

2. Ergebnisse

2.1 Untersuchung der Aufgaben von Hsp90 für den NF- κ B-Signalweg

2.1.1 Die Aktivierung von NF- κ B und IKK durch pro-inflammatorische und mitogene Stimuli benötigt die Funktion von Hsp90

Die Regulation von zellulären Signalwegen hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab. Die Bedeutung des Hitzeschockproteins Hsp90 für stressinduzierte Signaltransduktion ist an einer Reihe von Beispielen demonstriert worden (siehe Richter und Buchner 2001). Um die Funktion von Hsp90 für die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen 14 h mit dem spezifischen Hsp90-Inhibitor Geldanamycin (GA) vorbehandelt und anschließend mit TNF α , IL-1 β oder Phorbol ester (PMA) stimuliert.

Der Einfluss auf die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B wurde im Gelretardations-Experiment ("*Electrophoretic Mobility Shift Assay*", EMSA) überprüft. Die Induktion der NF- κ B-Aktivität durch TNF α , IL-1 β und PMA wurde durch die Hsp90-Inhibition deutlich blockiert. Dagegen wurde die konstitutive DNA-Bindungsaktivität des als Kontrolle getesteten Transkriptionsfaktors Oct1 nicht durch Hsp90-Inhibition beeinträchtigt (Abb. 6).

Für die Induktion der NF- κ B DNA-Bindungsaktivität nach Stimulation mit proinflammatorischen und mitogenen Agenzien ist die Aktivität der I κ B Kinasen (IKK) Bedingung. Deshalb wurde in einem *in vitro* Kinase-Experiment getestet, ob Hsp90 für die Aktivierung der I κ B Kinasen benötigt wird. Aus Zellextrakten aus GA-behandelten HeLa-Zellen wurde mit einem gegen IKK α gerichteten monoklonalen Antikörper spezifisch der IKK-Komplex präzipitiert und dieser zusammen mit 32 P- γ -ATP und rekombinantem GST-I κ B α inkubiert. Die Aktivität der Kinase wird über die Menge an radioaktiv phosphoryliertem GST-I κ B α gemessen. Der Versuch zeigt deutlich, dass die Aktivierung von IKK durch TNF α , IL-1 β und PMA nicht erfolgen kann, wenn die Funktion von Hsp90 durch die Behandlung der Zellen mit Geldanamycin inhibiert wurde (siehe Abb. 6 unten).

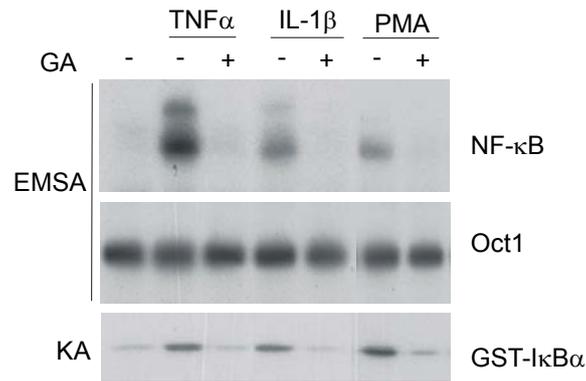


Abbildung 6: Hsp90 wird für die Aktivierung von IKK und NF- κ B benötigt. HeLa-Zellen wurden für 14 h mit 0,5 μ M GA vorbehandelt und anschließend für 15 Min. mit TNF α oder IL-1 β bzw. 30 Min. mit PMA stimuliert. Die DNA-Bindungsaktivität für NF- κ B und Oct1 (als Kontrolle) wurde im EMSA bestimmt. Die Aktivität von immunpräzipitiertem IKK α -Protein wurde im *in vitro* Kinase-Versuch (Kinase Assay, KA) an der Phosphorylierung des Substratproteins GST-I κ B α gemessen.

Um die Spezifität der beobachteten Effekte zu überprüfen, wurde eine weitere Substanz getestet, die als spezifischer Inhibitor für Hsp90 beschrieben ist. Radicicol (RC) ist ein makrozyklisches Antibiotikum, das wie GA an die ATP-Bindungsdomäne von Hsp90 bindet und dadurch die ATPase-Aktivität inhibiert, strukturell aber keine Ähnlichkeit mit GA hat. Namalwa B-Zellen wurden 14 h mit RC vorbehandelt und mit TNF α , IL-1 β und PMA stimuliert. Die Inhibition der induzierten IKK-Aktivität wurde wie bereits für die mit GA behandelten HeLa-Zellen in einem *in vitro* Kinase-Versuch überprüft (Abb. 7). Man erkennt, dass auch in einem anderen Zelltyp Hsp90 für die Aktivierung des IKK-Komplexes durch proinflammatorische und mitogene Stimuli benötigt wird. Allerdings wurde in den mit RC behandelten Proben deutlich weniger IKK α präzipitiert, wie der Kontroll-Western Blot zeigt, jedoch ist dies vermutlich nicht der alleinige Grund für die komplett verhinderte Kinaseaktivierung.

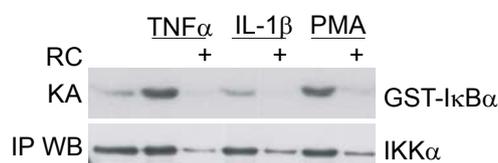


Abbildung 7: Die Aktivierung von IKK in Namalwa-Zellen ist Hsp90-abhängig und durch Radicicol inhibierbar. Namalwa-Zellen wurden für 14 h mit dem Hsp90-Inhibitor Radicicol (RC) behandelt und nachfolgend mit TNF α , IL-1 β oder PMA für 10 Min. stimuliert. Die IKK-Aktivität wurde im *in vitro* Kinase-Experiment (KA) bestimmt. Die Menge an präzipitiertem Kinase wurde im Western Blot überprüft (IP WB).

Der Einsatz eines zweiten Hsp90-Inhibitors demonstriert, dass der Einfluss auf die NF- κ B Aktivierung nicht durch unspezifische Effekte der Substanz Geldanamycin verursacht wird.

Im Gegensatz zum IKK-Komplex wird die Aktivierung der MAPK JNK1 (c-Jun-N-terminale Kinase) durch PMA nicht durch Hsp90-Inhibition beeinflusst, wie in einem *in vitro* Kinase-Versuch mit GST-Jun (1-79) als Substrat überprüft wurde (Abb. 8).

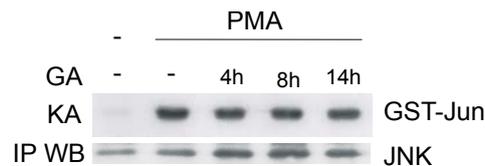


Abbildung 8: Die Aktivierung der Kinase JNK durch PMA wird nicht durch Hsp90-Inhibition beeinflusst. Namalwa-Zellen wurden für 0, 4, 8 oder 14 h mit Geldanamycin (GA) vorbehandelt und für 10 Min. mit PMA stimuliert. JNK1 wurde aus den Zellextrakten immunopräzipitiert und die Kinase-Aktivität im Kinase-Versuch (KA) mit GST-Jun als Substrat bestimmt. IP WB zeigt die Menge der präzipitierten Kinase, die durch GA-Behandlung leicht erhöht wird.

2.1.2 Hsp90 spielt eine zweifache Rolle für den IKK-Komplex: Aktivierbarkeit und Stabilität der I κ B-Kinasen

Da nach 14-stündiger Behandlung mit den Hsp90-Inhibitoren neben der Inhibition von transienter NF- κ B-Aktivierung ein Verlust an IKK α -Protein beobachtet wurde, wurde die Zeitabhängigkeit von Kinase-Inhibition und Verlust an IKK-Proteinen untersucht. Namalwa- und HeLa-Zellen wurden für 4, 8 oder 14 h mit GA vorbehandelt und anschließend mit TNF α oder PMA stimuliert. Zum einen wurde der Einfluss auf die Aktivität des IKK-Komplexes im *in vitro* Kinase-Versuch gemessen, zum anderen das Level von IKK α , IKK β , IKK γ sowie RIP1 in den Zellextrakten im Western Blot kontrolliert (Abb. 9). Dabei erkennt man deutlich, dass bereits nach 4-stündiger Behandlung mit GA ein Rückgang der IKK-Aktivität in allen untersuchten Zelllinien zu verzeichnen ist. Eine vollständige Hemmung sowohl der transienten als auch der konstitutiven IKK-Aktivität wird erst nach 14 h GA-Behandlung erreicht und geht einher mit einem Verlust an IKK α und IKK β -Protein. Auch die bereits beschriebene Destabilisierung von RIP1 (Lewis et al. 2000) konnte beobachtet werden, während die Menge von IKK γ nur in geringem Ausmaß durch die Hsp90-Inhibition beeinflusst wurde.

Die Stärke der Effekte auf Proteinebene variiert je nach Zelltyp. In Namalwa-Zellen war die Destabilisierung der Kinasen und von RIP1 sehr viel stärker zu beobachten

als in HeLa-Zellen, wo erst nach 14-stündiger GA-Behandlung ein Rückgang in der Menge an IKK α , IKK β und RIP1 zu erkennen ist. Trotzdem zeigt der Kinase-Versuch auch in HeLa-Zellen einen Rückgang der I κ B-Kinase-Aktivität bereits nach 4- und 8-stündiger Vorbehandlung mit GA. In Namalwa-Zellen fällt das Level von IKK α nach 8 h GA-Behandlung ab und nach 14 h ist so gut wie kein IKK α mehr vorhanden. Dagegen ist die Menge an IKK β und RIP1 bereits nach 4-stündiger Hsp90-Inhibition stark reduziert. Dieser Protein-Verlust sollte auch zu der bereits nach 4 h verminderten Kinase-Aktivität beitragen, wenngleich dies vermutlich nicht die Hauptursache sein dürfte, da auch in HeLa-Zellen ein früher Rückgang der Kinase-Aktivität zu verzeichnen ist, während die Proteinmenge der Kinasen noch weitgehend unbeeinflusst ist. Ein Verlust an RIP1 sollte zudem nur den TNF-Signalweg betreffen, die TNF-induzierte NF- κ B-Aktivierung ist aber im gleichen Umfang wie IL-1 (Abb. 6, Abb. 11) und PMA-induzierte IKK-Aktivität betroffen.

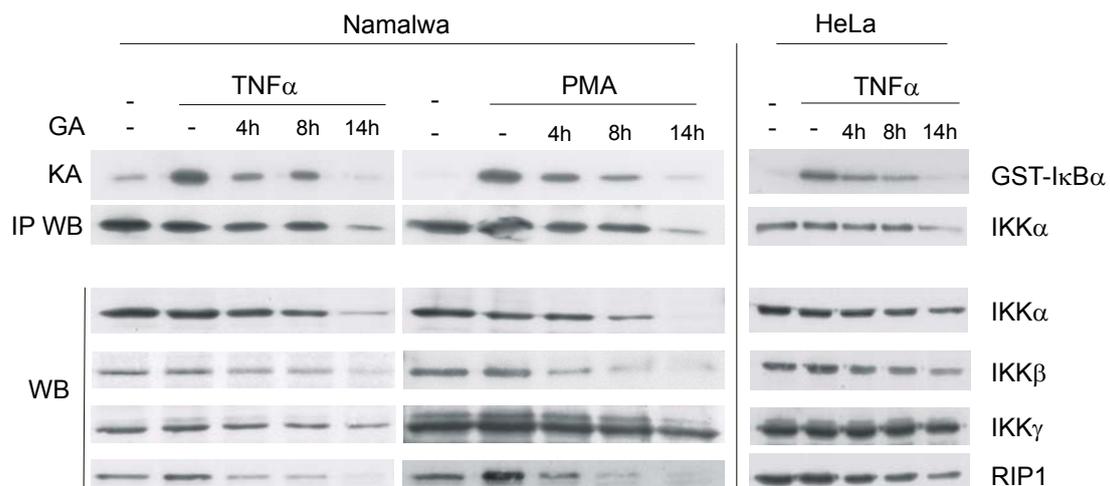


Abbildung 9: Zeitverlauf der Inhibition und Depletierung von IKK nach Hsp90-Inhibition. Namalwa- und HeLa-Zellen wurden wie angegeben mit GA vorbehandelt und für 10 Min. mit TNF α oder PMA stimuliert. Die Aktivität von immunopräzipitiertem IKK α -Protein (IP WB) wurde im Kinase-Versuch bestimmt (KA). Der Einfluss der Hsp90-Inhibition auf die Stabilität der Proteine IKK α , IKK β , IKK γ und RIP1 wurde im Western Blot (WB) getestet.

2.1.3 Assoziation von Hsp90 mit dem IKK-Komplex

Geldanamycin inhibiert die ATPase-Aktivität von Hsp90 und beeinflusst darüber die Bindung von Hsp90 an Substratproteine. Von Chen et al. (Chen et al. 2002) wurden Hsp90 und das Ko-Chaperon Cdc37 als konstitutive Bestandteile des IKK-Komplexes identifiziert.

Um die Bedeutung der Bindung von Hsp90 an den IKK Komplex im Rahmen der beobachteten Effekte auf Kinase-Aktivierung und IKK-Destabilisierung zu

untersuchen, wurden Ko-Immunopräzipitationen nach verschieden langer GA-Behandlung von Namalwa- und HeLa-Zellen (nicht gezeigt) durchgeführt (Abb. 10). Der IKK Komplex wurde über einen polyklonalen Antikörper gegen IKK γ präzipitiert, da die Menge bzw. Stabilität von IKK γ im Vergleich zu IKK α und β durch Hsp90-Inhibition weitgehend unbeeinflusst war. Die Bindung von Hsp90 an den IKK Komplex wurde nach 8 bzw. 14 h GA-Inkubation aufgehoben. Die Proteinmenge von Hsp90 und IKK γ im Ausgangsmaterial blieb unverändert, dagegen wurde wie bereits oben beschrieben nach 14 h Hsp90-Inhibition ein Rückgang an IKK α und β Protein beobachtet. Die Kinaseaktivität des IKK Komplexes wird bereits deutlich früher beeinträchtigt als die Interaktion mit Hsp90. Das lässt vermuten, dass zur Aktivierung der Kinasen eine Funktion von Hsp90 benötigt wird, die schnell durch GA oder RC inhibiert wird, aber nicht in direktem Zusammenhang mit der Bindung an den IKK Komplex steht.

