

### 3. Diskussion

Der NF- $\kappa$ B-Signalweg wird auf vielfache Weise reguliert. Eine Schlüsselfunktion nimmt dabei der I $\kappa$ B Kinase (IKK) Komplex ein, an dem alle bisher bekannten aktivierenden Stimuli konvergieren. In dieser Arbeit wurde die Rolle des Hitzeschockproteins Hsp90 und des Ko-Chaperons Cdc37 für die Aktivität und Stabilität des IKK Komplexes untersucht. Hsp90 ist an der Regulation zahlreicher Signalübertragungsprozesse beteiligt, dabei benötigen vor allem Kinasen Hsp90 zur Stabilisierung und Aktivierung. Die Hemmung der ATPase-Aktivität von Hsp90 durch den spezifischen Inhibitor Geldanamycin (GA) führt zur Degradation von vielen Hsp90-Substratproteinen. Behandelt man Säugerzellen mit GA, so wird der I $\kappa$ B Kinase Komplex auf zwei verschiedenen Ebenen beeinflusst, je nach Dauer der Hsp90-Inhibition. Die zelluläre Proteinmenge von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  wird durch längere Inkubation der Zellen mit Hsp90-Inhibitoren stark reduziert, während die Aktivität der Kinasen auch schon nach sehr kurzer Behandlung mit GA beeinträchtigt ist.

#### 3.1 Hsp90 wird für die Biosynthese der I $\kappa$ B Kinasen benötigt

8-14-stündige Inhibition von Hsp90 durch Geldanamycin oder Radicol führt zu deutlich verminderten Mengen an IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ . Viele Hsp90-Substratproteine werden nach Hsp90-Inhibition über das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert. Auch für IKK $\alpha$  und  $\beta$  konnte Polyubiquitinierung und eine Beteiligung des 26S Proteasoms am Abbau der Kinasen nachgewiesen werden. Es wurde jedoch keine Polyubiquitinierung nach Hsp90-Inhibition beobachtet, wenn die Proteinsynthese durch Cycloheximid (CHX) inhibiert worden war. Das weist darauf hin, dass IKK $\alpha$ - und  $\beta$ -Moleküle während der Translation durch Hsp90 stabilisiert werden müssen. Diese Vermutung wurde in einer *Pulse-Chase*-Analyse bestätigt. Wenn die Aktivität von Hsp90 während der Markierungsreaktion mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin durch GA inhibiert war, konnte anschließend kein oder nur sehr geringe Mengen IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  detektiert werden. Die Proteinsynthese an sich war unter diesen Bedingungen jedoch nicht beeinträchtigt, wie für p65 und auch in anderen Zusammenhängen (Bijlmarkers und Marsh 2000, Fisher et al. 2000) gezeigt wurde.

Im Gegensatz zu dem beobachteten starken Einfluss von Hsp90-Inhibition auf die Synthese von IKK $\alpha$  und  $\beta$  im *Pulse-Chase*-Experiment, hat die Zugabe von GA keinen Einfluss auf die Halbwertszeit dieser Proteine, wenn die Markierungsreaktion

mit aktivem zellulären Hsp90 erfolgte. Im Western Blot war die Proteinmenge von IKK $\gamma$  allenfalls in sehr geringem Maße nach Hsp90-Inhibition vermindert, und auch im *Pulse-Chase*-Experiment mit ektopisch exprimiertem flagIKK $\gamma$  war kein Einfluss auf die Synthese zu erkennen. Die Stabilität von IKK $\gamma$  scheint jedoch im Gegensatz zu IKK $\alpha$  und  $\beta$  durch Hemmung der Hsp90-Aktivität leicht beeinträchtigt zu sein.

Auch die Menge von ektopisch exprimiertem flagIKK $\alpha$ -Protein in COS7-Zellen ist nach Hsp90-Inhibition stark vermindert und die Stabilität des auf diese Weise entstandenen Proteins dramatisch reduziert. Nach 3 Stunden ist so gut wie kein flagIKK $\alpha$  mehr vorhanden, während das Protein, welches ohne Hemmung der Hsp90-Aktivität synthetisiert wurde, sehr stabil ist, unabhängig davon, ob Geldanamycin nach Beendigung der Synthese zugegeben wurde oder nicht. Dieser Befund weist darauf hin, dass Hsp90 für IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  benötigt wird, um wachsende Proteinketten zu falten, zu stabilisieren oder vor Aggregation und Degradation zu schützen.

Bei den hier gewählten Versuchsbedingungen wurden die Zellen vor der Markierungsreaktion bereits für zwei Stunden mit GA vorbehandelt. Das lässt die Möglichkeit offen, dass in dieser Zeit ein Transkriptionsfaktor, der für die Aktivierung der Transkription von IKK $\alpha$  und  $\beta$  notwendig ist, durch Hsp90-Inhibition in seiner Stabilität oder Aktivität beeinträchtigt worden ist. Eine generelle Hemmung der Proteinsynthese-Maschinerie unter diesen Bedingungen ist jedoch auszuschließen, da die Synthese von p65 unbeeinflusst ist. Des Weiteren kann es sein, dass IKK $\alpha$  oder  $\beta$  normal translatiert werden, jedoch in einer ungefalteten oder fehlgefalteten Konformation vorliegen und deshalb in der Immunopräzipitation nicht von den eingesetzten Antikörpern erkannt werden können oder sich nach Zellextraktion in der unlöslichen Fraktion befanden. Dagegen spricht der Befund, dass auch im Western Blot nach GA-Behandlung eine starke Reduktion der Proteinmenge von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  in Gesamtzellextrakten beobachtet wurde.

In der Arbeit von Chen et al. (Chen et al. 2002) wurden Hsp90 und Cdc37 als Bestandteile des IKK Komplexes identifiziert. Im Gegensatz zu den hier erhaltenen Ergebnissen wurden jedoch von Chen und Kollegen in HeLa-Zellen keine verminderten Expressionslevel von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  nach Hsp90-Inhibition beobachtet. Es ist unklar, in wie weit die Wachstumsbedingungen und der Zelltyp die

Stabilität der I $\kappa$ B Kinasen oder die Empfindlichkeit für Hsp90-Inhibition beeinflussen. Chen und Kollegen führten die GA-Behandlung in Serum-freiem Zellkulturmedium durch. In dieser Arbeit erfolgte jedoch sowohl mit Serum als auch unter Serum-freien Bedingungen eine starke Reduktion des Proteinlevels der I $\kappa$ B Kinasen und von RIP1. Diese Reduktion unterschied sich im Zeitverlauf zwischen den getesteten Lymphomzellen und HeLa-Zellen und war in den HeLa-Zellen schwächer ausgeprägt und langsamer als in Lymphomzellen. Verminderte Expressionslevel der I $\kappa$ B Kinasen wurden sowohl mit GA als auch mit einem weiteren Hsp90-Inhibitor, Radicicol, beobachtet, so dass unspezifische Effekte des Geldanamycins auszuschließen sind. Bestätigt wurden diese Beobachtungen in einer Arbeit über TNF-induzierte Apoptose, in der ebenfalls die Proteinlevel von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  nach 16-stündiger Hsp90-Inhibition reduziert waren. Dort wurde eine murine Fibrosarcoma-Zelllinie untersucht (Vanden Berghe et al. 2003). Die Degradation von RIP1 wurde bereits zuvor beschrieben (Lewis et al. 2000), und für viele weitere Hsp90-Substratproteine wurden reduzierte Proteinlevel nach Hsp90-Inhibition festgestellt (Maloney und Workman 2002).

