Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. M. Burchardt)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema:

Tumorsuppressor-Funktion der mikroRNA miR-1 in Prostatakarzinom-Zellen

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2013

vorgelegt von:
Christian Robert Hendrik Stender
geboren am: 01.09.1982
in: Hamburg

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur
1. Gutachter:	Prof. Dr. med. Martin Burchardt
2. Gutachter:	PD. Dr. med. Christof Börgermann
Ort, Raum:	Universitätsmedizin Greifswald, Seminarraum N0.03
Tag der Disputation:	05.12.2016

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 3
1.1 Molekularbiologische Aspekte des Prostatakarzinoms 3
1.2 Mechanismen der Proliferation und Apoptose-Resistenz im PCa 4
1.3 mikroRNAs und Onkogene 6
1.4 Zielstellung 11
2. Material 12
2.1 Geräte 12
2.2 Verbrauchsmaterial 12
2.3 Chemikalien und Biochemikalien 13
2.4 Lösungen 15
2.5 Kits 17
2.6 Enzyme 17
2.7 Antikörper 17
2.8 Primer 18
2.9 DNA-Plasmide 18
2.10 Antibiotika 19
2.11 Zelllinien 19
2.12 Zellkultur 19
3. Methoden 20
3.1 Zellbiologische Methoden 20
3.1.1 Zellpassage 20
3.1.2 Transfektion von Zellen 20
3.2 Molekularbiologische Methoden 22
3.2.1 Präparation von miRNA 22
3.2.2 Quantitative RT-PCR von miRNA 23
3.2.3 Trizol-Präparation 26
3.2.4 Quantitative RT-PCR von mRNA 27
3.3 Biochemische Methoden 28
3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 28
3.3.2 Western-Blotting 29

4. Ergebnisse 31
4.1 miR-1-Nachweis im Zellkulturmodell 31
4.2 miR-1-Regulation in primärem PCa-Gewebe 32
4.3 Inhibition und Überexpression von miR-1 in PC-3- und LNCaP-Zellen 33
4.3.1 miR-1-Überexpression in LNCaP-Zellen 33
4.3.2 miR-1-Inhibition in PC-3-Zellen 35
4.4 Die Auswirkung von miR-1-Regulation auf PCa-relevante HSPs 36
4.4.1 Expression der HSPs nach miR-1-Inhibition und -Überexpression 36
4.5 Die Auswirkungen der miR-1-Regulation auf den AR 40
4.6 Identifizierung von Zielen der miR-1-Regulation in PC-3-Zellen via DNA-Microarray-Analyse 42
5. Diskussion 46
6. Zusammenfassung 54
7. Literaturverzeichnis 55
8. Abkürzungsverzeichnis 60
9. Danksagung 62

1. Einleitung

1.1 Molekularbiologische Aspekte des Prostata-karzinoms

Das Prostatakarzinom (PCa) war mit über 25 % der Krebsneuerkrankungen in Deutschland im Jahre 2008 nicht nur mit Abstand das häufigste Karzinom des Mannes, sondern gehörte auch zu den tödlichsten Karzinomen[1]. Trotz dieser hohen klinischen Relevanz und intensiver Forschung sind die genauen molekularen Mechanismen dieser Erkrankung noch zu einem großen Teil unverstanden.

Die molekularbiologische Forschung hat bis heute einige Mechanismen der Malignisierung des PCa identifizieren können. Hierzu gehören Faktoren und Signalwege, welche die Proliferation und Progression des PCa fördern. Hier ist vor allem der Androgenrezeptor (AR) zu nennen. Dieser ist in den Prostataepithelzellen nicht nur für das Wachstum des gesunden Gewebes, sondern auch für die Proliferations-Fähigkeit maligner Neoplasien essentiell[2]. Im Umfeld des AR wurden zudem bestimmte Hitzeschock-Proteine (HSPs) wie z. B. HSP27, HSP70 und HSP90, welche für die Funktionalität des AR wichtig sind und die ebenfalls eigene Rollen im Malignisierungs-Prozess spielen, untersucht[3-5].

Neben dem zytoplasmatischen AR konnten noch weitere, z. T. membranständige Rezeptorkinasen für Proliferation und Progression des PCa mitverantwortlich gemacht werden, wie z. B. EGFR, MET, FGFR2c und ERBB2[6]. Auch Mutationen in Onkogenen wie pRB1, p53 und bcl-2 tragen nachweislich zu Progression bei und verhindern die Apoptose von malignen Karzinomzellen der Prostata[7-9].