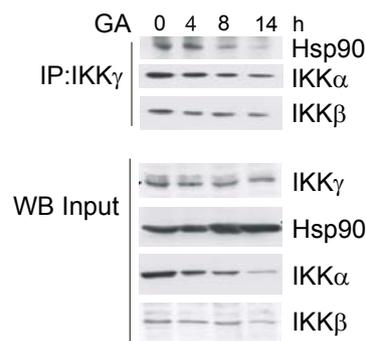


Abbildung 10: Zeitabhängige Zerstörung der Interaktion von IKK mit Hsp90 durch GA. 8×10^6 Namalwa-Zellen wurden wie angegeben mit dem Hsp90-Inhibitor GA inkubiert und anschließend der IKK-Komplex mit einem Antikörper gegen IKK γ präzipitiert. Die Interaktion von Hsp90, IKK α und IKK β (IP:IKK γ) mit dem IKK-Komplex sowie der Einfluss der Hsp90-Inhibition auf die Proteinlevel im Ausgangsmaterial (WB Input) wurden im Western Blot untersucht.

2.1.4 Einfluss von Kurzzeit-Hsp90-Inhibition auf die Aktivität des IKK-Komplexes

Um die Erfordernis von Hsp90 für die Aktivierung der I κ B Kinasen unabhängig von den beobachteten Effekten auf ihr Proteinlevel zu untersuchen, wurden kurze Inkubationen (30 Min. bis 4 h) mit GA und RC durchgeführt, da in diesem Zeitraum noch keine nennenswerte Abnahme der Proteinmenge von IKK α und β festgestellt worden war.

Es wurde die Aktivierung des IKK Komplexes durch IL-1 β nach Behandlung der Zellen mit GA bzw. RC für 30 Min. bis zu 240 Min. untersucht (Abb. 11). Bereits nach

einer 60-minütigen Vorinkubation mit GA ist die Kinaseaktivierung durch IL-1 β stark beeinträchtigt und die Aktivität entspricht etwa der basalen, nicht stimulierten Aktivität in HeLa-Zellen.

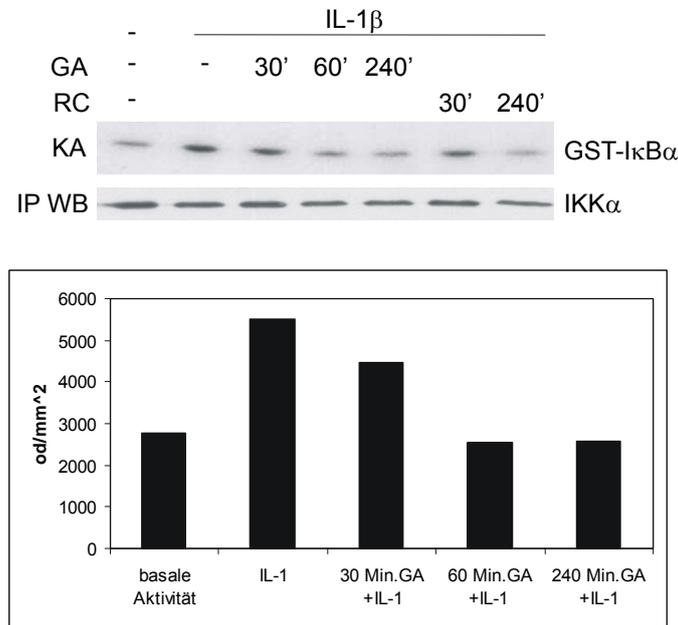


Abbildung 11: Die Aktivierung von IKK durch IL-1 β ist schon nach kurzer Inhibition von Hsp90 beeinträchtigt. HeLa-Zellen wurden für 30-240 Min. mit GA oder Radicol (RC) vorbehandelt und dann für 8 Min. mit IL-1 β inkubiert. Die Aktivität von IKK α wurde im *in vitro* Kinase-Experiment (KA) bestimmt. Die Menge der präzipitierten Kinase (IP WB) wird nicht durch die Hsp90-Inhibition vermindert. Zur Bestimmung der Bandenintensität wurde die Optische Dichte pro mm² mit dem Programm TINA ermittelt und im Balkendiagramm dargestellt (unten).

Für die Aktivierung der Kinasen IKK α und β muss die Phosphorylierung ihrer Aktivierungsschleife (*T-Loop*) erfolgen. Diese Aktivierung kann mit einem speziellen Phospho-spezifischen Antikörper (Cell Signaling) nachgewiesen werden, der nur die phosphorylierte Aktivierungsschleife von IKK α und β erkennt. HeLa-Zellen wurden ohne GA oder nach 1- oder 4-stündiger GA-Vorbehandlung mit TNF α stimuliert. Man erkennt die Induktion der Aktivierungsschleifen-Phosphorylierung durch TNF (Abb. 12). Durch Hsp90-Inhibition (insbesondere nach 4 h) wird diese Phosphorylierung vermindert, was mit der geringeren Aktivität der Kinasen nach 60-240 Min. GA-Behandlung übereinstimmt. Dieses Ergebnis zeigt, dass Hsp90 nicht nur für die Stabilität der Kinasen benötigt wird, sondern auch für die Aktivierung des IKK-Komplexes eine Rolle spielt. Da nicht geklärt ist, durch welches Ereignis der IKK-Komplex letztlich aktiviert wird und ob die Aktivierungsschleifen-Phosphorylierung durch eine andere Kinase oder durch Trans-/Autophosphorylierung erfolgt, sind hierbei verschiedene Funktionen für Hsp90 denkbar.

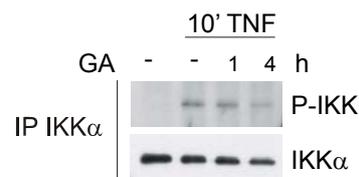


Abbildung 12: Hsp90 wird für die Phosphorylierung der Aktivierungsschleife von IKK benötigt. HeLa-Zellen, die 0, 1 oder 4 h mit GA vorbehandelt wurden, wurden für 10 Min. mit $\text{TNF}\alpha$ stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach der Immunopräzipitation von $\text{IKK}\alpha$ wurde die Phosphorylierung der Aktivierungsschleife im Western Blot mit einem Antikörper detektiert, der spezifisch $\text{IKK}\alpha$ und β erkennt, welches an der Aktivierungsschleife phosphoryliert wurde.

Um direkte Effekte von Geldanamycin auf die IKK-Aktivität ausschließen zu können, wurde GA direkt mit rekombinantem, gereinigtem $\text{IKK}\beta$ -Protein in einem *in vitro* Kinase-Experiment eingesetzt. $\text{IKK}\beta$ ist nach Überexpression auch ohne Stimulus aktiv und die Kinaseaktivität wurde durch die Zugabe von GA (bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle) nicht gehemmt. GST- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ mit einer Mutation in der durch $\text{IKK}\beta$ phosphorylierten Sequenz (Serin 32 und 36) wird nicht phosphoryliert (Abb. 13).

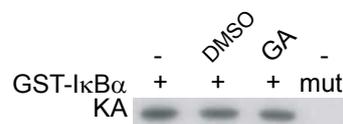


Abbildung 13: GA inhibiert nicht direkt die Kinaseaktivität von $\text{IKK}\beta$. Rekombinant exprimierte und gereinigte $\text{I}\kappa\text{B}$ Kinase β ist ohne Aktivierung aktiv. $\text{IKK}\beta$ wurde mit GST- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, ^{32}P - γ -ATP und DMSO (Lösungsmittelkontrolle), GA oder H_2O für 30 Min. bei 37°C inkubiert. „mut“ gibt den Einsatz einer S32/36A-Mutante von GST- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ an, die nicht durch IKK phosphoryliert werden kann. Die Aktivität von $\text{IKK}\beta$ wird nicht durch GA inhibiert.

In einem weiteren Experiment wurde überprüft, ob auch ektopisch exprimiertes $\text{IKK}\beta$ -Protein die Funktion von Hsp90 benötigt. Die Auswirkungen der Hsp90-Inhibition auf die Aktivität von ektopisch exprimiertem $\text{IKK}\beta$ -Protein wurde mit oder ohne Koexpression der regulatorischen Untereinheit $\text{IKK}\gamma$ untersucht (Abb. 14A). In beiden Fällen reduzierte eine 4-stündige Inkubation mit GA deutlich die Fähigkeit von $\text{IKK}\beta$, GST- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ im *in vitro* Kinase-Versuch zu phosphorylieren. Bei überexprimierter $\text{I}\kappa\text{B}$ Kinase β erkennt man zusätzlich zur $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Phosphorylierung Autophosphorylierung von $\text{IKK}\beta$. Bei Koexpression von $\text{IKK}\gamma$ wird auch $\text{IKK}\gamma$ phosphoryliert. Diese Trans-/Autophosphorylierung wird ebenfalls durch Hsp90-Inhibition verhindert, was einen

weiteren Hinweis darauf erbringt, dass Hsp90 für die Aktivierbarkeit und die Konformation des IKK Komplexes direkt benötigt wird. Die überexprimierte Kinase IKK β ist *per se* aktiv und benötigt keine Aktivierung über Rezeptorstimulation. Deshalb zeigen diese Ergebnisse, dass IKK β direkt von Hsp90 abhängig ist, und der beobachtete Effekt nicht auf die Hsp90-Abhängigkeit von weiteren Signalmolekülen zurückzuführen ist.

Eine Ko-Immunopräzipitation lieferte das Ergebnis, dass auch die ektopisch exprimierten Kinasen mit zellulärem Hsp90 assoziiert sind, was den hemmenden Effekt von GA auf die Aktivität der ektopisch exprimierten Kinasen erklärt (Abb. 14B).

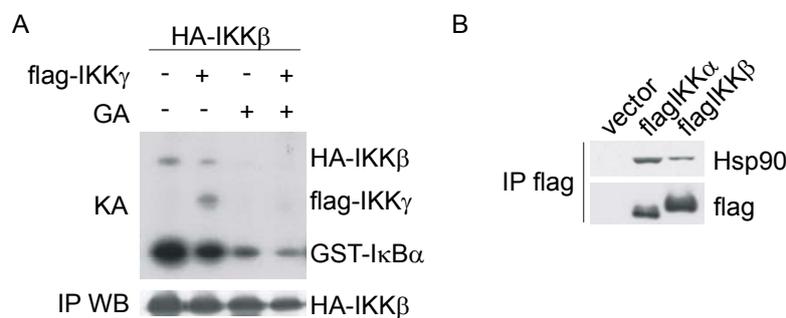


Abbildung 14: Ektopisch exprimierte I κ B Kinasen assoziieren mit Hsp90 und benötigen Hsp90-Funktion für die Kinase-Aktivität. (A) 293-Zellen wurden nach der Calcium-Phosphat-Methode wie angegeben mit Expressionsvektoren für HA-IKK β und IKK γ transfiziert und die Zellen 24 h später für 4 h mit GA behandelt oder unbehandelt gelassen. HA-IKK β wurde mit HA-spezifischem Antikörper präzipitiert (IP WB) und die Phosphorylierung von GST-I κ B α sowie die Trans-/Autophosphorylierung von IKK β/γ im *in vitro* Kinase-Experiment (KA) untersucht. **(B)** 293-Zellen wurden mit leerem Expressionsvektor („vector“) oder Expressionsvektoren für flagIKK α oder flagIKK β transfiziert. Nach Immunopräzipitation mit anti-flag Antikörper wurde die Ko-Immunopräzipitation von zellulärem Hsp90 im Western Blot nachgewiesen.

2.1.5 Hsp90 wird für die Stabilität und Biosynthese von IKK benötigt

Wie bereits beschrieben, führt eine länger als 4 h andauernde Hsp90-Inhibition zu einer Abnahme des zellulären IKK α - und β Proteins. Diese Beobachtung konnte auch mit ektopisch exprimierten IKK α - und IKK β -Proteinen nachvollzogen werden. Wie bei den zellulären Kinasen wurde auch bei ektopisch exprimierten, mit einem flag-Epitop versehenen Kinasen für IKK β ein starker Rückgang der Proteinmenge nach 8- bis 14-stündiger Inkubation mit GA festgestellt. Der Effekt auf flagIKK γ war wie für endogenes IKK γ deutlich schwächer ausgeprägt (Abb. 15).



Abbildung 15: Hsp90 wird zur Stabilisierung von ektopisch exprimiertem IKK β -Protein benötigt. 293-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für flagIKK β oder flagIKK γ transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten mit GA behandelt und anschließend die Zellextrakte im Western Blot auf die Menge an flagIKK β und flagIKK γ untersucht.

Die Inhibition von Hsp90 führt in vielen Fällen zu proteasomaler Degradation der Hsp90-abhängigen Proteine, da diese Proteine ohne die Chaperon-Funktion von Hsp90 in einer instabilen Konformation vorliegen oder nicht korrekt gefaltet werden können. Konjugation mit Ubiquitin-Ketten dient in diesen Fällen als Markierung zum Abbau durch das Proteasom.

Um eine Beteiligung des Proteasoms an der Degradation von IKK nach Hsp90-Inhibition zu überprüfen, wurden Namalwa-Zellen für 25 Min. mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 vorbehandelt und dann mit oder ohne GA für weitere 14 h inkubiert (Abb. 16). Die Menge von IKK α und IKK β wurde als Folge der Hsp90-Inhibition durch GA stark reduziert. Die gleichzeitige Hemmung des 26S-Proteasoms mit MG-132 führte zu einer Stabilisierung von IKK α und IKK β . Im Vergleich dazu wurde die Menge an IKK γ und p65 nicht durch GA beeinflusst, allerdings führt die Proteasom-Inhibition durch MG-132 zu einer leichten Reduktion der p65-Menge.

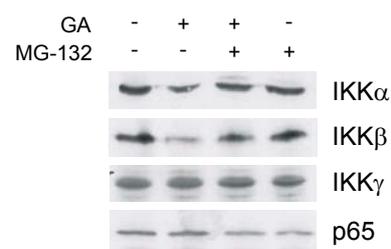


Abbildung 16: Hsp90 schützt IKK α und IKK β vor proteasomaler Degradation. Namalwa-Zellen wurden entweder mit oder ohne 25-minütige Vorbehandlung mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 (25 μ M) für 14 h mit GA inkubiert. Die Zellpellets wurden einmal mit PBS gewaschen und in SDS-Probenpuffer 5 Min. aufgekocht. Die Proben wurden anschließend im Western Blot auf die Proteine IKK α , IKK β , IKK γ und p65 untersucht.

Die Aufhebung der GA-induzierten Degradation von IKK α und β durch MG-132 lässt einen Ubiquitin-vermittelten Abbauprozess durch das 26S-Proteasom vermuten. Tatsächlich konnte nach der Behandlung von flag-IKK β transfizierten COS7-Zellen

mit GA und dem Proteasom-Inhibitor ALLN polyubiquitinierte IKK β -Proteine nachgewiesen werden (Abb. 17A).