In der Literatur gibt es einige Beispiele für Kinasen, die auf Hsp90 in Zusammenhang mit ihrer Synthese angewiesen sind. So wird Hsp90 für die Stabilisierung neu synthetisierter Moleküle der Src-Kinasen Lck und c-Src und Lyn (Bijlmarkers und Marsh 2000, Yorgin et al. 2000) gebraucht, während die Stabilität der fertig synthetisierten Proteine nicht durch Hsp90-Inhibition beeinflusst wird. Die Häm-regulierte eIF2 $\alpha$ -Kinase benötigt Hsp90 während der Translation und zur Reifung und Aktivierung der Kinase (Shao et al. 2001). Dagegen wirkt sich Hsp90-Inhibition bei vielen anderen Kinasen auf die Halbwertszeit aus, wie zum Beispiel für RIP1 (Lewis et al. 2000) und Akt (Basso et al. 2002) gezeigt wurde. Allerdings wurde der Einfluss von Hsp90-Inhibition auf die Synthese dieser Kinasen in vielen Fällen nicht überprüft, so dass ein zweifacher Effekt nicht ausgeschlossen werden kann.

## 3.2 Die Bedeutung von Hsp90 und Cdc37 für die Aktivierung des IKK Komplexes

Von allen bekannten Hsp90-Substratproteinen ist die Interaktion von Hsp90 mit den Steroidhormon-Rezeptoren bisher am besten untersucht. Hier wird Hsp90 benötigt, damit eine Bindung des Liganden an den Rezeptor erfolgen kann. Anschließend wird Hsp90 freigesetzt. Das ist der Auslöser für die Dimerisierung des Rezeptors, nachfolgende DNA-Bindung und Genaktivierung (Denis und Gustafsson 1989, Pratt und Toft 1997).

Generell geht man von einem ähnlichen Mechanismus für die Unterstützung von verschiedenen Substratproteinen aus. Es wird jedoch angenommen, dass spezifische Ko-Chaperone für verschiedene Substratproteine benötigt werden. So wurde das Ko-Chaperon p23 bevorzugt in Komplexen von Hsp90 mit Steroidhormon-Rezeptoren gefunden, während Cdc37 Kinase-spezifische Interaktionen von Hsp90 vermittelt (Richter und Buchner 2001).

Die größte Gruppe unter den Hsp90-Substratproteinen sind die Kinasen. Vermutlich ist die Assoziation mit Hsp90 in den meisten Fällen Voraussetzung zur Erlangung einer aktivierbaren Konformation (Pearl 2005); so zum Beispiel für die Häm-regulierte eIF2 $\alpha$  Kinase, die Hsp90-Aktivität sowohl während der Biosynthese als auch zum Herstellen einer aktivierbaren Konformation benötigt (Uma et al. 1997, Shao et al. 2001). In einigen Fällen wird die Kinase jedoch durch die Bindung von Hsp90 in einem inaktiven Zustand gehalten, wie im Fall der Rezeptor-Tyrosin Kinase ErbB2. Hsp90 verhindert dort die Heterodimerisierung und Aktivierung durch Trans-Phosphorylierung (Citri et al. 2004). Auch der *Heat Shock Transcription Factor* HSF1 wird durch die Bindung von Hsp90 in einer inaktiven Form gehalten (Zou et al. 1998). Die Interferon-induzierte Kinase PKR, die zur Familie der eIF2 $\alpha$ -Kinasen gehört, benötigt Hsp90 während der Synthese und wird ebenfalls durch Hsp90 in einem inaktiven Zustand gehalten. Die Aktivierung der Kinase durch doppelsträngige RNA geht mit einem Verlust der Hsp90-Bindung einher (Donzé et al. 2001).

### 3.2.1 Regulation der Aktivität des IKK Komplexes durch Hsp90

Wie also ist der Einfluss von Hsp90 und Cdc37 auf die Aktivität der I $\kappa$ B Kinasen? Untersucht wurde sowohl die Bedeutung für die Aktivierung durch proinflammatorische und mitogene Stimuli, als auch für die konstitutive IKK/NF- $\kappa$ B Aktivität in Tumorzellen des Hodgkin-Lymphoms. Die Aktivität der I $\kappa$ B Kinasen  $\alpha$  und

$\beta$  ist in allen untersuchten Fällen von Hsp90 abhängig. Bereits nach 30-60-minütiger Hsp90-Inhibition ist eine deutliche Reduktion der Kinase-Aktivität zu beobachten, wogegen erst nach längerer Hsp90-Inhibition das Proteinlevel von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  vermindert wird (siehe 3.1). Da die Hemmung der Kinasen sehr schnell erfolgt, ist es wahrscheinlich, dass Hsp90 direkt oder indirekt eine Rolle für den Aktivierungsprozess spielt. Die Phosphorylierung der Serin-Reste 177 und 181 von IKK $\beta$  und 176 und 180 von IKK $\alpha$  ist entscheidend für die Aktivität der Kinasen (Mercurio et al. 1997, Ling et al. 1998). Die Inhibition der Hsp90-Funktion führt zu reduzierter Phosphorylierung der IKK-Aktivierungsschleife, sowohl nach TNF $\alpha$ -Stimulation in HeLa-Zellen, als auch in Hodgkin-Reed-Sternberg Zellen.