Das multifunktionelle Zytokin TGF-β nimmt im PCa eine durchaus spezielle Rolle ein. TGF-β wurde als pro- und anti-onkogen beschrieben, abhängig vom Entwicklungsgrad des Malignoms und vom Status des TGF-β Rezeptors in den Zellen. Das Karzinom-Gewebe scheint dabei zunächst das TGF-β und seine

Rezeptoren als Wachstumsbremse auszuschalten. In späteren Stadien allerdings wird TGF-β überexprimiert und wirkt wachstumsfördernd[10].

1.2 Mechanismen der Proliferation und Apoptose-Resistenz im PCa

HSP27, HSP70 und HSP90 zeichnen sich für variable Funktionen innerhalb prostatischer Zellen verantwortlich. Zum einen tragen sie zur Stabilisierung des AR im Zytoplasma bei und sorgen dafür, dass dieser sein Substrat binden kann. Zum anderen erfüllen sie auch unabhängig davon eigene Aufgaben in Zellsignalwegen, die Proliferation und Zellüberleben regulieren. Ihre zytoprotektiven Wirkungen sind auch für maligne Transformations-Prozesse von größter Wichtigkeit, so wie auch die von ihnen in allen Zellen verübte Funktion der Proteinfaltungskontrolle, die ihnen den alternativen Namen Chaparone einbrachte[3,11].

Als Hitzeschock-Proteine wurden sie bezeichnet, weil ihr breiter Aufgabenbereich erst nach dem Applizieren zellulären Stresses (z. B. in Form von Hitze) zur vollen Geltung kommt. Sie verhindern in solch einer Situation die Denaturierung wichtiger Proteine und stellen die Zellsignalwege so um, dass die Zelle auf den zellulären Stress adäquat reagieren kann. Die Funktion Proteine zu stabilisieren, welche fehlgefaltet oder beschädigt zu sein scheinen, hat dabei auch einen fatalen Charakter. So tragen HSPs essentiell zur Tumorigenese bei, indem sie z. B. mutierte Onkogene stabilisieren und damit eine Degradation dieser verhindern. Dadurch können solch dysfunktionale Faktoren ihre z. B. pro-proliferativen Aktivitäten im Übermaß betreiben, obwohl sie von der zellulären Kontrollmaschinerie hätten degradiert werden müssen. Die zytoprotektiven Eigenschaften der HSPs verhelfen malignen Zellen zudem oft zu Resistenzen gegenüber Zytostatika oder senken deren Sensibilität auf zytotoxische Reagenzien[4,12].

HSP27, HSP70 und HSP90 üben einen Großteil ihrer pro-proliferativen Funktion im PCa über die Modulierung des Androgenrezeptors aus[3,11]. Dieser liegt inaktiviert zunächst zytoplasmatisch vor, komplexiert von Hitzeschock-

Proteinen und anderen Kofaktoren. Nach Bindung des Substrates verändert er seine Konformation, dadurch dissoziieren die HSPs und Kofaktoren von ihm ab, woraufhin er in den Zellkern transloziert. Dort bindet er an Androgen Response Elements (ARE), die sich in Promotor- und Enhancer-Bereichen von Genen befinden, die für Wachstum und Überleben der Zelle verantwortlich sind. Auch für maligne Zellen sind die AR-regulierten Gene unverzichtbar[13]. In späteren Tumorstadien gelingt es den Zellen allerdings unter Selektionsdruck, u. a. durch Therapie, den AR als Aktivator solcher Gene zu umgehen[14].

Auch unkomplexiert spielen HSP70 und HSP90 eine wichtige Rolle in malignen Prozessen. So kontrolliert HSP70 u. a. wichtige Signalwege der Zelle, indem es auf einzelne Proteine in diesen Kaskaden Einfluss hat. Darüber vermittelt es u. a. seine pro-proliferativen[15], anti-apoptotischen Eigenschaften[4]. Es hat beispielsweise einen inhibierenden Einfluss auf Moleküle, welche die Apoptose steuern, wie JNK, AIF oder Cathepsine, und einen begünstigenden Einfluss auf Akt, ein Enzym, das in Signalwege involviert ist, die das Zellüberleben und Proliferation ermöglichen[4]. HSP90 ist u. a. bekannt für seine Fähigkeit mutierte Onkogene zu stabilisieren, die ihrerseits Signalwege antreiben, die die Zelle, konsekutiv aktiviert, entarten lassen können[12].