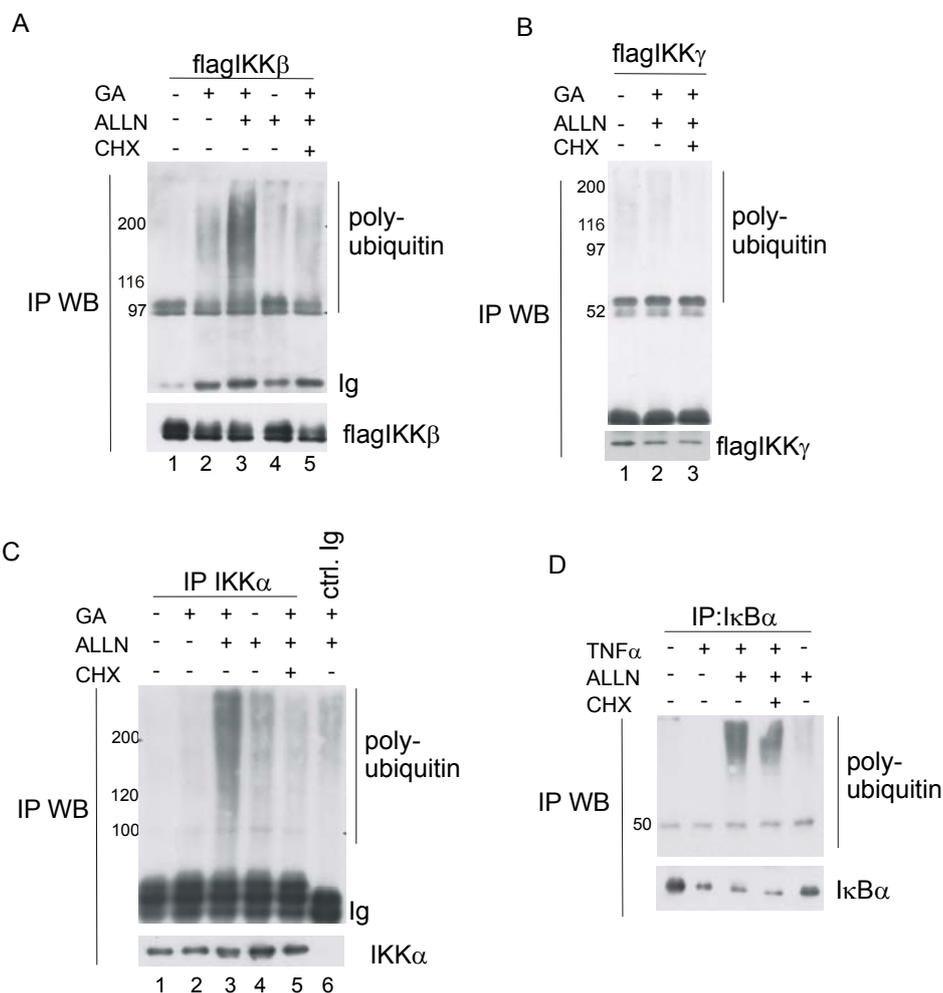


Abbildung 17: Hsp90-Inhibition verursacht Polyubiquitinierung von IKK α und IKK β . (A) und (B) COS7-Zellen wurden durch Lipofektion mit Expressionsplasmiden für flagIKK β (A) oder flagIKK γ (B) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für 6,5 h mit GA behandelt oder unbehandelt gelassen. Für die letzte Stunde wurde, wenn angegeben, der Proteasom-Inhibitor ALLN (50 μ g/ml) zugegeben, Cycloheximid (CHX, 25 μ g/ml) zur Hemmung der Proteinsynthese 30 Min. vor der Zugabe des ALLN. Flag-Immunopräzipitation erfolgte über Nacht aus Gesamtzellextrakten. Ubiquitinierung wurde im Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen Ubiquitin nachgewiesen, die Präzipitation von flagIKK β und flagIKK γ mit flag-Antikörper (IP-WB). (C) 3×10^7 Namalwa-Zellen pro Spur wurden wie für (A) und (B) beschrieben mit GA, ALLN und CHX behandelt. Die Immunopräzipitation erfolgte mit einem Antikörper gegen IKK α bzw. mit Kontroll-Immunglobulin (ctrl. Ig, IgG_{2b}). (D) Um zu überprüfen, dass unter den gewählten Bedingungen die post-translationale Ubiquitinierung nicht generell durch Cycloheximid gehemmt wurde, wurde die Ubiquitinierung von IkB α nach TNF α -Stimulation untersucht. 2×10^7 Namalwa-Zellen wurden für 20 Min. mit TNF α stimuliert, entweder mit 1 h 40 Min. CHX- und 1 h 10 Min. ALLN-Vorbehandlung oder ohne. Die Präzipitation von IkB α erfolgte mit einem polyklonalen IkB α -Antikörper und die Detektion der poly-ubiquitinierten Proteine wie oben.

Ebenso wurde polyubiquitiniertes zelluläres IKK α -Protein aus Namalwa-Zellen nach GA- und ALLN-Behandlung präzipitiert (Abb. 17C). Die Inhibition des Proteasoms ist Voraussetzung für die Detektion ubiquitiniertes Proteine, da diese sonst sofort durch

das Proteasom abgebaut werden. Die Behandlung von Namalwa-Zellen mit ALLN alleine führte zu einem leichten Anstieg in der Menge des polyubiquitinierten $\text{IKK}\alpha$, was vermutlich dem normalen biologischen Umsatz von $\text{IKK}\alpha$ -Proteinen entspricht. Eine deutliche Verstärkung tritt aber durch die Hsp90-Inhibition auf (Abb. 17C, Spur 3). Für transfiziertes $\text{IKK}\gamma$ wurde keine verstärkte Ubiquitinierung nach GA-Behandlung festgestellt, was dem Befund entspricht, dass das Proteinlevel nicht oder nur wenig durch Hsp90-Inhibition reduziert wird (Abb. 17B).

Die Blockade der Proteinsynthese durch Cycloheximid verhindert die GA-induzierte Ubiquitinierung von $\text{IKK}\alpha$ und $\text{flagIKK}\beta$. Das weist darauf hin, dass vor allem neusynthetisierte $\text{IKK}\alpha$ - und $\text{IKK}\beta$ -Moleküle Hsp90 zur Stabilisierung oder Faltung während der Translation benötigen oder aber ein CHX-sensitiver Faktor für die Stabilisierung von IKK gebraucht wird. In einem vergleichbaren Experiment wurde die post-translationale Ubiquitinierung von Proteinen nicht generell durch Cycloheximid gehemmt, wie hier für die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Ubiquitinierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ gezeigt wurde (Abb. 17D, Spur 3 und 4).

Um die Bedeutung von Hsp90 für die Biosynthese von $\text{IKK}\alpha$ und β weiter zu untersuchen, wurde eine *Pulse Chase* Analyse durchgeführt (Abb. 18). Dabei werden die während der so genannten *Pulse*-Phase synthetisierten Proteine mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert und ihre Stabilität nach Zugabe von Zellkultur-Medium ohne ^{35}S -Methionin in der *Chase*-Phase verfolgt. Nur die Proteine, die radioaktives Methionin enthalten, können anschließend per Autoradiografie nachgewiesen werden. Die Hsp90-Inhibition durch GA erfolgte entweder vor und während der *Pulse*-Phase („GA pre“), oder erst nach Beendigung der radioaktiven Markierung (in der *Chase*-Phase, „GA chase“). Die Halbwertszeit von $\text{IKK}\alpha$ wurde durch Hsp90-Inhibition in der *Chase*-Phase nicht vermindert (Abb. 18A, vgl. Spur 1-3 mit 7-9). Wird die Funktion von Hsp90 jedoch während der *Pulse*-Phase durch GA gehemmt, kann kein oder nur sehr wenig $\text{IKK}\alpha$ synthetisiert werden. Ebenso wird nur eine sehr geringe Menge $\text{IKK}\beta$ unter diesen Bedingungen synthetisiert, während auch hier die Halbwertszeit von $\text{IKK}\beta$ durch Hsp90-Inhibition nach Beendigung der Markierungsreaktion nicht beeinflusst zu sein scheint. Weder die Biosynthese noch die Stabilität von p65 wurde unter diesen Bedingungen durch Hsp90-Inhibition verändert, was einen generellen Effekt von GA auf die Proteinsynthese ausschließt.

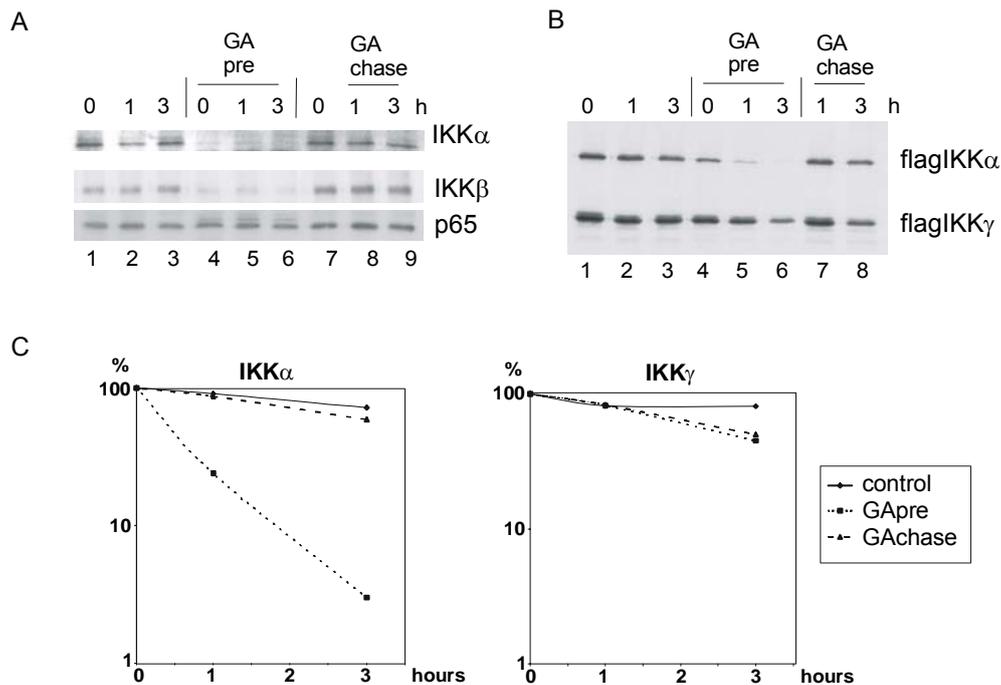


Abbildung 18: Hsp90 wird für die Synthese von IKK α und β benötigt. (A) HeLa-Zellen (eine 10 cm-Schale pro Spur) wurden für 1 h metabolisch mit ^{35}S -Methionin markiert (Spur 1) und mit nicht radioaktivem Medium für 1 oder 3 h weiter inkubiert (Spur 2 und 3). Für die mit „GA pre“ bezeichneten Proben, wurde für 2 h vor und während der Markierungsreaktion GA zugegeben (Spur 4-6). „GA chase“ beschreibt die Zugabe von GA nach Beendigung der Markierungsreaktion für 1 oder 3 h (Spur 8, 9). Die Immunopräzipitation von IKK α , β und p65 erfolgte über Nacht. Die präzipitierten, ^{35}S -markierten Proteine wurden anschließend per SDS-PAGE und Fluorografie/Autoradiografie analysiert. (B) COS7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für flagIKK α und flagIKK γ kotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurde wie unter (A) beschrieben eine *Pulse-Chase*-Analyse durchgeführt. (C) Die Bandenintensitäten aus (B) wurden mit dem Programm TINA quantifiziert. Die Intensität der Probe für t=0 (Spur 1 bzw. 4) wurde als 100% festgelegt und die Werte in logarithmischem Maßstab aufgetragen.

Ein *Pulse-Chase*-Experiment mit ektopisch exprimiertem flagIKK α und flagIKK γ zeigt ebenfalls stark verminderte Synthese von IKK α und eine extreme Instabilität der Proteine, die ohne aktives Hsp90 synthetisiert worden sind (Abb. 18B). Die Effekte auf die Stabilität und Synthese von IKK γ sind sehr viel geringer. Die Quantifizierung der Bandenintensitäten und die Auftragung in logarithmischem Maßstab verdeutlicht die Instabilität der Proteine, die ohne aktives Hsp90 synthetisiert wurden („GA pre“), im Vergleich sind hier IKK α und IKK γ dargestellt (Abb. 18C). Die *Pulse-Chase*-Analyse für transfiziertes IKK β ergab ebenfalls eine Hsp90-Abhängigkeit in der *Pulse*-Phase, aber keinen Einfluss von Hsp90-Inhibition auf die Stabilität der reifen Proteine (Daten nicht gezeigt). Die Funktion von Hsp90 scheint also für die Stabilisierung von IKK α und β Polypeptidketten während der Synthese benötigt zu werden, während reife IKK α und β Proteine auch ohne Hsp90 stabil sind.

2.2 Einfluss des Ko-Chaperons Cdc37 auf den IKK Komplex

2.2.1 Die Aktivität von IKK ist von dem Hsp90 Ko-Chaperon Cdc37 abhängig

Das Ko-Chaperon Cdc37 wurde gemeinsam mit Hsp90 in Verbindung mit vielen Kinasen gefunden und wurde auch als Bestandteil des IKK Komplexes vorgeschlagen (Chen et al. 2002). Cdc37 besitzt eine N-terminale Domäne (AS 1-126), über die zum Beispiel die Kinasen eIF2 α (Shao et al. 2003b) und Raf-1 (Grammatikakis et al. 1999) gebunden werden, und eine im mittleren Bereich des Proteins lokalisierte Hsp90-Bindungsdomäne (AS 128-282) (Shao et al. 2001, Pearl 2005) (Abb. 19A). Für Raf-1 wurde gezeigt, dass die Bindung an Hsp90 über Cdc37 vermittelt wird (Grammatikakis et al. 1999).

Um zusätzlich zu den beschriebenen Experimenten mit pharmakologischer Hsp90-Inhibition weitere Einblicke in Bezug auf die Funktion von Hsp90 und Cdc37 für die Aktivierung des IKK Komplexes zu bekommen, wurden verschiedene Deletionsmutanten von Cdc37 generiert. Diese umfassen entweder die für die Bindung an andere Kinasen beschriebene Domäne (Δ C2), die für die Hsp90-Bindung charakterisierte Domäne (Δ N) oder überlappende Bereiche (Δ C4, Δ N2, Δ NC) (Abb.19A). Außerdem wurde eine Cdc37-Mutante generiert, bei der der Serinrest an Position 13 der Aminosäuresequenz gegen Alanin ausgetauscht ist, da dieses Serin in Zusammenhang mit Phosphorylierung durch CK2 und als wichtig für die Bindung an verschiedene Kinasen (Akt, Aurora-B, Cdk4, MOK/MAK/MRK, Raf-1, v-Src) beschrieben worden ist (Shao et al. 2003b, Miyata und Nishida 2004).