Es besteht die Möglichkeit, dass durch die Hsp90-Inhibition Faktoren betroffen sind, die für die Signalübertragung von den Zelloberflächen-Rezeptoren bis zum IKK Komplex essenziell sind, da viele Kinasen Hsp90 zur Stabilisierung und Aktivierbarkeit benötigen (siehe Abb. 34). So sind einige Proteine als Hsp90-Substratproteine identifiziert worden, denen eine Rolle für die Aktivierung des IKK-Komplexes zugeschrieben wird. Dazu gehören TAK1, MEKK1, NIK und MEKK3 (Bouwmeester et al. 2004). Auch das Protein RIP1, das für die Aktivierung von IKK über den TNF-Signalweg benötigt wird, ist ein Hsp90-Substratprotein (Lewis et al. 2000). Gegen einen indirekten Einfluss der Hsp90-Inhibition auf die Aktivierung des IKK Komplexes sprechen jedoch mehrere Befunde. So wird auch die Aktivität ektopisch exprimierter I $\kappa$ B Kinase  $\beta$  durch Geldanamycin negativ beeinflusst. Allein oder zusammen mit IKK $\gamma$  exprimiertes IKK $\beta$ -Protein ist bereits ohne den Einfluss aktivierender Stimuli enzymatisch aktiv. Das hohe Expressionslevel ektopisch exprimierter Kinasen führt dazu, dass sich diese durch Trans-/Autophosphorylierung selbst aktivieren. Durch Hsp90-Inhibition wird im *in vitro* Kinase-Experiment die Phosphorylierung von GST-I $\kappa$ B $\alpha$  als Substrat reduziert, und die Trans- und Autophosphorylierung von IKK $\beta$  und IKK $\gamma$  gehemmt. Dies bedeutet, dass hier die Inhibition von Hsp90 durch GA dazu führt, dass aktivierende Vorgänge innerhalb des IKK Komplexes nicht erfolgen können bzw. Hsp90 benötigt wird, um den Komplex in einer bestimmten Konformation zu halten. Die Aktivität von rekombinantem, aus Schmetterlingszellen aufgereinigtem IKK $\beta$ -Protein wurde nicht durch GA beeinträchtigt. Die Kinase-Aktivität selbst lässt sich also durch GA nicht inhibieren, das heißt, es müssen Prozesse betroffen sein, die zur Aktivierung der Kinase führen.

Da GA in der Regel die Interaktion zwischen Hsp90 und Substratprotein aufhebt, wurde überprüft, wie sich die Behandlung von Namalwa-Zellen mit GA auf die Interaktion zwischen Hsp90 und dem IKK Komplex auswirkt. Überraschenderweise erfolgte die Dissoziation des Komplexes sehr viel langsamer als die Hemmung der Kinase-Aktivität. Erst nach acht Stunden war eine Verringerung der Menge an ko-präzipitiertem Hsp90 festzustellen, während erste Effekte auf die Aktivität des IKK Komplexes bereits nach 30-minütiger Hsp90-Inhibition messbar waren. Daraus lässt sich schließen, dass die Bindung von Hsp90 an IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  für die in der Kinaseaktivierung zu erfüllende Aufgabe nicht ausreichend ist.

Für andere Substratproteine wurde eine sehr viel schnellere Dissoziation von Hsp90 nach Geldanamycin-Behandlung beobachtet. So ist die Dissoziation von Hsp90 und der Interferon-induzierten Kinase PKR bereits nach 15-minütiger Behandlung mit GA zu beobachten (Donzé et al. 2001). Die Bindung von Hsp90 an Raf1 wurde nach 2 h Behandlung mit GA (kürzester untersuchter Zeitpunkt) aufgehoben (Grammatikakis et al. 1999).

Nach Dissoziation von Hsp90 werden viele Substratproteine proteasomal degradiert. Für IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  wurde keine reduzierte Halbwertszeit nach GA-Behandlung festgestellt, sondern eine Beeinträchtigung der Biosynthese. Die beobachtete Hemmung der Kinase-Aktivität durch GA setzt bereits nach 30 Minuten ein, bevor Degradation oder mangelnde Neusynthese einen Einfluss auf die Proteinmenge der Kinase haben können. Die Hemmung der Kinasen erfolgt auch, bevor eine Dissoziation von Hsp90 und IKK zu beobachten ist. In dem als Chaperon-Zyklus beschriebenen Modell (Isaacs et al. 2003) geht man dagegen davon aus, dass die Kinase so lange in einer aktivierbaren Konformation vorliegt, wie sie mit Hsp90 und Cdc37 assoziiert ist. Im Fall des IKK Komplexes scheint jedoch die Assoziation mit Hsp90 (und Cdc37) nicht ausreichend für die Aktivierbarkeit der Kinasen zu sein, da diese schon beeinträchtigt ist, während Hsp90 noch an die Kinase gebunden ist. Das würde bedeuten, dass die I $\kappa$ B Kinasen Hsp90 und Cdc37 auf eine unterschiedliche Weise benötigen als andere Kinasen, die als Hsp90-Substratproteine beschrieben worden sind.

### 3.2.2 Regulation des IKK Komplexes durch das Ko-Chaperon Cdc37

Das Ko-Chaperon Cdc37 wird im Komplex von Hsp90 mit vielen Kinasen gefunden. Dabei spielt Cdc37 nicht die Rolle eines bloßen Adaptor- oder Gerüstproteins, sondern beeinflusst aktiv den Chaperon-Zyklus von Hsp90, das heißt die ATP- und Substratbindung (Siligardi et al. 2002, Roe et al. 2004). In Überexpressionsstudien in Hefe wurde auch beobachtet, dass Cdc37 unabhängig von Hsp90 Chaperon-Funktionen übernehmen kann, jedoch weniger effizient als Hsp90 (Lee et al. 2002, Tatebe und Shiozaki 2003).

Es wurde vorgeschlagen, dass die Bindung von Hsp90 an Kinasen über Cdc37 vermittelt wird. Dabei soll ein amino-terminaler Bereich von Cdc37 für die Bindung an die Kinase benötigt werden, während die carboxy-terminale Hälfte an Hsp90 binden soll (Silverstein et al. 1998, Grammatikakis et al. 1999, Roe et al. 2004).

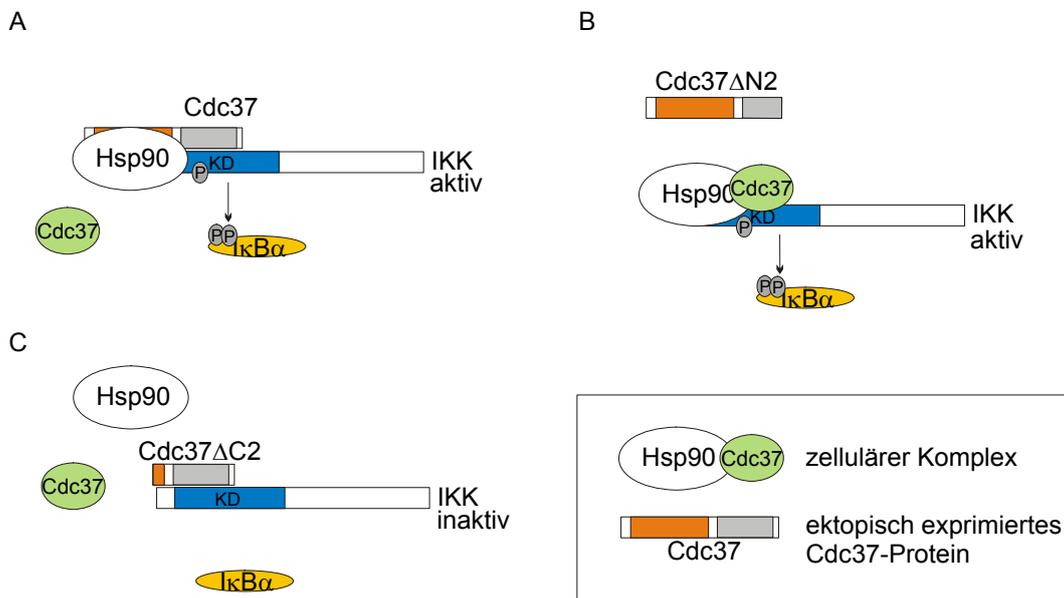
Geldanamycin und Radicol sind pharmakologische Hsp90-Inhibitoren mit einer hohen Spezifität (Piper 2001). Um zusätzlich zu den mit diesen Inhibitoren erhaltenen Ergebnissen auf einer weiteren Ebene die Funktion von Hsp90 und speziell von Cdc37 für den IKK Komplex untersuchen zu können, wurde eine Struktur-Funktionsanalyse mit verschiedenen Deletionsmutanten von Cdc37 durchgeführt. Diese sind in ihrer Fähigkeit, IKK oder Hsp90 zu binden, beeinträchtigt. Es ergibt sich dabei ein komplexeres Bild für die Interaktion von Cdc37 mit den I $\kappa$ B Kinasen als es zum Beispiel für Raf-1 beschrieben worden ist (Grammatikakis et al. 1999).

