachgewiesen, dass Hsp90 für die Biosynthese von IKK α und IKK β benötigt wird. IKK-Proteine, die ohne Hsp90 synthetisiert werden, sind instabil und werden ubiquitiniert und durch das 26S Proteasom abgebaut.

Davon unabhängig wird schon nach kurzer Inhibition von Hsp90 die Phosphorylierung der Aktivierungsschleife von IKK und die Aktivität von ektopisch exprimiertem IKK β -Protein beeinträchtigt, was eine Rolle von Hsp90 im direkten Aktivierungsprozess des IKK Komplexes vorschlägt. Des Weiteren beeinflusst auch die Koexpression des Kinase-spezifischen Ko-Chaperons Cdc37 die Aktivität von IKK α und IKK β . Verkürzte Mutanten von Cdc37, die nicht mehr in der Lage ist, Hsp90 zu binden, wirken dominant-negativ auf die Aktivität ektopisch exprimierter I κ B Kinasen.

Die malignen Zellen des Hodgkin Lymphoms, Hodgkin-/Reed-Sternberg (HRS) Zellen, sind durch konstitutive Aktivität des IKK-/NF- κ B-Systems charakterisiert. Die Ursachen, die zur Aktivierung des IKK Komplexes in diesem System führen, sind nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass Hodgkin-/Reed-Sternberg Zellen Faktoren sezernieren, die auf parakrine Weise NF- κ B aktivieren können, und dass es sich dabei um TNF α und TNF β (LT α) handelt. Diese Zytokine sind aber nicht verantwortlich für eine autokrine Aktivierung von NF- κ B in HRS Zellen. Dies konnte ein Experiment mit neutralisierenden Antikörpern zeigen.

Die Tatsache, dass die Inhibition von Hsp90 durch Geldanamycin auch die konstitutive Aktivität der I κ B Kinasen in HRS-Zellen hemmt, gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass Hsp90 eine generelle Funktion darin hat, den IKK Komplex in einer aktivierbaren Konformation zu halten oder die Aktivierung durch weitere Faktoren zu vermitteln.

Die Inhibition von Hsp90 beeinflusst außerdem die Expression von NF- κ B-Zielgenen in HRS Zellen und führt zu verstärkter Apoptose. Diese Ergebnisse identifizieren Hsp90 als ein neues pharmakologisches Ziel in neoplastischen Erkrankungen, die durch konstitutive IKK-/ NF- κ B-Aktivität charakterisiert sind.

The transcription factor NF- κ B determines the activity of genes involved in immune- and stress-response, proliferation and development. The key regulator of the signaling pathway leading to activation of NF- κ B is the I κ B kinase (IKK) complex. Activating signals from different receptors converge at the IKK complex and trigger phosphorylation and subsequent degradation of the NF- κ B inhibitor protein I κ B α . This leads to nuclear translocation of NF- κ B proteins and transcription of target genes.

The heat shock protein Hsp90 is a specialised chaperone which promotes the maturation of specific client proteins (most of them involved in signal transduction) such as steroid hormone receptors and kinases. Together with the co-chaperone Cdc37 it influences the activity of kinases.

In the present work the requirement of Hsp90 and Cdc37 for the stability and activation process of the IKK complex was investigated. A dual role of Hsp90 for the function of the IKK complex was discovered, on one hand for the activation of the kinases, and on the other hand for the biosynthesis of IKK α and IKK β .

Activation of IKK and NF- κ B by IL-1 β , TNF α and phorbol ester was blocked by pre-treatment of cells with the specific Hsp90 inhibitors Geldanamycin (GA) and Radicicol. Time course analysis revealed a first drop in kinase activation after only 60 min. of GA treatment, while a complete inhibition combined with the depletion of IKK α and IKK β protein level was detected after 14 h of Hsp90 inhibition. *Pulse Chase* experiments further evidenced that Hsp90 is an essential factor for the biosynthesis of IKK α and IKK β . IKK proteins which are synthesised without being chaperoned by Hsp90 become ubiquitinated and are degraded by the 26S proteasome.

Furthermore it was shown that after short time inhibition of Hsp90, the activation loop phosphorylation of cellular IKK and the activity of ectopically expressed IKK β was strongly decreased, independent of the impaired biosynthesis. These results suggest a role of Hsp90 directly in the activation process of the IKK complex.

In addition, the co-expression of the kinase-specific Hsp90 co-chaperone Cdc37 influences the activity of IKK α and IKK β . Truncated mutants of Cdc37, which are no longer capable of Hsp90 binding, act as dominant negative mutants on the activity of ectopically expressed I κ B kinases.

The malignant cells of Hodgkin's lymphoma, Hodgkin-/Reed-Sternberg (HRS) cells, are characterised by constitutive activity of the IKK-/NF- κ B system. The causes leading to constitutive activation of the IKK complex in this system are unknown so far. In this work it was shown that HRS cells produce factors that activate NF- κ B in a paracrine way. These factors were identified as TNF α and TNF β (LT α). However, an experiment with neutralising antibodies demonstrated that these cytokines are not responsible for activation of NF- κ B in HRS cells in an autocrine manner.

The fact that the inhibition of Hsp90 by GA also blocks the constitutive activity of the I κ B kinases in HRS cells gives a further hint to a general function of Hsp90 in activation of the IKK complex, such as keeping it in a particular, receptive conformation, or mediate the activation by upstream factors.

Consequences of Hsp90-dependent inhibition of the constitutive NF- κ B activity in HRS cells were reduced expression of NF- κ B target genes and increased apoptosis. These results identify Hsp90 as a novel drug target in neoplastic diseases associated with constitutive IKK-/NF- κ B activity.