Die Ko-Expression von Cdc37 der Wildtyp-Form mit IKK α oder IKK β führt zu einer Verstärkung der Aktivierungsschleifen-Phosphorylierung der Kinasen (Abb. 19B). Da angenommen wird, dass die Phosphorylierung der Aktivierungsschleife Voraussetzung für die Aktivität der Kinase ist, weist dieses Experiment darauf hin, dass Cdc37 Einfluss auf die Aktivierung der I κ B Kinasen hat.

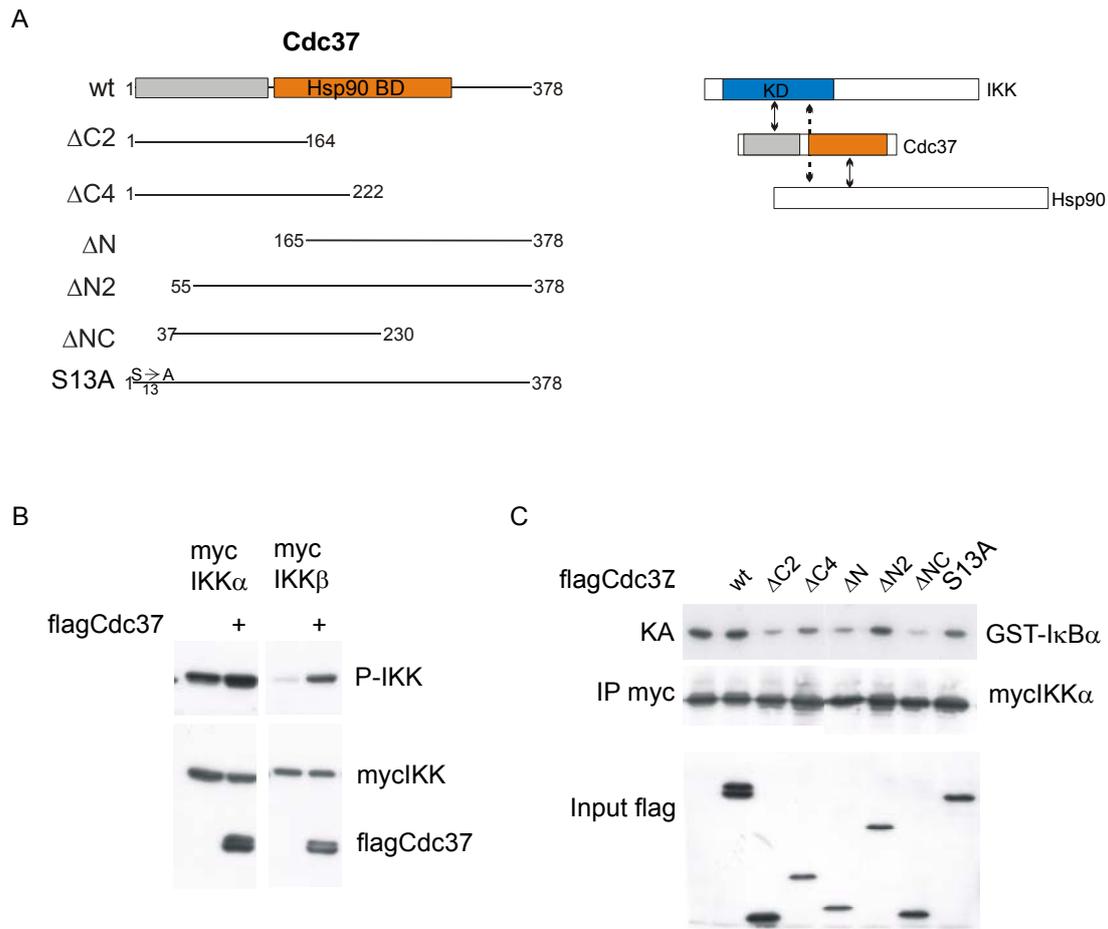


Abbildung 19: Einfluss von Cdc37 auf die Aktivität von exotisch exprimierten I κ B Kinasen.

(A) Links: Übersicht über die Bindungsdomänen und die generierten Deletionsmutanten von Cdc37. In grau dargestellt ist der für die Bindung anderer Kinasen (z. B. eIF2 α und Raf-1) benötigte Bereich, AS 1-126; in orange die Hsp90-Bindungsdomäne, AS 128-282, nach Pearl, 2005. Rechts: Modell für die Bindung von Hsp90 und Cdc37 an IKK, Cdc37 bindet mit N-terminaler Domäne (in grau dargestellt) an die Kinasedomäne (KD, blau) von IKK α oder IKK β und über den C-terminalen Bereich (in orange dargestellt) an Hsp90. Eine zusätzlich mögliche, direkte Interaktion zwischen IKK und Hsp90 ist mit einem gestrichelten Pfeil angegeben. **(B)** 293-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für mycIKK α oder mycIKK β und Cdc37 transfiziert und ein Western Blot zur Analyse der Aktivierungsschleifen-Phosphorylierung von mycIKK (P-IKK) bzw. zur Überprüfung der Expression von mycIKK und flagCdc37 durchgeführt. **(C)** 293-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für die angegebenen Proteine transfiziert und 24 h nach Transfektion lysiert. mycIKK α wurde immunopräzipitiert (IP myc) und der Einfluss der verschiedenen Cdc37-Mutanten auf die Kinase-Aktivität im *in vitro* Kinase-Experiment (KA) untersucht. Die Expression der Cdc37-Mutanten ist im unteren Teil gezeigt (Input flag).

Der Einfluss der verschiedenen Cdc37-Mutanten auf die Kinaseaktivität wurde in einem *in vitro* Kinase-Experiment für mycIKK α untersucht (Abb. 19C). Die Wildtyp-Form von Cdc37 hat einen neutralen oder leicht aktivierenden Einfluss auf die Kinaseaktivität, gemessen an der Menge des *in vitro* phosphorylierten GST-I κ B α . Bis auf die Mutante Cdc37 Δ N2 haben alle Deletionsmutanten von Cdc37 einen

inhibierenden Effekt auf die Aktivität von ektopisch exprimiertem IKK α -Protein. Effekte dieser Art, hervorgerufen durch die Überexpression eines mutierten Proteins, das die Funktion des intakten zellulären Proteins überlagert, bezeichnet man als dominant-negativ. Im Gegensatz zu den Deletionsmutanten wirkt die S13A-Mutante nicht dominant-negativ.

Dieses Experiment zeigt, dass verschiedene, überlappende Bereiche von Cdc37 für die Aktivität von IKK α benötigt werden. Sowohl das Fehlen der Hsp90-Bindungsdomäne als auch die Deletion der für andere Kinasen beschriebenen Bindungsdomäne von Cdc37 führt zu einer Hemmung der IKK-Aktivität.

Um die Interaktionen der Cdc37-Mutanten mit IKK α und Hsp90 zu untersuchen und auf einen möglichen Mechanismus der dominant-negativen Effekte auf die Kinaseaktivität schließen zu können, wurden Ko-Immunopräzipitationen durchgeführt.

2.2.2 Bestimmung der Interaktionsregionen von Cdc37 mit IKK und Hsp90

Die oben beschriebenen Cdc37-Konstrukte wurden mit mycIKK α in 293-Zellen ko-exprimiert. Aus den Zellextrakten wurden mit anti-flag Antikörper die mit flag-tag versehenen Cdc37-Mutanten präzipitiert und im Western Blot die Kopräzipitation von mycIKK α untersucht. Man erkennt die Assoziation von mycIKK α mit wtCdc37, und allen untersuchten Mutanten mit Ausnahme von Cdc37 Δ N2. Die Interaktion von IKK α mit flagCdc37 Δ C2 ist etwas schwächer als mit den übrigen Cdc37-Konstrukten (Abb. 20A). Es interagiert auch das Konstrukt Δ N mit mycIKK α , in dem die für andere Kinasen beschriebene Bindungsdomäne fehlt, während ein etwas längeres Protein (Δ N2) nicht mehr an IKK α bindet. Die IKK-Bindung der nicht überlappenden Konstrukte Cdc37 Δ C2 und Cdc37 Δ N deuten auf zwei unabhängige IKK-Bindungsregionen in der Cdc37-Sequenz hin.

Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Deletierung von Teilen eines Proteins dazu führen kann, dass dieses nicht mehr korrekt gefaltet ist und sich anders verhält als aufgrund der Korrelation mit der linearen Sequenz zu erwarten wäre.

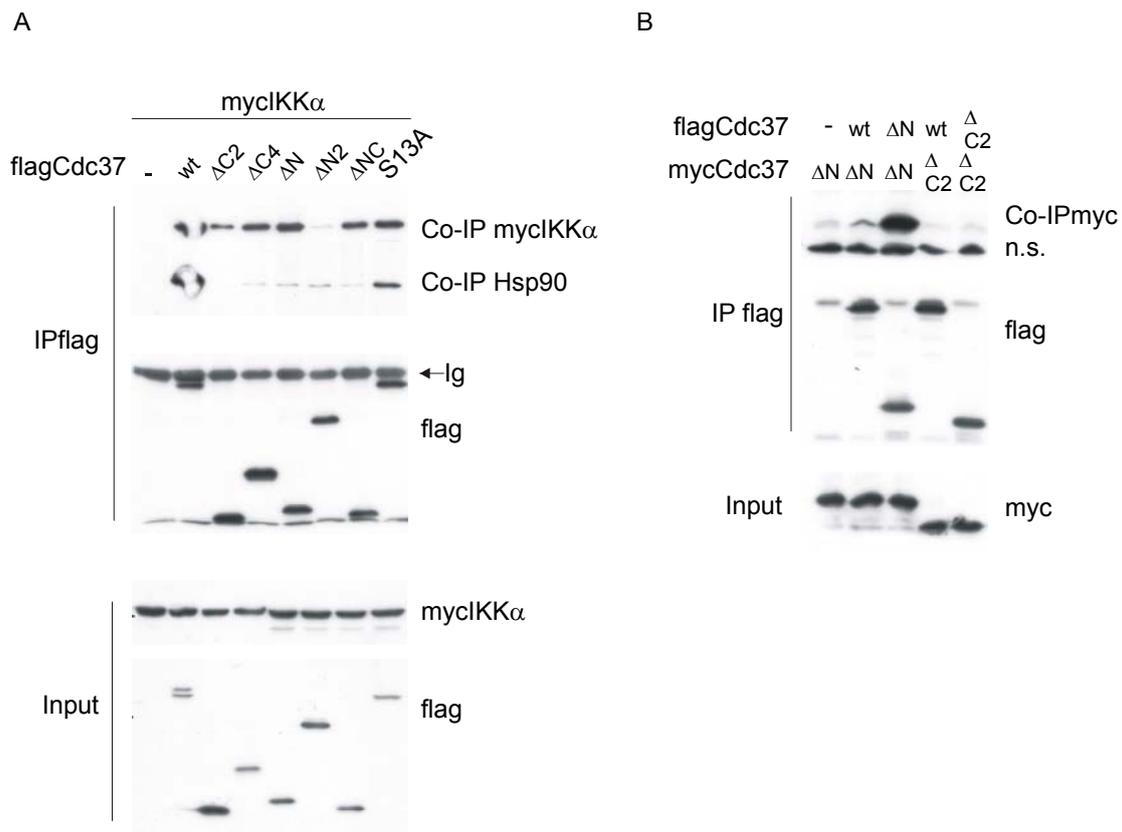


Abbildung 20: Interaktion der Cdc37-Mutanten mit IKK α und Hsp90 und untereinander. (A) Die in Abb. 19A beschriebenen Cdc37-Expressionskonstrukte wurden zusammen mit mycIKK α in 293-Zellen exprimiert. Nach Immunopräzipitation der Cdc37-Konstrukte (IP flag) wurde im Western Blot die Ko-Immunopräzipitation (Co-IP) von mycIKK α und Hsp90 analysiert, sowie die Immunopräzipitation mit dem flag-Antikörper kontrolliert. „Ig“ kennzeichnet die Kreuzreaktion des detektierenden Antikörpers mit der schweren Kette des zur IP eingesetzten Immunglobulins. Im unteren Bild ist die Expression der transfizierten Proteine gezeigt (Input). **(B)** Immunopräzipitation von flagCdc37-Proteinen aus Extrakten transfizierter 293-Zellen. Der Nachweis der Interaktion mit mycCdc37-Konstrukten (Co-IP myc) zeigt die präferenzielle Dimerisierung des Cdc37 C-Terminus (Δ N). n.s. bezeichnet eine nicht-spezifische Bande.

Parallel zu der IKK-Bindungsfähigkeit wurde die Assoziation von zellulärem Hsp90-Protein mit den verschiedenen Cdc37-Konstrukten überprüft und festgestellt, dass nur die beiden Cdc37-Proteine gut Hsp90 binden, die die gesamte Länge des Proteins umfassen, das heißt das Wildtyp-Protein sowie die S13A-Mutante (Abb.20A). Dahingegen bindet die Δ C2-Deletionsmutante gar nicht an Hsp90. In diesem Protein wurde in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Grammatikakis et al. 1999) der größte Teil der vermuteten Hsp90-Bindungsdomäne deletiert. Die übrigen Deletionsmutanten binden im Vergleich zu den Proteinen, die die gesamte Länge des Proteins umfassen, nur sehr schwach. Somit scheint für eine gute Interaktion von Cdc37 mit Hsp90 wiederum mehr als die zuvor beschriebene Bindungsdomäne notwendig zu sein.

In Bezug auf die beobachteten dominant-negativen Effekte der Deletionsmutanten ergibt sich über die Interaktionen der Mutanten mit IKK α sowie Hsp90 das folgende Erklärungsmodell: Geht man davon aus, dass die Bindung von Hsp90 an Kinasen über Cdc37 vermittelt wird (siehe Abb. 19A, rechts), und Hsp90 für die Aktivierung von IKK benötigt wird, so wirken Mutanten von Cdc37 als dominant-negativ, die diese Interaktion verhindern. Die Mutanten von Cdc37, die an IKK binden, aber nicht mehr in der Lage sind, Hsp90 zu rekrutieren, wirken dominant-negativ auf die Aktivität von IKK α , da Hsp90 für die Aktivität des IKK Komplexes benötigt wird, wie oben gezeigt. Die Serin-13-Alanin-Mutation hat keinen Einfluss auf die Bindung und Kinaseaktivität von IKK α .