Die ektopisch exprimierten Kinasen sind bereits ohne Rezeptorstimulation katalytisch aktiv. Vermutlich bilden sich Homodimere oder Heterodimere (zusammen mit endogenen I $\kappa$ B Kinasen) und die Aktivierung erfolgt aufgrund der starken Expression durch Trans-/Autophosphorylierung. Dennoch führte die Ko-Expression von Cdc37 mit den I $\kappa$ B Kinasen zu einer Verstärkung der Aktivierungsschleifen-Phosphorylierung von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ . Die Ko-Expression von Cdc37 kann dazu beitragen, die Kinasen in eine Konformation zu bringen, in der die Trans-/Autophosphorylierung besser erfolgen kann, oder Cdc37 kann dies durch verstärkte Rekrutierung von Hsp90 vermitteln. Möglicherweise ist sonst die Menge an zellulärem Cdc37 limitierend für die Aktivität der ektopisch exprimierten I $\kappa$ B Kinasen. Denkbar ist auch die Verdrängung eines negativ regulatorisch wirkenden Faktors durch Cdc37, wie zum Beispiel Hsp70 (Ran et al. 2004).

Im Gegensatz zur Aktivierung der I $\kappa$ B Kinasen durch ein intaktes Cdc37-Protein, führte die Ko-Expression von verkürzten Cdc37-Proteinen zur Hemmung der Kinaseaktivität von ektopisch exprimierter I $\kappa$ B Kinase  $\alpha$  (Abb. 32). Das bedeutet, dass verschiedene Bereiche von Cdc37 benötigt werden, um eine Aktivierung von IKK zu ermöglichen. In Ko-Immunopräzipitationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass für eine gute Interaktion von Cdc37 mit zellulärem Hsp90 die gesamte Länge von Cdc37 benötigt wird. Alle dargestellten Deletionsmutanten (siehe Abb. 19A) binden Hsp90 nur noch sehr schlecht. Das Cdc37 $\Delta$ C2 Konstrukt, dem die postulierte Hsp90-Bindungsdomäne (Grammatikakis et al. 1999) fast komplett fehlt, ist überhaupt nicht mehr in der Lage, mit Hsp90 zu interagieren. Auch ein Konstrukt, das die komplette Hsp90-Bindungsdomäne umfassen soll, bindet Hsp90 schlechter als erwartet. Daher werden vermutlich weitere Bereiche von Cdc37 als diese so genannte Hsp90-Bindungsdomäne für die Interaktion mit Hsp90 benötigt. Möglicherweise erkennt Hsp90 die komplette Struktur von Cdc37 und interagiert nicht nur mit einer einzelnen Domäne. Ungeklärt ist bei der Expression von verkürzten Proteinen, ob diese in einer dem Wildtyp entsprechenden Konformation vorliegen, oder aufgrund der vorgenommenen Deletionen in einer veränderten Struktur exprimiert werden (Shao et al. 2003a).

Eine der Cdc37-Deletionsmutanten war nicht in der Lage, mit den I $\kappa$ B Kinasen zu interagieren, mit allen anderen Konstrukten konnte jedoch eine Assoziation nachgewiesen werden. Auch ein Konstrukt, dem die N-terminale Domäne fehlt ( $\Delta$ N), die für die Bindung an andere Kinasen benötigt wird (Grammatikakis et al. 1999, Shao et al. 2003b) konnte mit IKK $\alpha$  assoziieren. Das heißt, dass auch Bereiche im C-terminalen Teil des Cdc37-Proteins zur Bindung von IKK beitragen. Dagegen war das etwas längere Protein Cdc37 $\Delta$ N2 nicht mehr in der Lage, IKK $\alpha$  zu ko-immunopräzipitieren. Möglicherweise hemmen die zusätzlich exprimierten Aminosäuren im Vergleich zu Cdc37 $\Delta$ N die Interaktion mit IKK $\alpha$ , zum Beispiel durch intramolekulare Assoziation mit der Bindungsstelle. Cdc37 $\Delta$ N2 hatte als einzige der mit IKK $\alpha$  ko-exprimierten Deletionsmutanten keinen dominant-negativen Einfluss auf die Kinase-Aktivität. Das führt zu der Annahme, dass die dominant-negative Wirkung der Cdc37-Mutanten über die Bindung an IKK vermittelt wird. Da die Bindung von Hsp90 an diese verkürzten Cdc37-Proteine nicht oder nur sehr schlecht erfolgt, fehlt vermutlich Hsp90 zur Kinase-Aktivierung im Komplex aus den überexprimierten IKK- und verkürzten Cdc37-Proteinen, und die Kinase kann nicht aktiviert werden (Abb.

32). Das zelluläre Cdc37-Protein wird durch die ektopisch exprimierten Cdc37-Mutanten verdrängt.



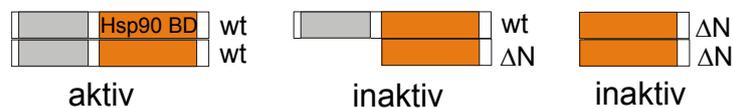
**Abbildung 32: Modell für den Einfluss von Cdc37-Mutanten auf die Aktivität von  $\text{I}\kappa\text{B}$  Kinasen.** (A) Assoziation des ektopisch exprimierten Cdc37-Proteins (Gesamtlänge) mit  $\text{IKK}\alpha$  und zellulärem Hsp90 hält  $\text{IKK}\alpha$  in einer aktiven Konformation und ermöglicht die Phosphorylierung von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ . (B) Die Deletionsmutante Cdc37 $\Delta$ N2 bindet nicht an  $\text{IKK}\alpha$ ,  $\text{IKK}\alpha$  liegt im Komplex mit zellulärem Hsp90 und Cdc37 vor und ist aktiv und in der Lage,  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  zu phosphorylieren. (C) Die Deletionsmutante Cdc37 $\Delta$ C2 bindet an  $\text{IKK}\alpha$ , aber nicht an Hsp90 und verdrängt dadurch den zellulären Hsp90-Cdc37-Komplex. Ohne Hsp90 liegt  $\text{IKK}\alpha$  in einer inaktiven Konformation vor,  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  wird nicht phosphoryliert. Ein ähnlicher Mechanismus ist für die Mutanten  $\Delta$ C4,  $\Delta$ N und  $\Delta$ NC denkbar.