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist eine mögliche Oligomerisierung von Cdc37. In Abb. 20B ist ein Experiment zur Dimerisierung von Cdc37-Proteinen dargestellt. Verschiedene Kombinationen von mit myc- bzw. flag-Epitop-*tag* versehenen Cdc37-Deletionsmutanten oder Cdc37-Protein der gesamten Länge (wt) wurden ko-exprimiert und jeweils das mit flag-*tag* versehene Protein immunopräzipitiert. Die Ko-Immunopräzipitation der myc-Cdc37-Proteine wurde im Western Blot überprüft. Der C-terminale Teil des Proteins (Δ N) dimerisiert und ist auch in der Lage, mit dem Protein der gesamten Länge zu interagieren, wenn auch schwächer als mit dem C-terminalen Bereich allein. Dagegen findet man keine Assoziation mit dem N-terminalen Teil des Proteins (Δ C2) sowie auch keine Interaktion der N-terminalen Abschnitte untereinander.

Für die Deletionsmutante Cdc37 Δ N ist demnach ein weiterer, von der IKK-Bindung unabhängiger Mechanismus für die dominant-negative Wirkung auf die IKK-Aktivität denkbar. Möglicherweise verhindert dieses Konstrukt durch Dimerisierung mit zellulärem Cdc37-Protein die Bildung von intakten Cdc37-Hsp90-IKK Komplexen.

In früheren Studien wurde vorgeschlagen, dass Cdc37 bevorzugt mit Kinase-Domänen interagiert (Prince und Matts 2004). Zur weiteren Analyse wurde daher die Assoziation von Cdc37 mit den Kinase-inaktiven Mutanten von IKK α und IKK β untersucht. Diese sind durch eine Mutation in der ATP-Bindungsstelle (K44A) der Kinase-Domäne nicht mehr katalytisch aktiv (Woronicz et al. 1997).

In einer Ko-Immunopräzipitation interagierten die Kinase-inaktiven Mutanten von IKK α und IKK β besser mit Cdc37 als die aktiven Kinasen (Abb. 21). Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Assoziation von IKK β mit Cdc37 schwächer ist als die

Assoziation von IKK α mit Cdc37. In diesem Experiment erkennt man daher nur mit der inaktiven Mutante von IKK β eine Assoziation mit Cdc37. Für IKK α ist die Assoziation der Kinase-inaktiven Mutante mit Cdc37 im Vergleich zur Wildtyp-Form von IKK α verstärkt. Vermutlich führt der Austausch des Lysins gegen ein Alanin zu einer Veränderung der Konformation der Kinasedomäne, über die bei den meisten Kinasen und vermutlich auch bei den I κ B Kinasen, die Interaktion mit Cdc37 vermittelt wird (Chen et al. 2002).

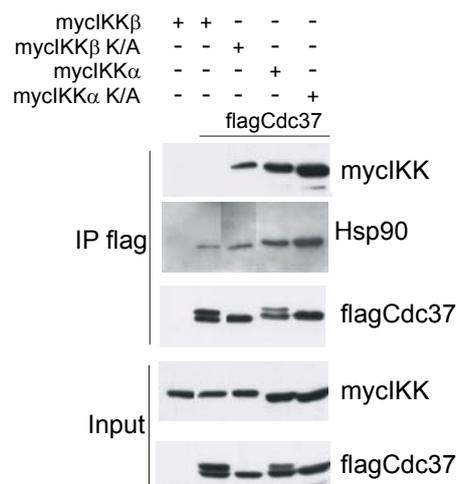


Abbildung 21: Untersuchung der Assoziation von Cdc37 mit IKK α und IKK β . Zellextrakte von transfizierten 293-Zellen wurden im WB untersucht (Input). Die Interaktion von Cdc37 mit mycIKK α und mycIKK β bzw. den Kinase-inaktiven Mutanten (K/A) sowie Hsp90 wurde im WB nach einer Immunopräzipitation von flagCdc37 überprüft (IP flag). Bei Ko-Expression von Cdc37 mit IKK α und IKK β erkennt man eine Doppelbande von Cdc37, nicht jedoch mit den K/A-Mutanten.

Insgesamt ergibt sich damit ein komplexes Bild für die Assoziation von Cdc37 mit IKK und Hsp90. Verschiedene, unabhängige Domänen von Cdc37 werden für die Bindung an die Kinasedomäne von IKK benötigt, wobei es auch Bereiche von Cdc37 gibt, die einen negativen Einfluss auf die Assoziation haben (siehe Cdc37 Δ N2). Die Interaktion von Cdc37 mit Hsp90 erfolgt nur effektiv mit Cdc37-Proteinen der vollen Länge. Die Hsp90-Bindung von N- und C-terminalen Deletionsmutanten ist stark vermindert.

2.2.3 Cdc37 wird durch die I κ B Kinasen phosphoryliert

Expriert man Cdc37 und IKK α oder β gemeinsam in 293-Zellen, so erscheint Cdc37 im Western Blot als Doppelbande, jedoch nicht, wenn die Kinase-inaktiven Formen von IKK α oder β anstelle des Wildtyps transfiziert wurden (Abb. 21, siehe

auch 19 und 20). Dieses deutet darauf hin, dass es sich bei der langsamer migrierenden Bande von Cdc37 um eine Phosphoform des Proteins handeln könnte. Die Behandlung von immunopräzipitiertem Cdc37 mit Alkalischer Phosphatase (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, SAP) überführte die obere, langsamer migrierende Bande in eine schneller migrierende Form (Abb. 22A). Durch Hitze inaktivierte Phosphatase war nicht in der Lage, diesen Effekt hervorzurufen. Folglich wird die Phosphatase-Aktivität des Enzyms benötigt, um die beobachtete Modifikation des Cdc37 zu entfernen, das heißt, dass die langsamer migrierenden Bande eine phosphorylierte Form von Cdc37 ist.

In einem *in vitro* Kinaseexperiment wurde getestet, ob auch die zellulären I κ B Kinasen in der Lage sind, Cdc37 zu phosphorylieren. Dafür wurde der IKK Komplex aus TNF α -stimulierten oder unbehandelten HeLa-Zellen präzipitiert und I κ B α , Cdc37 oder Hsp27 als Substrat angeboten. Die Aktivierung durch TNF α führt für GST-I κ B α und für Cdc37 zu verstärkter Phosphorylierung durch den IKK Komplex, während für das zur Familie der kleinen Hitzeschockproteine gehörende Hsp27 keine Phosphorylierung zu beobachten ist. Des Weiteren erkennt man die Trans-/Autophosphorylierung von IKK α/β und IKK γ .

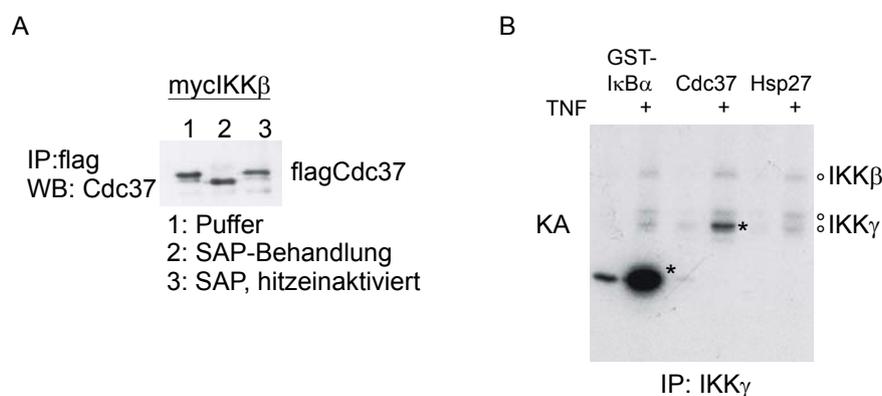


Abbildung 22: Überexpression und Aktivierung von IKK verursacht Phosphorylierung von Cdc37. (A) flagCdc37 wurde aus Gesamtzell-extrakt von mycIKK β + flagCdc37 kotransfizierten 239-Zellen präzipitiert. Drei identische Proben wurden anschließend wie angegeben behandelt: 1: Inkubation mit Puffer der *Shrimp-Alkaline-Phosphatase* (SAP), 2: Inkubation mit 1 μ l SAP, 3: Inkubation mit 1 μ l SAP, die zuvor durch Hitze inaktiviert worden war, jeweils 1 h bei 37°. Der Einfluss auf die zuvor beobachtete Doppelbande wurde im Western Blot mit anti-Cdc37-Antikörper untersucht. (B) HeLa-Zellen wurden für 10 Min. mit TNF α stimuliert oder unstimuliert gelassen. Für ein *in vitro* Kinaseexperiment wurde aus den Extrakten der zelluläre IKK-Komplex mit anti-IKK γ -Antikörper präzipitiert. In der Kinase-reaktion wurde GST-I κ B α oder Cdc37 oder Hsp27 als Substrat eingesetzt. Neben der durch TNF induzierten Phosphorylierung von I κ B α und Cdc37 (markiert durch *) erkennt man die Trans-/Autophosphorylierung von IKK β und IKK γ des zellulären Kinase Komplexes nach Aktivierung (markiert durch ◦).

Um zu überprüfen, ob es sich um eine direkte Phosphorylierung von Cdc37 durch IKK handelt, wurden verschiedene Formen von GST-Cdc37 (Δ C2, Δ N und S13A, siehe Abb. 19) mit rekombinantem IKK β -Protein und 32 P- γ ATP in einem *in vitro* Kinase-Versuch inkubiert (Abb. 23). Alle eingesetzten Cdc37-Konstrukte wurden deutlich phosphoryliert, während für das zur Kontrolle eingesetzte GST-Protein keine phosphorylierte Bande in der Autoradiografie sichtbar wurde. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass es sowohl im N-terminalen Teil von Cdc37 (Δ C2) als auch im komplementären Teil des Proteins (Δ N) Phosphorylierungsstellen gibt, die durch I κ B Kinasen phosphoryliert werden. Die beobachteten Phosphorylierungen erfolgen unabhängig von der zuvor beschriebenen Phosphorylierung (Shao et al. 2003b, Miyata und Nishida 2004) des Serinrests 13 durch CK2, wie der Einsatz der S13A-Mutante verdeutlicht. Das Coomassie gefärbte Gel zeigt, dass vergleichbare Mengen der Substratproteine eingesetzt wurden.

Im Western Blot konnte nicht in allen Experimenten eine Doppelbande für die S13A-Mutante erkannt werden, ebenso war es nicht möglich, Doppelbanden der verkürzten Proteine zu detektieren. Vermutlich werden Modifikationen in beiden Teilen des Proteins benötigt, um zusammen das Erscheinen einer Doppelbande zu bewirken.

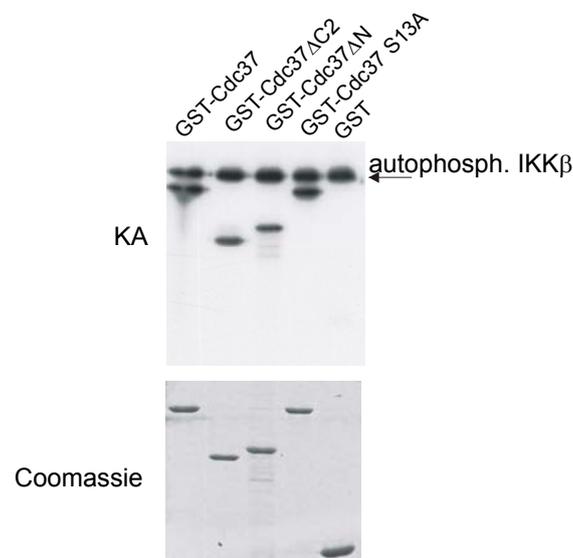


Abbildung 23: Die Phosphorylierung von Cdc37 erfolgt durch IKK β direkt. In einem *in vitro*-Kinase-Experiment mit rekombinantem IKK β -Protein wurden GST-Cdc37, GST-Cdc37 Δ C2, GST-Cdc37 Δ N, GST-Cdc37S13A oder GST alleine als Substrat eingesetzt (KA). Man erkennt die Phosphorylierung der verschiedenen Cdc37-Konstrukte, sowie autophosphoryliertes IKK β -Protein. GST allein wird nicht durch IKK β phosphoryliert. Die eingesetzte Menge der Substratproteine wurde in einer parallel durchgeführten Coomassie-Färbung überprüft.

Welche Serin-/Threonin-Reste in der Cdc37-Sequenz durch IKK phosphoryliert werden sowie die funktionelle Bedeutung der Phosphorylierung von Cdc37 durch IKK bleibt zu untersuchen.

2.3 Untersuchung der konstitutiven NF- κ B Aktivität in Hodgkin-/Reed-Sternberg Zellen

2.3.1 Hodgkin-/Reed-Sternberg Lymphomzellen besitzen konstitutiv aktives NF- κ B und sezernieren einen NF- κ B aktivierenden Faktor

Die malignen Zellen des Hodgkin-Lymphoms, Hodgkin-/Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen) sind durch eine konstitutive Aktivität des NF- κ B-Signalwegs charakterisiert (Bargou et al. 1996). Dabei kommt der konstitutiven NF- κ B Aktivität eine wichtige onkogene Funktion zu, die beim Hodgkin-Lymphom aber auch bei weiteren Tumorerkrankungen als pathogenetisch bedeutsam erachtet wird (Rayet und G elinas 1999, Hinz et al. 2002).

Die Zelllinien L428, L591, L1236, KM-H2 und HDLM-2 zeigen im Vergleich zu Reh- (leukämische B-Vorläuferzelle) und Namalwa-Zellen (Zellen aus dem Burkitt Lymphom) starke, konstitutive NF- κ B DNA-Bindungsaktivität im Gelretardations-Experiment (EMSA). Diese besteht aus Heterodimeren und einem geringeren Anteil an p50-Homodimeren (Abb. 24).

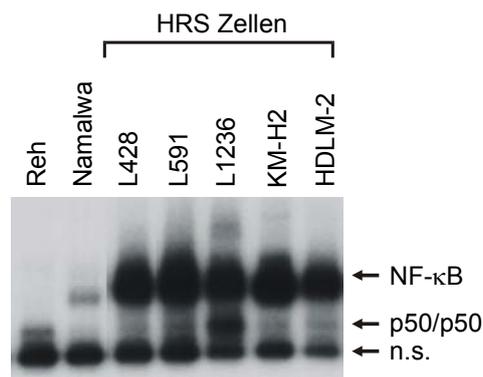


Abbildung 24: Konstitutive DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B in HRS-Zellen. Gesamtzellextrakte aus den aufgeführten Zelllinien wurden im *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) auf die NF- κ B DNA-Bindungsaktivität untersucht. Man erkennt eine starke Bande, die aus p50/p65-Heterodimeren und vermutlich weiteren Heterodimeren besteht, sowie eine schwächere Bande mit p50-Homodimeren. Die unterste Bande (n. s.) ist nicht NF- κ B-spezifisch.

Die HRS-Zellen und die umgebenden Zellen in einem erkrankten Lymphknoten sezernieren verschiedenen Zytokine, die zu den klinischen und pathologischen

Eigenschaften der Hodgkin-Krankheit beitragen. Dabei können sowohl parakrine als auch autokrine Effekte auftreten. HRS-Zellen produzieren einen oder mehrere Faktoren, die in anderen Zellen zur Aktivierung von NF- κ B führen können. Reh-Zellen wurden mit Zellkulturmedium, in dem zuvor HRS-Zellen (HDLM-2, KM-H2, L1236) gewachsen waren, für 30 Min. inkubiert. Diese Behandlung führte zur Induktion von NF- κ B DNA-Bindungsaktivität in den Reh-Zellen (Abb. 25A). TNF α und Lymphotoxin α (LT α = TNF β) sind zwei Zytokine, deren Expression in einer Vielzahl von Hodgkin-Fällen nachgewiesen wurde. Um ihren Beitrag an der durch HRS-Überstände induzierten NF- κ B-Aktivität in Reh-Zellen zu überprüfen, wurden die Überstände vor der Behandlung der Reh-Zellen mit neutralisierenden Antikörpern gegen TNF α und TNF β bzw. mit Kontroll-Immunglobulin inkubiert (Abb. 25A).

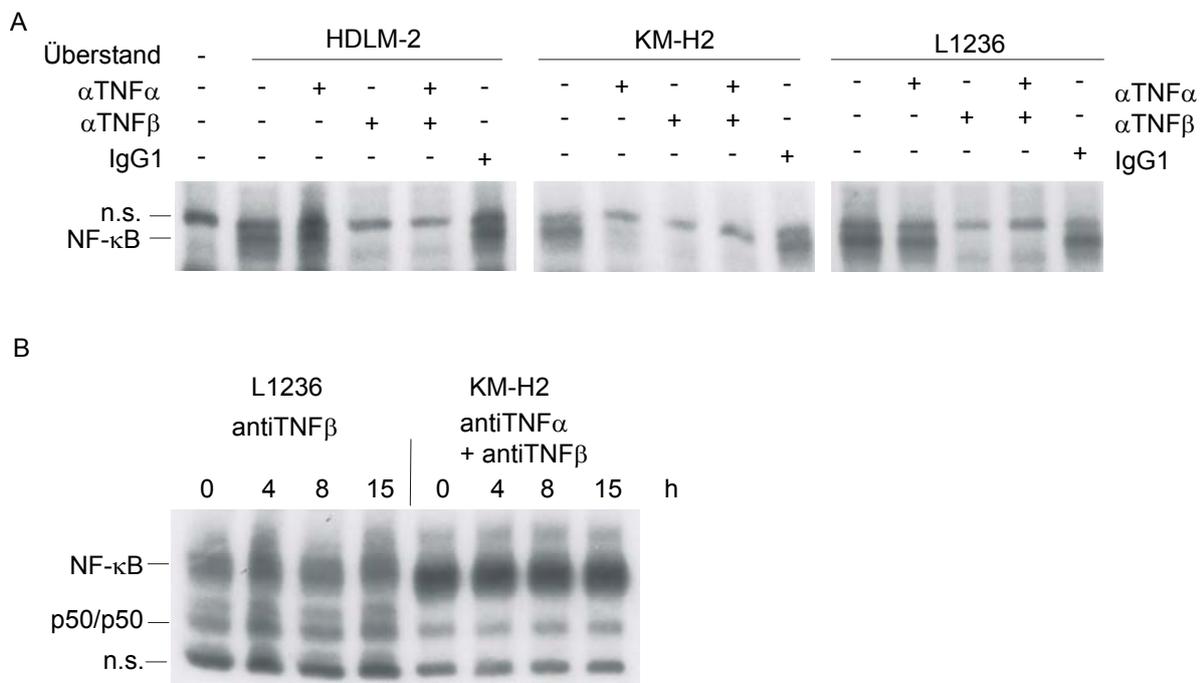


Abbildung 25: HRS-Zellen sezernieren TNF α und TNF β . (A) Der Zellkultur-Überstand von HDLM-2, KM-H2 und L1236-Zellen wurde für eine Stunde bei 37 °C mit Antikörpern gegen TNF α , TNF β oder Kontroll-Immunglobulin (IgG1) (1 μ g/ml) inkubiert oder unbehandelt gelassen. Anschließend wurden Reh-Zellen pelletiert, das Medium entfernt und stattdessen die Überstände der HRS-Zellen dazugegeben und die Zellen für 30 Min. bei 37 °C darin inkubiert. Die NF- κ B-Aktivität wurde im EMSA bestimmt. (B) L1236 und KM-H2-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit neutralisierenden Antikörpern (1 μ g/ml) gegen TNF β (L1236) bzw. TNF α und TNF β (KM-H2) inkubiert und anschließend der Einfluss auf die DNA-Bindungsaktivität im EMSA bestimmt.

Für die Überstände von HDLM-2- und L1236-Zellen wird die NF- κ B-Induktion in Reh-Zellen durch den TNF β -spezifischen Antikörper aufgehoben. Der gegen TNF α gerichtete Antikörper hat in diesen HRS-Überständen keinen neutralisierenden

Effekt, jedoch in den Überständen von KM-H2-Zellen. Der Kontroll-Antikörper (IgG1) hat keine Wirkung auf die Aktivierung von NF- κ B durch die von HRS-Zellen sezernierten Substanzen. HDLM-2 und L1236-Zellen sezernieren folglich TNF β (LT α), KM-H2-Zellen TNF α und TNF β . Beide Zytokine können NF- κ B aktivieren, hier auf parakrine Weise in Reh-Zellen. Da es theoretisch möglich ist, dass die konstitutive NF- κ B-Aktivität der HRS-Zellen durch einen autokrinen Mechanismus bedingt wird, wurde die Beteiligung von TNF α und TNF β an solch einer autokrinen Aktivierung getestet. Dafür wurden die neutralisierenden Antikörper gegen TNF β (L1236-Zellen) oder gegen TNF α und β (KM-H2-Zellen) in das Zellkulturmedium der Zellen gegeben und diese für verschieden lange Zeiträume (4-15 h) damit inkubiert (Abb. 25B). Ein Einfluss auf die konstitutive NF- κ B DNA-Bindungsaktivität war jedoch nicht festzustellen. TNF α und β sind nach diesen Ergebnis nicht an einem autokrinen Aktivierungsmechanismus beteiligt. Das heißt, dass eine andere, Zell-autonome Ursache der konstitutiven NF- κ B Aktivität zugrunde liegen muss.

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

Da nicht geklärt ist, wie die konstitutive NF- κ B-Aktivität in den malignen Zellen des Hodgkin-Lymphoms verursacht wird, ist die weitere Untersuchung der zur Aktivierung führenden Prozesse von großem Interesse. Dabei stellt sich die Frage, ob dies nach dem selben Mechanismus erfolgt wie bei transienter Aktivierung des Signalwegs durch einen extrazellulären Stimulus.

Die konstitutive NF- κ B-Aktivität wird hervorgerufen durch eine permanente Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes, dem eine zentrale Rolle in der Regulation von NF- κ B zugeschrieben wird (Krappmann et al. 1999). Hinzu kommt in einigen Fällen die Mutation des Inhibitor-Proteins I κ B α , das die Aufgabe hat, NF- κ B im Zytosol zu halten und somit DNA-Bindung und Transkriptionsaktivierung zu verhindern (Emmerich et al. 1999).

Die vorhergehenden Experimente der vorliegenden Arbeit haben bereits die Bedeutung des Hitzeschockproteins Hsp90 für die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs durch verschiedene Stimuli beschrieben. Daher stellte sich die Frage, ob Hsp90 auch für die konstitutive Aktivierung von NF- κ B in HRS-Zellen benötigt wird und welche Konsequenzen sich aus der Inhibition der Hsp90-Aktivität für das

Überleben der Lymphomzellen ergeben, die durch die NF- κ B-Aktivität vor Apoptose geschützt sind (Bargou et al. 1997).

Um die Bedeutung von Hsp90 für die konstitutive NF- κ B-Aktivierung in HRS-Zellen zu untersuchen, wurden die HRS-Zelllinien KM-H2, L1236, HDLM-2, L428 und L540 mit dem Hsp90-Inhibitor Geldanamycin behandelt. Der Einfluss auf die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B wurde im Gelretardations-Experiment überprüft (Abb. 26A). Die NF- κ B-Aktivität wurde durch die Hsp90-Inhibition deutlich blockiert, jedoch nur in den Zelllinien, die keine I κ B α -Mutation tragen (L1236, HDLM-2, L540). In KM-H2 und L428-Zellen, die beide kein intaktes I κ B α exprimieren, hat die Hsp90-Inhibition keinen oder nur einen sehr geringen Effekt auf die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B.

Im Gegensatz zu NF- κ B wurde die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors Oct1 sowie des in HRS-Zellen ebenfalls konstitutiv aktivierten AP-1-Faktors (Mathas et al. 2002) nicht durch Geldanamycin beeinflusst. Eine Ausnahme bildet die AP-1-Aktivität in L1236-Zellen, die durch GA leicht herabgesetzt wird.

Da die konstitutive NF- κ B-Aktivität in HRS-Zellen durch die Aktivität des I κ B-Kinase Komplexes hervorgerufen wird, wurde die Kinase-Aktivität nach GA-Behandlung im *in vitro* Kinase-Versuch gemessen (Abb. 26B). Die Inhibierung von IKK erfolgte in allen getesteten HRS-Zelllinien, unabhängig vom I κ B α -Status der Linien. In Zellen mit I κ B α -Defekt liegt NF- κ B unabhängig vom IKK Komplex im Kern vor, was erklärt, dass die Hsp90-vermittelte Inhibition des IKK-Komplexes durch GA in den Zelllinien mit mutiertem I κ B α (L428 und KM-H2) keinen Einfluss auf die NF- κ B-Aktivität hat. Die Ergebnisse zeigen insgesamt, dass Hsp90 für die konstitutive Aktivität des IKK-Komplexes ebenso benötigt wird wie für die transiente Aktivierung in HeLa- und Namalwa-Zellen.

In Teilen kann die reduzierte Kinase-Aktivität nach GA-Behandlung jedoch auch durch die geringere Menge an IKK α hervorgerufen sein, die im Vergleich zu Extrakten aus unbehandelten Zellen präzipitiert wird. Dies stimmt mit den Beobachtungen von HeLa- und Namalwa-Zellen überein, dass Hsp90-Inhibition über einen längeren Zeitraum (hier 14 h) zu einer Depletierung des zellulären IKK α Protein-Levels führt (siehe Abb. 9).

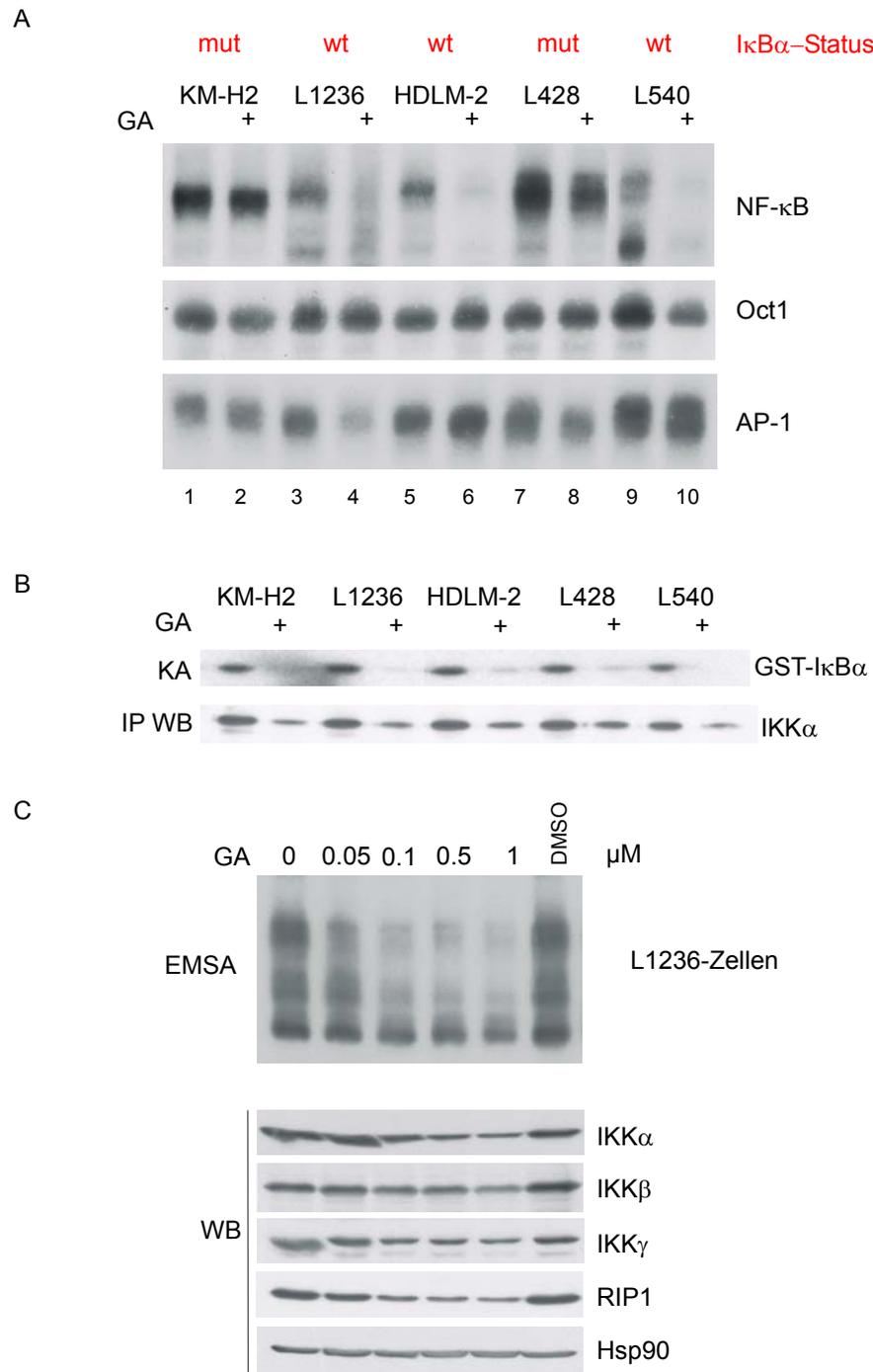


Abbildung 26: Die konstitutive NF- κ B Aktivität ist abhängig von Hsp90. **(A)** Die HRS-Zelllinien KM-H2, L1236, HDLM-2, L428 und L540 wurden für 14 h mit GA behandelt oder unbehandelt gelassen. Der Einfluss auf die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B, Oct1 und AP-1 wurde aus Gesamtzell-extrakten im EMSA bestimmt. Oben ist der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Status der einzelnen Zelllinien angegeben, wt=Wildtyp, mut=mutiertes $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Gen. **(B)** Die Aktivität von IKK α aus wie oben behandelten HRS-Zellen wurde im *in vitro* Kinase-Experiment (KA) überprüft. IP WB zeigt die Menge der für den Kinase-Versuch präzipitierten IKK α . **(C)** Test der Dosisabhängigkeit von NF- κ B-Inhibition und IKK und RIP1-Depletierung in L1236-Zellen. L1236-Zellen wurden für 14 h wie angegeben behandelt (DMSO als Lösungsmittelkontrolle) und die Gesamtzell-extrakte im EMSA und WB analysiert.