Die Expression eines C-terminal verkürzten Cdc37 hatte auch einen dominant-negativen Effekt auf die Aktivierung der Kinase Raf-1 (Grammatikakis et al. 1999). Das dort benutzte Konstrukt entspricht dem hier verwendeten Cdc37 $\Delta$ C2. Raf-1 benötigt ebenfalls Hsp90 für die Aktivierung, dessen Rekrutierung durch die Überexpression des verkürzten Konstrukts verhindert wird.

Eine zusätzliche Möglichkeit für die beobachteten dominant-negativen Effekte könnte die Interferenz der verkürzten Cdc37-Proteine mit der Bildung von Cdc37-Dimeren sein. Auf diese Weise könnte der Aufbau eines funktionalen  $\text{IKK}$ -Hsp90-Cdc37-Komplexes verhindert werden. *In vitro* Daten zeigen die Dimerisierung einer C-terminalen Domäne von Cdc37 (Roe et al. 2004), aber auch eine N-terminale Region des Proteins ist in der Lage zu dimerisieren (Siligardi et al. 2002). Auch die Dimerisierung von Hsp90 ist vorgeschlagen worden (Maruya et al. 1999). Denkbar ist die Bildung von inaktiven Dimeren der verkürzten Cdc37-Formen untereinander oder von Heterodimeren mit zellulärem Cdc37-Protein, die nicht mehr in der Lage sind, mit

Hsp90 oder weiteren benötigten Faktoren zu interagieren (Abb. 33). Insbesondere das Cdc37 $\Delta$ N-Konstrukt bildete in Immunopräzipitationsexperimenten Homodimere. So ist speziell für dieses Konstrukt, das auch bei Expression in Bakterien zu Aggregation neigte, ein von der Bindung an IKK unabhängiger Mechanismus für die dominant-negative Wirkung auf IKK $\alpha$  denkbar.

Des Weiteren ist es jedoch auch möglich, dass die durch die Expression der Cdc37-Deletionsmutanten hervorgerufenen dominant-negativen Effekte unabhängig von einer Cdc37-Dimerisierung oder der Bindung an IKK sind und über einen indirekten Mechanismus ablaufen.



**Abbildung 33: Modell zur Dimerisierung von Cdc37.** Dargestellt ist Cdc37 der Gesamtlänge (wt) oder eine Deletionsmutante ( $\Delta$ N). In grau ist die für einige Kinasen beschriebene Bindungsdomäne, in orange die Hsp90-Bindungsdomäne (Hsp90 BD) gezeichnet. Die Bildung von Dimeren mit der verkürzten Cdc37-Mutante ( $\Delta$ N) beeinflusst möglicherweise die Fähigkeit zur Bindung von Hsp90 und zur Aktivierung von Substratproteinen.

Eine interessante Beobachtung wurde bezüglich der Assoziation von IKK und Cdc37 gemacht. Kinase-inaktive Mutanten von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  binden sehr viel besser an flagCdc37 als die nicht veränderten Kinasen; eine Beobachtung, die auch für die Bindung von IKK $\beta$  an I $\kappa$ B $\alpha$  gemacht wurde (Woronicz et al. 1997). Die hier exprimierten Mutanten sind durch eine Mutation in der ATP-Bindungsstelle der Kinasen nicht mehr katalytisch aktiv, es handelt sich um eine Substitution von Lysin an Position 44 der Aminosäuresequenz mit Alanin (Woronicz et al. 1997). Cdc37 und Hsp90 binden an die Kinasedomäne der I $\kappa$ B Kinasen (Chen et al. 2002). Der Ersatz der großen, positiv geladenen Seitenkette des Lysins durch die Methylgruppe des Alanins kann die Tertiärstruktur der Kinasedomäne modifizieren und auf diese Weise die Bindung von Cdc37 begünstigen. Möglicherweise spielt dieses Lysin auch eine direkte, ungünstige Rolle für die Assoziation der beiden Proteine und die Entfernung der positiven Ladung erleichtert die Bindung. Für die Bindung von I $\kappa$ B $\alpha$  an die I $\kappa$ B Kinasen wurde eine verringerte Bindungsaffinität des phosphorylierten I $\kappa$ B $\alpha$  beobachtet (Regnier et al. 1997, Woronicz et al. 1997). Da sowohl I $\kappa$ B $\alpha$  als auch Cdc37 (siehe 3.2.3) von IKK phosphoryliert werden, ist ein ähnlicher Mechanismus

auch für Cdc37 denkbar. Die Assoziation der Kinasen mit dem nicht-phosphoryliertem Cdc37 wäre demnach stabiler. In jedem Fall wird die Bedeutung der Kinasedomäne von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  für die Interaktion mit Cdc37 durch diese Experimente bestätigt.

Für die Kinasen Cdk4 und Raf-1 wurde ebenfalls der Einfluss der ATP-Bindungsstelle der Kinasen auf die Assoziation von Cdc37 festgestellt. Dort wird eine konservierte Gly-X-Gly-X-X-Gly-Sequenz für die Bindung von Cdc37 benötigt (Zhao et al. 2004). Diese Sequenz in der ATP-Bindungsstelle bindet normalerweise die nicht transferierbaren Phosphatreste des ATP. Auch die Proteinsequenzen von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  weisen dieses Motiv auf (Pos. 22-27), jedoch nicht in direkter Nachbarschaft mit dem hier mutierten Lysin an Position 44. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die ATP-Bindungsstellen der Kinasen eine wichtige Rolle für die Bindung von Cdc37 spielen.

### 3.2.3 Cdc37 wird von IKK $\alpha$ und IKK $\beta$ phosphoryliert

Es wurde vorgeschlagen, dass die Bindung von Cdc37 an Kinasen durch die Phosphorylierung des Serins an Position 13 der Aminosäuresequenz von Cdc37 begünstigt wird (Shao et al. 2003b, Miyata und Nishida 2004). Diese Phosphorylierung soll durch CK2 (*Casein Kinase II*) erfolgen. Bei der Ko-Expression von Cdc37 mit IKK $\alpha$  oder IKK $\beta$  wurde im Western Blot eine im SDS-Gel langsamer migrierende Spezies von Cdc37 detektiert. Durch die Behandlung mit Alkalischer Phosphatase konnte nachgewiesen werden, dass es sich dabei um eine phosphorylierte Form von Cdc37 handelt. Die Kinase-Aktivität der I $\kappa$ B Kinasen wird für die beobachtete Modifikation benötigt, da bei der Expression Kinase-inaktiver Mutanten von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  das ko-exprimierte Cdc37 nicht phosphoryliert wird. Auch zelluläre, durch TNF $\alpha$  aktivierte I $\kappa$ B Kinasen, sind in der Lage, Cdc37 zu phosphorylieren. Ein *in vitro* Kinase-Experiment mit rekombinantem IKK $\beta$ -Protein zeigte, dass Cdc37 direkt von IKK $\beta$  phosphoryliert werden kann und keine IKK-abhängige oder ko-päzipitierte Kinase benötigt wird. Der Einsatz von komplementären Cdc37-Deletionsmutanten ( $\Delta$ C2 und  $\Delta$ N) als Substrat im Kinase-Versuch ergab, dass mehrere Phosphorylierungsstellen in der Cdc37-Sequenz für IKK $\beta$  existieren, im N-terminalen und im C-terminalen Bereich des Proteins, da beide verkürzten Proteine phosphoryliert werden. Die S13A-Mutation verhindert in diesem direkten Phosphorylierungsversuch nicht die Phosphorylierung von Cdc37, das heißt,