Ein Test der Dosisabhängigkeit wurde in L1236-Zellen durchgeführt (Abb. 26C). Die Inhibition der NF- κ B-Aktivität ist ab einer minimalen Konzentration von 0,1 μ M GA bei 14-stündiger Behandlung messbar. Die Auswirkung auf die Expression von IKK-Proteinen und RIP1 setzt bei der selben Konzentration ein, was auf eine Hsp90-Abhängigkeit beider Vorgänge schließen lässt. Wie schon zuvor beobachtet, führt auch die Behandlung von HRS-Zellen mit GA (14 h) u. a. zu verminderter Expression von IKK α , IKK β und RIP1, wohingegen das zelluläre Proteinlevel von Hsp90 nicht beeinträchtigt wird.

2.3.3 Kurzzeit- und Langzeit-Effekte von Hsp90-Inhibition in HRS-Zellen

HRS-Zellen wurden bezüglich der in HeLa-Zellen beobachteten Kurzzeit- und Langzeit-Effekte der Hsp90-Inhibition untersucht. Dabei war interessant, ob die Hemmung der konstitutiven IKK-Aktivität dem selben Zeitverlauf folgt, wie bei der Aktivierung durch proinflammatorische und mitogene Stimuli. L428-Zellen wurden für 30, 60 oder 120 Min. mit GA behandelt und die Auswirkung auf die IKK-Aktivität im *in vitro*-Kinase-Experiment getestet (Abb. 27A). Bereits nach 30 Min. Hsp90-Inhibition ist die konstitutive IKK-Aktivität stark reduziert. Die Menge des phosphorylierten GST-I κ B α entspricht etwa einem Drittel der Menge des von IKK aus nicht behandelten Zellen phosphorylierten GST-I κ B α . Nach 120-minütiger Hsp90-Inhibition ist kaum noch IKK-Aktivität vorhanden. Die Menge der präzipitierten Kinase ist innerhalb dieser Zeiträume nicht oder nur sehr leicht durch die GA-Behandlung beeinträchtigt.

Wie schon für die transiente IKK-Aktivierung nachgewiesen, führt die Hemmung von Hsp90 zu einer verminderten Phosphorylierung der Aktivierungsschleife von IKK. Für die konstitutive Aktivität von IKK in L428-Zellen wird die Phosphorylierung der Aktivierungsschleife durch 60-minütige Hsp90-Inhibition ebenfalls reduziert (Abb. 27B).

Die Wirkung von Hsp90-Inhibition über eine längere Zeit wurde in HDLM-2, L540 und L428 Zellen getestet (Abb. 27C). Die Hemmung der IKK-Aktivität in diesen Zellen nach 4, 8 oder 14 h Behandlung mit GA weist einen ähnlichen Verlauf auf wie in HeLa- und Namalwa-Zellen. Je nach Zelllinie ist die Aktivität von IKK α bereits nach 4-stündiger Hsp90-Inhibition stark reduziert, am stärksten in L540 und L428-Zellen. Wie bereits zuvor beobachtet, ist nach 14 h so gut wie keine IKK-Aktivität mehr messbar und die Menge der Kinase vermindert. Der Einfluss auf das Protein-Level

von IKK α , β und γ sowie RIP1 wurde im Western Blot überprüft. Dabei wird deutlich, dass die Hsp90-Abhängigkeit der Proteine sich leicht zwischen den einzelnen Zelllinien unterscheidet.

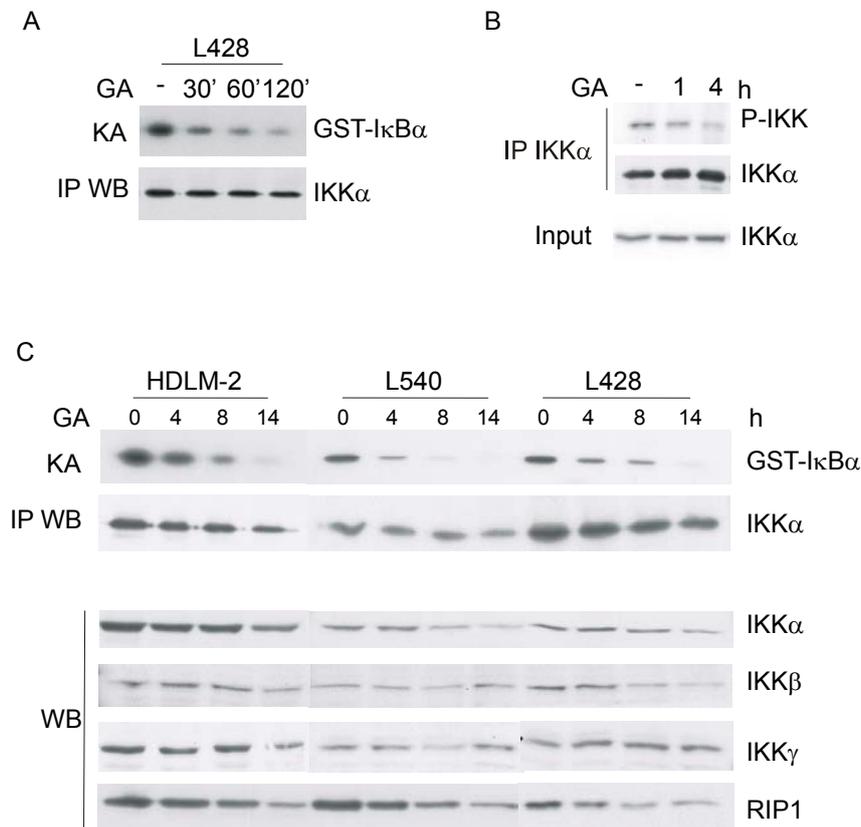


Abbildung 27: Zeitabhängigkeit der Effekte von Hsp90-Inhibition in HRS-Zellen. (A) Kurzzeit-Hsp90-Inhibition für 30-120 Min. in L428-Zellen. IKK α wurde aus den Zellextraktten immunopräzipitiert (IP WB) und die Aktivität im *in vitro* Kinase-Experiment bestimmt (KA). **(B)** L428-Zellen wurden für 0, 1 oder 4 h mit GA vorbehandelt. Nach der Immunopräzipitation von IKK α wurde die Phosphorylierung der Aktivierungsschleife im Western Blot mit einem phosphospezifischen IKK-Antikörper detektiert. **(C)** HDLM-2, L540 und L428-Zellen wurden für 0, 4, 8 oder 14 h mit GA behandelt und die Kinase-Aktivität von IKK α wie oben im *in vitro*-Kinase-Experiment bestimmt. Der Effekt von Hsp90-Inhibition auf das zelluläre Proteinlevel von IKK α , IKK β , IKK γ und RIP1 wurde im WB untersucht.

Insgesamt scheint es keine grundlegenden Unterschiede zwischen der Rolle von Hsp90 für die konstitutive Aktivität des IKK Komplexes und für die transiente Aktivierung in HeLa- oder Namalwa-Zellen zu geben. In beiden Fällen führt die Inhibition von Hsp90 innerhalb von 30-60 Minuten zu einer Beeinträchtigung der Aktivierungsschleifen-Phosphorylierung und der Kinaseaktivität. Des Weiteren wird Hsp90 auch für die Aufrechterhaltung des zellulären Proteinlevels von IKK α und IKK β in HRS-Zellen benötigt.

2.3.4 Die Geldanamycin-Derivate 17-AAG und 17-DMAG hemmen die konstitutive NF- κ B-Aktivität in HRS-Zellen

Hsp90-Inhibitoren befinden sich aufgrund ihrer anti-tumoralen Wirkung in klinischen Tests. Da Geldanamycin wegen seiner Lebertoxizität nicht für einen therapeutischen Einsatz geeignet ist, wird zur Zeit hauptsächlich das besser verträgliche Derivat 17-AAG (17-Allylamino-17-demethoxy-Geldanamycin) eingesetzt. Das Derivat 17-DMAG (17-Desmethoxy-17-N,N-dimethylaminoethylamino-Geldanamycin) hat den weiteren Vorteil, dass es im Gegensatz zu GA und 17-AAG wasserlöslich ist.

Beide Substanzen wurden in Bezug auf die Inhibition der konstitutiven NF- κ B-Aktivität in HRS-Zellen getestet (Abb. 28). L540-Zellen wurden für 15 h mit GA, 17-AAG und 17-DMAG behandelt. Die Aktivität der beiden Derivate (gemessen an der Inhibition der NF- κ B-Aktivität) scheint etwas geringer als die von GA zu sein. Geldanamycin wurde wie in den vorausgegangenen Analysen 0,5 μ M eingesetzt. Um vergleichbare Effekte mit 17-AAG zu erzielen, muss dieses in einer Konzentration von 2 μ M verwendet werden. Mit 17-DMAG erreicht man einen Effekt auf die NF- κ B-Aktivität mit einer Konzentration von 0,5-1 μ M.

Beide Substanzen haben wie GA keinen Effekt auf die konstitutive AP-1 Aktivität in diesen Zellen.

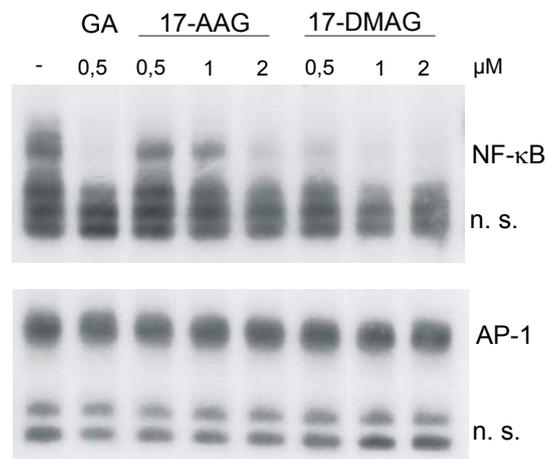


Abbildung 28: Hemmung konstitutiver NF- κ B Aktivität durch die Geldanamycin-Derivate 17-AAG und 17-DMAG. L540-Zellen wurden für 15 h mit den angegebenen Konzentrationen an GA, 17-AAG und 17-DMAG behandelt und die Gesamtzellextrakte im EMSA auf die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B und AP-1 überprüft. n. s. bezeichnet unspezifische DNA-Proteinkomplexe.

2.3.5 Hsp90-Inhibition beeinflusst die Expression von NF- κ B-Zielgenen

Da die konstitutive Aktivität von NF- κ B in Hodgkin-Zellen zur Expression einer Vielzahl von Zielgenen in diesen Zellen führt, die für den malignen Phänotyp entscheidend sind (Hinz et al. 2002), stellte sich die Frage, wie sich die Inhibition von Hsp90 auf die Expression von NF- κ B-Zielgenen auswirken würde.

Gesamtzell-Extrakte von L1236, HDLM-2, L540Cy und L428 Zellen nach 24 oder 48 h GA-Behandlung wurden im Western Blot auf die Expression von einigen Proteinen untersucht, deren Gene durch NF- κ B reguliert werden (Abb. 29A).

Ein Gen, das nur durch NF- κ B selbst reguliert wird, ist das Gen für das Inhibitor-Protein I κ B α . Das I κ B α -Protein unterliegt in HRS-Zellen einer schnellen biologischen Erneuerung, da es durch den permanent aktiven IKK-Komplex sofort zur Degradation markiert und degradiert wird. Gleichzeitig erfolgt durch aktives NF- κ B im Kern ständige Transkription und Neusynthese von I κ B α . 24- oder 48-stündige Hemmung von Hsp90-Funktion und damit einhergehende NF κ B-Inhibition führten in L1236, HDLM-2 und L540Cy-Zellen eher zu einer Erhöhung der Proteinmenge (aufgrund der IKK-Inhibition) als zu einer Reduktion aufgrund von verminderter Transkription des NF- κ B-Zielgens I κ B α . In L428-Zellen ist kein I κ B α -Protein zu detektieren, da in diesen Zellen nur ein verkürztes Protein exprimiert wird.

Betrachtet man die Expression von JunB (Transkriptionsfaktor der AP-1 Familie), Bcl-X_L und c-FLIP (Apoptoseregulatoren), so erkennt man leicht unterschiedliche Effekte in den untersuchten Zelllinien. 24-48 h Hsp90-Inhibition führten in allen Fällen zu reduzierten Proteinmengen dieser NF- κ B-regulierten Gene. Bei c-FLIP (*cellular FLICE inhibitory protein*) ist sowohl die Expression der kurzen (S) als auch der langen Isoform (L) nach Hsp90-Inhibition vermindert, wobei die Verteilung zwischen langer und kurzer Isoform zwischen den Zelllinien variiert.

Für das Zellzyklusprotein CyclinD2 erkennt man den stärksten Effekt in HDLM-2-Zellen. Es fällt auf, dass auch in L428-Zellen die zelluläre Menge der untersuchten Proteine vermindert ist, obwohl in diesen Zellen aufgrund der I κ B α -Mutation keine Inhibition der nukleären NF- κ B-Aktivität erfolgt (s. o.). Als Kontrollen wurden IKK α und p65 untersucht. Die Depletierung des IKK α -Proteinlevels dient als Kontrolle für erfolgreiche Hsp90-Inhibition und wird durch die Abhängigkeit der IKK-Biosynthese von Hsp90 hervorgerufen. p65 sollte weder von Hsp90 noch von NF- κ B zur Regulation seiner eigenen Transkription abhängig sein, und das Proteinlevel wird

nicht durch die GA-Behandlung beeinflusst. Das zeigt, dass die beobachteten Wirkungen der Hsp90-Inhibition nicht durch unspezifische Effekte auf Proteinstabilität oder Proteinsynthese hervorgerufen sind.