dass die hier beobachteten Modifikationen zusätzlich zu der beschriebenen S13-Phosphorylierung erfolgen. Auch die Bindung an IKK $\alpha$  und die Kinase-Aktivität von IKK $\alpha$  sind nicht durch die Substitution von Serin 13 nach Alanin beeinträchtigt, also nicht von diesem Serinrest (oder seiner Phosphorylierung) abhängig. Welche Funktion die Phosphorylierung von Cdc37 durch die I $\kappa$ B Kinasen haben kann, ist noch unklar. Denkbar wäre auch hier ein Einfluss auf die Bindung zwischen IKK und Cdc37 oder die Rekrutierung von Ko-Faktoren zur Kinase-Aktivierung, -Stabilisierung oder -Deaktivierung.

Ein typisches Sequenzmotiv für die Phosphorylierung durch die I $\kappa$ B Kinasen lautet DS $\Psi$ XXS (Hu et al. 2004). In der Proteinsequenz von Cdc37 existieren mehrere Serin- und Threonin-Reste, die auf eine saure Aminosäure folgen (Aspartat oder Glutamat), was auf eine mögliche IKK-Phosphorylierungsstelle hinweisen könnte. Das beschriebene Motiv ist jedoch verknüpft mit der auf die Phosphorylierung folgende Erkennung durch Ubiquitin-Ligasen für eine proteasomale Degradation des Proteins (Karin und Ben-Neriah 2000), die für Cdc37 keine Rolle zu spielen scheint. Deshalb kommen hier als potenzielle Phosphorylierungsstellen auch andere Serin- und Threoninreste in Frage.

### 3.2.4 Aktivierungsmechanismen des IKK Komplexes

Die letztlich zur Aktivierung des IKK Komplex führenden Prozesse sind nicht bekannt. Deshalb kann bezüglich der Rolle, die Hsp90 und Cdc37 für den Aktivierungsprozess des IKK Komplexes spielen, nur spekuliert werden. Ein Modell für den Aufbau des IKK Komplexes schlägt ein Tetramer von IKK $\gamma$  als Gerüst vor, an das zwei Kinasedimere binden können (Tegethoff et al. 2003). Durch strukturelle Veränderung, hervorgerufen zum Beispiel durch Bindung eines aktivierenden Peptids oder eines aktivierten, membrangebundenen Komplexes, könnte der Komplex in eine Konformation gebracht werden, in der Trans-/Autophosphorylierung zur Aktivierung der Kinasen führt. Alternativ könnten andere Kinasen rekrutiert werden, die IKK $\alpha/\beta$  in der Aktivierungsschleife phosphorylieren (Hayden und Ghosh 2004).

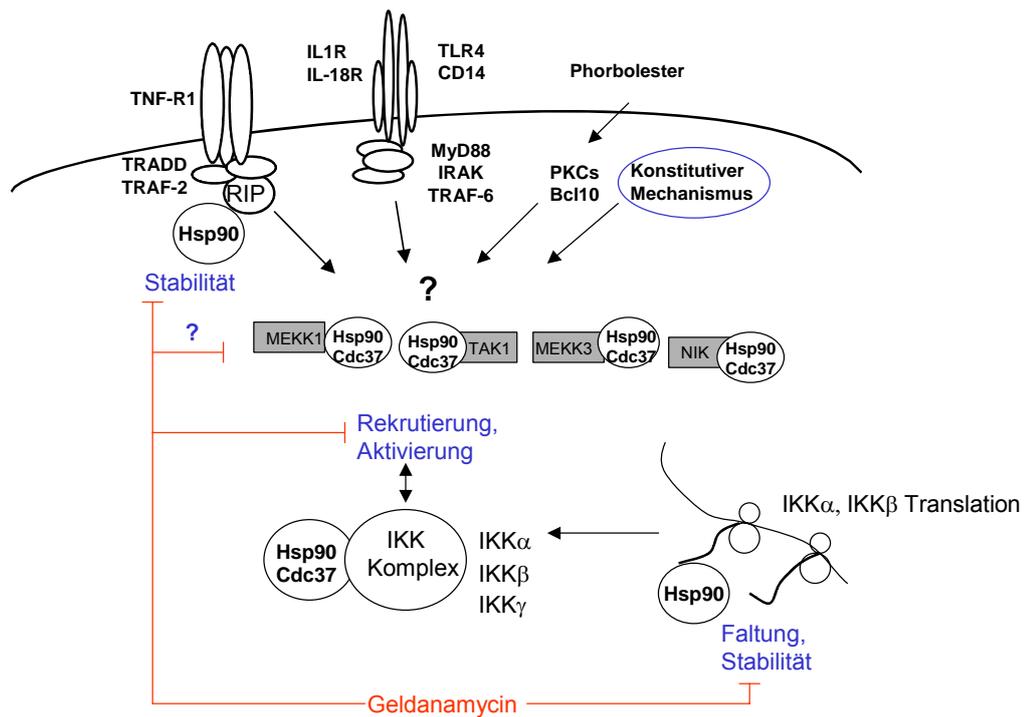
Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Funktion von Hsp90 benötigt wird, um die I $\kappa$ B Kinasen als Antwort auf verschiedene Stimuli zu aktivieren. Eine denkbare Aufgabe von Hsp90 (gemeinsam mit Cdc37) könnte darin bestehen, den Komplex in einer Konformation zu halten, in der Aktivatoren an den Komplex binden können oder die Zugänglichkeit für post-translationale Modifikationen zu gewährleisten. Für

PKB/Akt wurde vorgeschlagen, dass die Assoziation mit Hsp90 die Dephosphorylierung der Kinase verhindert und sie so in einem aktivierbaren Zustand hält (Sato et al. 2000). Eine weitere mögliche Aufgabe für Hsp90 könnte die Vermittlung der Rekrutierung an einen – je nach Stimulus – aktivierten Rezeptor sein. So wurde von Chen et al. (2002) eine Inhibition der Rekrutierung des Komplexes an den TNF-Rezeptor1 nach Hsp90-Inhibition und TNF $\alpha$ -Stimulation beobachtet.

Basierend auf biophysikalischen Untersuchungen humaner Hsp90-Proteine wurde festgestellt, dass die beiden Hsp90-Moleküle in einem Hsp90-Dimer nicht synchron bezüglich ihrer ATPase-Aktivität und der Bindung von Substratprotein funktionieren müssen (McLaughlin et al. 2004). Ein Hsp90-Dimer kann also theoretisch auch zwei verschiedene Substratproteine binden. Für die Aktivierung des IKK Komplexes könnte also ein möglicher Aktivator durch die gleichzeitige Bindung an ein Hsp90-Dimer in räumliche Nähe zum IKK Komplex gebracht werden.

Die hier dargestellten Daten zeigen, dass Hsp90 in gleichem Maße für die Aktivierung von IKK durch TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und Phorbol ester, sowie für die konstitutive Aktivierung in Lymphomzellen benötigt wird. Dabei scheint ein genereller, für die Aktivität des IKK Komplexes essenzieller Vorgang durch die Hsp90-Inhibition beeinträchtigt zu sein, zusätzlich zu den Folgen der Hsp90-Inhibition für die Biosynthese der I $\kappa$ B Kinasen und in Bezug auf die Assemblierung des Komplexes.

Viele Kinasen, die an Signalübertragungsprozessen beteiligt sind, sind als Hsp90-Substratproteine identifiziert worden (Abb. 34). Für die hier beobachteten Effekte der Inhibition von Hsp90 auf die Aktivierung des IKK Komplexes ist es aber nicht sehr wahrscheinlich, dass diese ausschließlich indirekt über die Hemmung anderer Kinasen zustande kommen (siehe 3.2.1). So wurde zum Beispiel RIP1 als Hsp90-abhängig beschrieben, jedoch spielt RIP1 nur für die Signaltransduktion über den TNF-Rezeptor 1 eine Rolle, nicht aber für die Aktivierung von IKK durch IL-1 oder Phorbol ester. Des Weiteren erfolgt die Hemmung der I $\kappa$ B Kinasen nach Hsp90-Inhibition sehr schnell und wurde für auf verschiedene Arten exprimierte bzw. aktivierte Formen von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  gleichermaßen beobachtet.



**Abbildung 34: Beeinflussung der IKK Aktivierung und Synthese durch Geldanamycin.** Dargestellt sind die Aktivierungswege von IKK durch verschiedene Stimuli. Für die grau unterlegten Proteine sind Aufgaben in der Aktivierung von IKK und die Assoziation mit Hsp90 und Cdc37 beschrieben worden. Geldanamycin wirkt destabilisierend auf RIP1 (Lewis et al. 2000) und beeinträchtigt die Synthese und Aktivierung des IKK Komplexes. Für MEKK1, MEKK3, TAK1 und NIK wurde die Assoziation mit Hsp90 und Cdc37 gezeigt (Bouwmeester et al. 2004), der Einfluss von GA auf die Stabilität dieser Proteine wurde jedoch bisher nicht untersucht.

### 3.3 Hsp90 als Regulator der konstitutiven NF-κB Aktivität in Tumorzellen

Die malignen Zellen des Hodgkin-Lymphoms, Hodgkin-/Reed-Sternberg (HRS)-Zellen, zeichnen sich durch konstitutive Aktivität von NF-κB aus. Dabei ist der Mechanismus, der zu dieser Deregulation führt, bisher nicht bekannt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass HRS-Zellen TNFβ (LTα) oder TNFα und TNFβ sezernieren und dadurch auf parakrine Weise NF-κB in anderen Zellen aktivieren können. Es konnte aber auch nachgewiesen werden, dass die NF-κB-Aktivität der HRS-Zellen nicht durch einen autokrinen Mechanismus über diese Zytokine hervorgerufen wird.

Eine wichtige Frage ist, ob sich die konstitutive NF- $\kappa$ B-Aktivität grundsätzlich von der transienten Aktivierung des Transkriptionsfaktors unterscheidet. Ein möglicher Unterschied könnte die Erfordernis von Ko-Faktoren für die Aktivierung sein. Deshalb wurde der Einfluss der Inhibition von Hsp90 auf die konstitutive Aktivität von NF- $\kappa$ B und IKK untersucht. Die Effekte der Hsp90-Inhibition in HRS-Zellen stimmten in allen Belangen mit denen für die transiente Aktivierung in HeLa- oder Namalwa-Zellen gemachten Beobachtungen überein. Die Kinaseaktivität des IKK-Komplexes konnte in allen Zelllinien inhibiert werden, allerdings wurde nur in HRS-Linien, die intakte I $\kappa$ B $\alpha$ -Moleküle exprimieren, eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität festgestellt. Das selbe Ergebnis wurde für die Hemmung der konstitutiven I $\kappa$ B Kinase-Aktivität und NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B in HRS-Zellen durch Natrium-Arsenit erzielt (Mathas et al. 2003). In einigen HRS-Zelllinien kommt die NF- $\kappa$ B-Aktivität folglich durch einen Defekt in der Expression des zellulären Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$  zustande, unabhängig von der Aktivität des IKK-Komplexes oder der Expression anderer I $\kappa$ B-Proteine (Emmerich et al. 1999, Krappmann et al. 1999). Dennoch findet man in allen untersuchten Fällen konstitutive Aktivität der I $\kappa$ B Kinasen (Krappmann et al. 1999). Durch die Behandlung der HRS-Zellen mit Hsp90-Inhibitoren wird die IKK-Aktivität in allen Zelllinien gehemmt. Gibt es jedoch kein intaktes I $\kappa$ B $\alpha$ , kann NF- $\kappa$ B trotzdem aktiv im Kern vorliegen. Der Befund, dass die DNA-Bindungsaktivität nur in Zellen mit Wildtyp-I $\kappa$ B $\alpha$ -Molekülen gehemmt werden kann, bestätigt die Spezifität der beobachteten Effekte.

Insgesamt weisen die Ergebnisse und der Zeitverlauf der Hsp90-abhängigen Hemmung der I $\kappa$ B Kinasen in HRS-Zellen auf einen gleichen Mechanismus für die Aktivierung des IKK-Komplexes (in Bezug auf die Erfordernis von Hsp90) hin wie in HeLa- oder Namalwa-Zellen. So wird zum Beispiel in allen Fällen die Phosphorylierung der IKK-Aktivierungsschleife durch GA-Behandlung der Zellen inhibiert oder vermindert. Ebenfalls wird Hsp90 in HRS-Zellen für die Biosynthese der IKKs benötigt, die Proteinmenge von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  wird nach längerer Hsp90-Inhibition stark verringert.