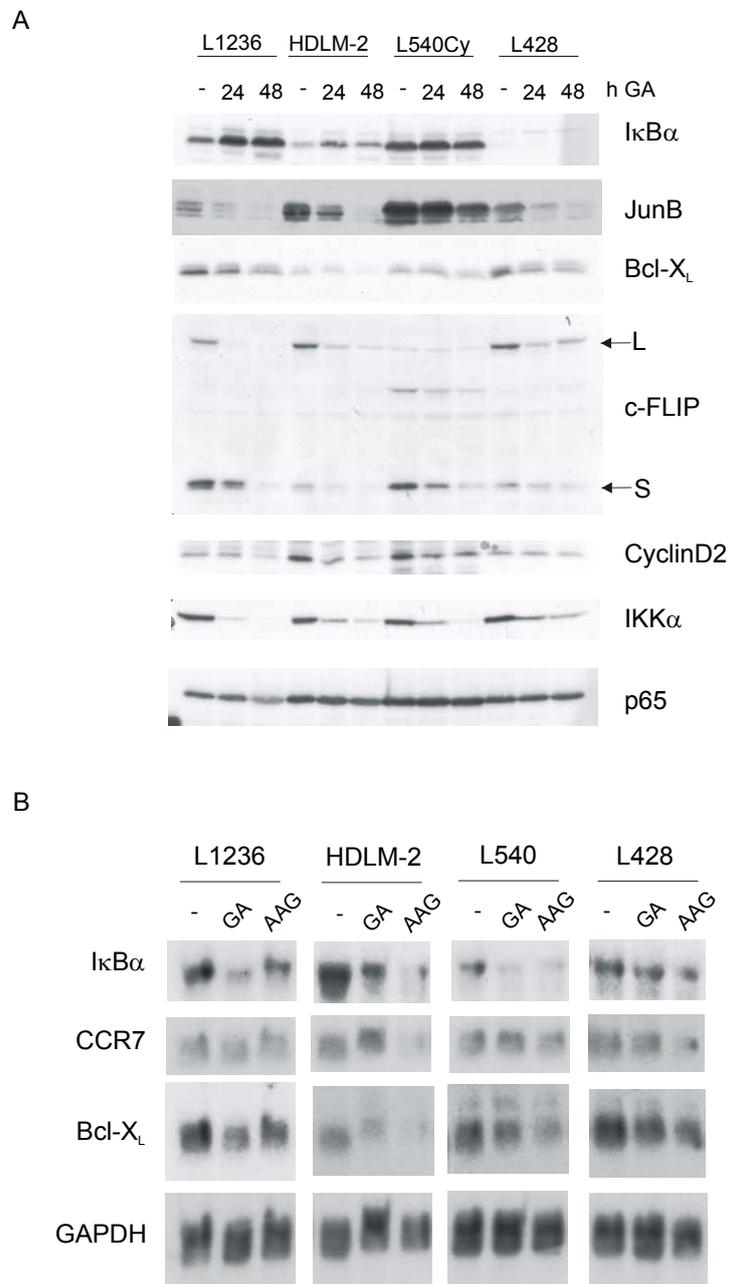


Abbildung 29: Einfluss von Hsp90-Inhibition auf die Expression von NF- κ B Zielgenen.

(A) HRS-Zellen wurden für 24 oder 48 h mit GA behandelt oder unbehandelt gelassen. Die Expression von NF- κ B-Zielgenen und p65 als Kontrolle wurde im WB überprüft. **(B)** Der Einfluss von Hsp90-Inhibition auf die mRNA-Level von NF- κ B-Zielgenen wurde im Northern Blot untersucht. HRS-Zellen wurden für 15 h mit GA oder 17-AAG behandelt. Gesamt-RNA wurde aus den Zellen isoliert, im denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylon-Membran transferiert. Die Membran wurde nacheinander mit 32 P-markierten Sonden für die verschiedenen Gene hybridisiert.

Letztlich lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass die untersuchten Proteine selbst auch Hsp90 zur Stabilisierung oder Synthese benötigen, obwohl sie nicht zu den bisher bekannten Hsp90-Substratproteinen zählen. Deshalb wurde außerdem im Northern Blot der Einfluss von Hsp90-Inhibition auf die Menge der transkribierten mRNA der Zielgene untersucht (Abb. 29B). Die Behandlung mit GA und 17-AAG erfolgte für 14 h. Am stärksten ist der Effekt auf die Transkription der I κ B α mRNA. Man erkennt einen deutlichen Rückgang in der Menge der mRNA nach Hsp90-/NF- κ B-Inhibition in L1236, L540 und HDLM-2 Zellen, während in L428-Zellen kein oder nur ein sehr geringer Rückgang zu erkennen ist. Dies entspricht der bereits beschriebenen Beobachtung, dass in diesen Zellen keine signifikante Hemmung der nukleären NF- κ B-Aktivität durch Hsp90-Inhibition möglich ist.

Des Weiteren wurde die Expression der CCR7 (Chemokin-(CC-Motiv)-Rezeptor7)- und Bcl-X_L-mRNAs nach Hsp90-Inhibition analysiert. Eine Hemmung der Transkription der CCR7 mRNA erfolgt am stärksten in HDLM-2-Zellen nach Behandlung mit 17-AAG. Für Bcl-X_L wird die Menge der mRNA sowohl durch GA als auch durch 17-AAG in L1236, L540 und HDLM-2-Zellen reduziert. Das heißt, die Inhibition von Hsp90 bewirkt eine Hemmung der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B. Die Effekte in L428-Zellen, in denen durch GA keine Inhibition der NF- κ B DNA-Bindungsaktivität möglich ist, sind sehr viel schwächer oder nicht vorhanden. Für CCR7 ist bekannt, dass dieses Gen von NF- κ B und AP-1 gemeinsam reguliert wird (Krappmann et al. 2004). Da die konstitutive AP-1 Aktivität der HRS-Zellen nicht durch Hsp90-Inhibition beeinflusst wird, sollte der Effekt von GA und 17-AAG auf die Expression von CCR7 geringer sein, als bei Genen wie I κ B α , die von NF- κ B allein reguliert werden. Dieses erkennt man in den gezeigten Northern Blot-Analysen. Als Kontrolle wurde der Einfluss der Hsp90-Inhibition auf die Menge der GAPDH-mRNA getestet und keine generellen Effekte auf die Transkription beobachtet. Es besteht dennoch die Möglichkeit, dass weitere, Hsp90-abhängige Faktoren an der Regulation der untersuchten Gene beteiligt sind.

2.3.6 Hodgkin-/Reed-Sternberg Zellen benötigen Hsp90-Aktivität zum Schutz vor Apoptose

Die konstitutive Aktivität von NF- κ B ist ein essenzieller Überlebensfaktor für Hodgkin-/Reed-Sternberg Zellen und die Inhibition von NF- κ B führt zu verstärkter Apoptose dieser Zellen (Bargou et al. 1997). Die Hemmung der konstitutiven DNA-Bindungsaktivität, abhängig vom I κ B α -Status der Zellen, könnte also Apoptose der mit Hsp90-Inhibitoren behandelten Zellen auslösen. Um dieses zu überprüfen, wurden verschiedene HRS-Zelllinien mit GA behandelt und der Anteil der apoptotischen Zellen nach Annexin-Färbung im Durchflusscytometer bestimmt (Abb. 30).

Eine starke Zunahme an apoptotischen Zellen war nach 48 h Behandlung mit Geldanamycin erkennbar. Besonders stark betroffen waren dabei HDLM-2 und L540 Zellen (bis zu 58% apoptotische Zellen), die beide intaktes I κ B α exprimieren. Dieser Effekt war deutlich stärker als in den Zelllinien mit I κ B α -Mutationen (KM-H2 und L428), in denen auch keine Blockade der NF- κ B DNA-Bindung im EMSA zu erkennen war (siehe Abb. 26A). Der Anteil der apoptotischen Zellen nach 48 h Hsp90-Inhibition durch GA lag in diesen Zelllinien bei 25%.

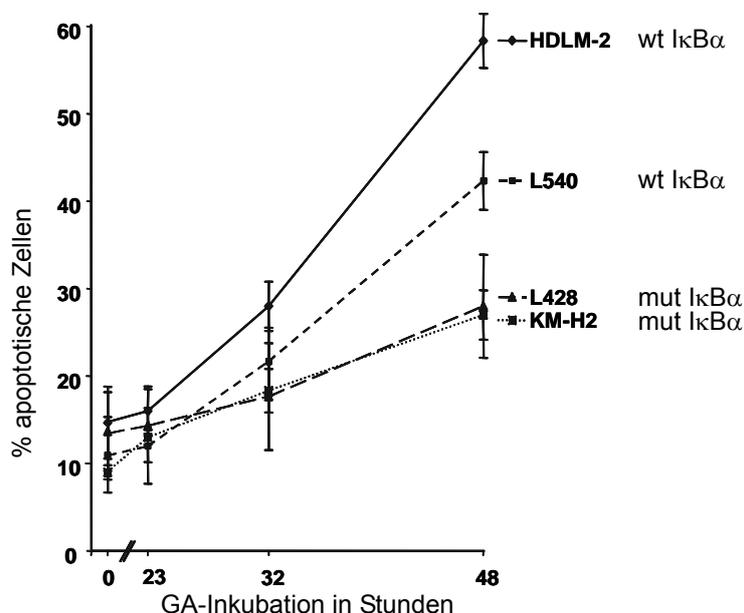


Abbildung 30: Hsp90-Inhibition führt zu verstärkter Apoptose von HRS-Zellen. HRS-Zellen wurden für 0, 23, 32 oder 48 h mit GA behandelt und der Anteil der apoptotischen Zellen durch FITC-AnnexinV-Färbung im Durchflusszytometer bestimmt. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Rechts ist der I κ B α -Status der Zellen angegeben.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Hsp90-vermittelte Inhibition der konstitutiven NF- κ B-Aktivität die Blockade des programmierten Zelltods in HRS-Zellen aufgehoben werden kann. Dieser Effekt ist am stärksten in den Zelltypen, in denen die NF- κ B-Aktivität direkt auf den IKK Komplex zurückzuführen ist und keine I κ B α Mutationen vorliegen, da nur hier eine Hemmung der NF- κ B-Aktivität erfolgt.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss von Hsp90-Inhibition auf die Auslösung von Apoptose durch Stimulation des Fas-*Death*-Rezeptors in HRS-Zellen untersucht. In HRS-Zellen wird durch Expression des inhibitorischen Proteins c-FLIP die Auslösung von Apoptose über den Fas-*Death*-Rezeptor (CD95) verhindert (Mathas et al. 2004). c-FLIP bindet an FLICE (Caspase 8) und blockiert die zur Aktivierung der Caspase-Kaskade notwendige Autoproteolyse. Dabei ist die Expression von c-FLIP in HRS-Zellen abhängig von der konstitutiven NF- κ B-Aktivität (Hinz et al. 2002, Mathas et al. 2004). Durch Hsp90-Inhibition wird die konstitutive NF- κ B-Aktivität in Zelllinien mit intakten I κ B α -Molekülen gehemmt. In diesem Experiment sollte getestet werden, ob die Hemmung ausreicht, um HDLM-2 und L540Cy-Zellen für die Auslösung von Apoptose durch CD95-Stimulation zu sensibilisieren. Die Verminderung des Proteinlevels von c-FLIP durch Hsp90-/NF- κ B-Inhibition wurde bereits im Western Blot untersucht.

HDLM-2, L540Cy und L428-Zellen wurden für 14 h mit GA vorbehandelt und anschließend für 4 h mit einem agonistischen Antikörper (CH-11) (durch Quervernetzung von CD95-Rezeptoren) stimuliert. Der Anteil der apoptotischen Zellen wurde nach Annexin-Färbung im Durchflusscytometer bestimmt (Abb. 31). In HDLM-2 und L540Cy-Zellen führt die Behandlung mit dem agonistischen Antikörper allein zu 12-50% apoptotischen Zellen. Durch die starke Quervernetzung kann – im Gegensatz zur Stimulation mit dem natürlichen Liganden Fas – die Blockade der Apoptose zum Teil überwunden werden. Inhibiert man zuvor mit GA die NF- κ B-Aktivität dieser Zellen, so ist die Apoptose-Induktion wesentlich stärker (22% in L540Cy, 80% in HDLM-2), möglicherweise durch die Herunterregulation des inhibitorischen c-FLIP-Proteins.

In L428-Zellen verursacht weder der CH-11-Antikörper, noch die Kombination aus Hsp90-/NF- κ B-Inhibition und CH-11-vermittelter CD95-Stimulation, vermehrte Apoptose. Zum einen wird die NF- κ B-Aktivität in diesen Zellen nicht durch GA inhibiert, zum anderen scheint in diesen Zellen die Resistenz gegen CD95-

abhängige Apoptose größer zu sein als in den anderen beiden getesteten Zelllinien (Daten nicht gezeigt).

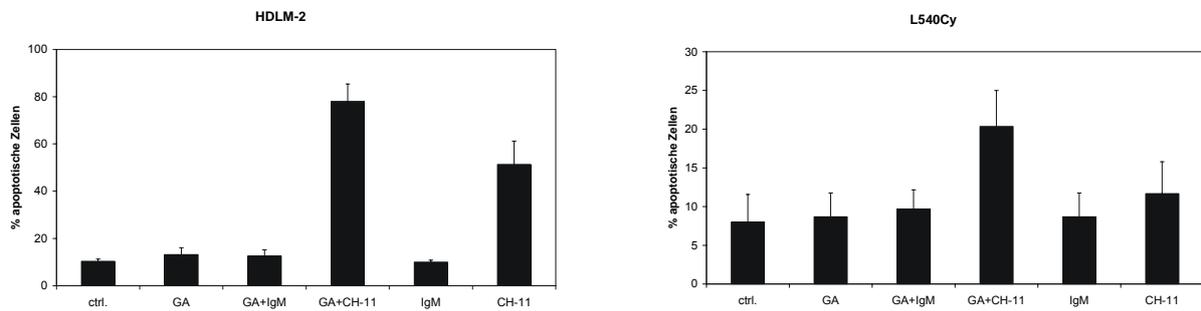


Abbildung 31: Hsp90-Inhibition sensibilisiert HRS-Zellen für Apoptose nach Fas-Death-Rezeptor-Stimulation. HDLM-2 oder L540Cy-Zellen wurden für 15 h mit GA vorbehandelt oder unbehandelt gelassen. Die Stimulation mit agonistischem anti-CD95 Antikörper (CH-11, 100 ng/ml) oder mit IgM als Kontrolle erfolgte anschließend für 4h. Der Anteil der apoptotischen Zellen wurde nach FITC-AnnexinV-Färbung im Durchflusscytometer in drei unabhängigen Experimenten bestimmt.