Die Aktivität von NF- $\kappa$ B spielt eine wichtige Rolle für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms und wird für Proliferation und den Schutz der HRS-Zellen vor Apoptose benötigt (Bargou et al. 1997). Dafür sind viele Proteine verantwortlich, deren Expression durch NF- $\kappa$ B reguliert wird (Hinz et al. 2001). Inwieweit ist es möglich,

über die Hemmung von Hsp90 auf die Expression der Zielgene von NF- $\kappa$ B Einfluss zu nehmen? Es wurde die Expression von verschiedenen Zielgenen auf der mRNA-Ebene nach 14-stündiger Behandlung mit GA oder 17-AAG im Northern Blot überprüft. In einigen Fällen ist die mRNA-Menge deutlich reduziert, zum Beispiel für  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , ein Gen, für das keine weiteren Regulatoren außer NF- $\kappa$ B selbst bekannt sind. Dagegen sind die Effekte für die CCR7-mRNA schwächer ausgeprägt, was vermutlich mit der Ko-Regulation dieses Gens durch den Transkriptionsfaktor AP-1 zu tun hat. AP-1 ist in HRS-Zellen ebenfalls konstitutiv aktiv, wird aber nicht durch Hsp90-Inhibition gehemmt. In den L428-Zellen hat die Hsp90-Inhibition keine oder nur eine sehr geringe Wirkung auf die mRNA-Menge der untersuchten Gene.

Auf Proteinebene war die Expression der Zielgene nach 24-48-stündiger Hsp90-Inhibition in fast allen Fällen verringert, jedoch sind die Effekte in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich stark. Das Proteinlevel von p65 war von der Hsp90-Inhibition nicht beeinflusst. Auch in L428-Zellen konnten verminderte Proteinmengen beobachtet werden, obwohl in diesen Zellen aufgrund des  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Defekts keine Hemmung der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung festzustellen war. Das heißt, dass die Veränderungen auf die Transkription der Zielgene, wie sie im Northern Blot überprüft wurde, direkter mit dem Einfluss der Hsp90-Inhibition auf die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität und Transkriptionsaktivierung zusammenhängen als die beobachtete Reduktion der Proteinmengen im Western Blot. Es ist auch nicht auszuschließen, dass die untersuchten Proteine selbst Hsp90 für Stabilisierung oder Synthese benötigen und die beobachteten Effekte unabhängig von NF- $\kappa$ B sind.

Diese Ergebnisse führten zu der Frage, ob die Hemmung der Hsp90-Funktion – und die daraus resultierende verminderte Expression anti-apoptotischer Zielgene von NF- $\kappa$ B – Apoptose der HRS-Zellen auslösen würde. Nach Hsp90-Inhibition für 48 h konnte ein erhöhter Anteil an apoptotischen Zellen durch FITC-Annexin-Färbung nachgewiesen werden. Die NF- $\kappa$ B-Spezifität dieser Effekte wurde durch die Tatsache belegt, dass die Apoptose-auslösende Wirkung in den Zellen ohne Wildtyp- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  geringer war als in den Zellen, in denen die Hsp90-Inhibition auch zu verminderter NF- $\kappa$ B DNA-Bindung führte. In HRS-Zellen ist normalerweise die Induktion von Apoptose über den Fas-Death-Rezeptor durch die NF- $\kappa$ B-abhängige starke Expression des Inhibitor-Proteins c-FLIP blockiert (Mathas et al. 2004). Die NF- $\kappa$ B-Inhibition durch GA sensibilisiert die Zellen für Fas-vermittelte Apoptose.

### 3.4 Hsp90 und der NF- $\kappa$ B-Signalweg als Ziel pharmakologischer Intervention

Die Behandlung von malignen Zellen des Hodgkin-Lymphoms mit Hsp90-Inhibitoren führte zu verminderter Expression von NF- $\kappa$ B-Zielgenen, zu denen unter anderem viele anti-apoptotische Gene gehören. Als Folge davon konnte ein erhöhter Anteil apoptotischer Zellen nach Hsp90-Inhibition festgestellt werden.

Hsp90-Inhibitoren wie das Geldanamycin-Analogon 17-AAG befinden sich derzeit in klinischen Studien zur Behandlung von Tumorerkrankungen. Viele Proteine, die für Tumorentstehung und Tumorwachstum eine Rolle spielen, sind Substratproteine von Hsp90. So ist es möglich, durch die Behandlung mit einem Hsp90-Inhibitor mehrere Ziele in der Zelle gleichzeitig anzugreifen und dadurch verschiedene, für die Lebensfähigkeit des Tumors wichtige Signalwege zu inhibieren (Maloney und Workman 2002).

Konstitutive IKK- und NF- $\kappa$ B-Aktivität ist ein Charakteristikum verschiedener maligner Erkrankungen (Rayet und Gelinas 1999) und wird besonders häufig bei malignen Lymphomen gefunden. Aufgrund der NF- $\kappa$ B-abhängigen Expression anti-apoptotischer und Zellwachstum fördernder Gene, stellt der NF- $\kappa$ B-Signalweg ein mögliches Ziel pharmakologischer Intervention dar. Der Einsatz von Hsp90-Inhibitoren zur Behandlung von Tumor-Erkrankungen mit konstitutiver NF- $\kappa$ B-Aktivität bietet den Vorteil, dass neben der Inhibition von IKK – und dem damit verbundenen Einfluss auf die Expression von anti-apoptotischen Zielgenen – auch noch andere Stresssignalwege gehemmt werden können. So kann zum Beispiel zusätzlich die Zellzykluskontrolle und Proliferation des Tumors angegriffen werden. Des Weiteren hat Hsp90 aus Tumorzellen eine wesentlich höhere Bindungsaffinität zu 17-AAG als das Hsp90-Protein aus normalen Zellen. Die ATPase-Aktivität von Hsp90 in Tumorzellen ist höher und es liegt weitgehend in Komplexen mit vielen Ko-Chaperonen vor, während es in normalen Zellen größtenteils in freier Form vorkommt (Kamal et al. 2003). Diese Erkenntnisse machen Hsp90 zu einem interessanten Ziel in der Tumorthherapie, da dadurch die Wahrscheinlichkeit von unerwünschten Wirkungen der Hsp90-Inhibition in normalen Zellen verringert wird.

In einem Maus-Modell mit xenotransplantierten Hodgkin-Tumoren wurde der Rückgang der Tumore durch die Behandlung mit Arsen-Trioxid ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) erreicht (Mathas et al. 2003), das IKK durch die Bindung an Cystein 179 in der

Aktivierungsschleife inhibiert (Kapahi et al. 2000). Eine ähnliche Wirkung könnte möglicherweise auch mit Hsp90-Inhibitoren erzielt werden.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Hsp90 und Cdc37 für die Aktivierung des IKK Komplexes dargestellt. Die Hemmung der ATPase-Aktivität von Hsp90 führt zur Inhibition von transienter und konstitutiver Aktivierung von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ . Insbesondere die Hemmung der konstitutiven IKK-Aktivität in Zellen des Hodgkin-Lymphoms macht den Einsatz von Hsp90-Inhibitoren in Erkrankungen mit konstitutiver NF- $\kappa$ B-Aktivität denkbar, zumal Hsp90-Inhibitoren bereits in anderen Fällen in klinischen Tests zur Tumorthherapie eingesetzt werden.