HSP27 spielt dabei eine noch nicht gänzlich geklärte Rolle. Bisher erforscht ist eine Interaktion zwischen Androgen-gebundenem AR und HSP27, bei der HSP27 nach Aktivierung des AR phosphoryliert wird und dadurch seinerseits wiederrum den AR stabilisiert. Des Weiteren scheint HSP27 Einfluss auf die Expression des AR zu haben. Neben diesen Rollen hat das HSP27 außerdem negativen Einfluss auf pro-apoptotische Faktoren wie Smac, Caspase 9 und Apaf1 und wie das HSP70 einen positiven Einfluss auf den pro-proliferativen Faktor Akt[4].

1.3 mikroRNAs und Onkogene

mikroRNAs (miRNAs oder miRs) sind sehr kurze, durchschnittlich 22 Nukleotide lange, einzelsträngige RNA-Moleküle, deren Sequenzen entweder in Bereichen zwischen den Genen, oder aber mitten in die Introns von proteinkodierenden Gensequenzen eingebettet sind. Nachdem sie transkribiert wurden supprimieren sie die Expression spezifischer Gene, indem sie durch komplementäre Bindung an deren mRNA die Translation verhindern. Diese negative Regulation von Genen über die Bindung komplementärer RNA an die zugehörige mRNA wird als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet. Aufgrund dieser Fähigkeit üben miRNAs oft einen feinregulatorischen Effekt auf die Genexpression aus. Da miRNAs aus sehr kurzen Sequenzen bestehen, können sie an viele verschiedene mRNAs binden. Umgekehrt hat eine mRNA somit viele verschiedene potentielle miRNA-Bindungsstellen[16]. Dieses System der Genregulation spielt, wie man heute weiß, eine wichtige Rolle in z. T. basalen zellulären Prozessen[17].

Für miRNAs kodierende Sequenzen sind weit über alle Chromosomen des Menschen verteilt. Die miRNAs entstehen wie mRNAs durch Transkription und Prozessierung von einem Vorläufermolekül in die endgültige Form. Das mehrere hundert Nukleotide lange Primärtranskript, welches als Pri-miRNA bezeichnet wird, bildet aufgrund von komplementären Sequenzen innerhalb des Einzelstranges eine so genannte Haarnadelschleife aus. Im weiteren Verlauf wird die Pri-miRNA u. a. durch die nukleäre RNAse Drosha weiter in ein kürzeres Molekül prozessiert, das ab dann Prä-miRNA heißt. Die Prä-miRNA wird anschließend unter Energieverbrauch aus dem Kern in das Zytoplasma exportiert. Dort wird der Prekursor von dem Enzym DICER weitergespalten und an einen Proteinkomplex gebunden, der als RISC (RNA-Induced-Silencing-Complex) bezeichnet wird. Die miRNA liegt nun gebunden an diesen Komplex in ihrer endgültigen Form vor. Ihre Funktion ist es nun, den RISC zu ihren Ziel-mRNAs zu geleiten, an die sie im Folgenden bindet. Die gebundene mRNA wird dann entweder bei exakter Kompatibilität mit der miRNA von Argonaut-RNAsen degradiert, oder bei inkompletter Bindung lediglich räumlich davon abgehalten, am Ribosomen translatiert zu werden[18] .

Ursprünglich wurde miRNA-vermittelte RNAi als ein System zur antiviralen Abwehr angesehen[19]. Doch in den letzten zehn Jahren gab es einen rasanten Zuwachs an Erkenntnissen im Bereich der miRNA-Funktionen. So weiß man heute, dass miRNAs in erheblichem Maße an physiologischen Prozessen der Zelle beteiligt sind. Sie haben Auswirkungen auf den Erhalt von Stammzell-Eigenschaften, sowie auf die Differenzierung von Gewebe. Sie spielen verschiedene Rollen in Zellzyklus-Prozessen und haben Auswirkungen auf das Überleben von Zellen, sowie auf Apoptose[16]. Von den bis heute gefundenen miRNAs werden einige ubiquitär exprimiert, andere sind nur in bestimmten Geweben zu finden. Das Spektrum an miRNA-Vorkommen reicht dabei von den Skelettmuskeln über die Leber, die Lunge und Milz bis hin zum Gehirn-Gewebe[19]. Auch in der Entwicklung von Adipozyten (Fettzellen) und B-Zellen konnte inzwischen eine Beteiligung von miRNAs an zellulären Prozessen bewiesen werden[17].

Die regulatorischen Funktionen der miRNAs spielen auch in malignen Zellen eine wichtige Rolle. In vielen Malignomen konnte bereits eine abnormale Überexpression einzelner oder mehrerer miRNAs oder auch deren Verlust beobachtet werden. Die „Fingerabdrücke“ der miRNA wurden dabei schon u. a. in Brust-, Lungen-, Leber-, Magen- und Darmkrebs, sowie in Glioblastomata, B-Zell-Lymphomen, und im Pankreas-Karzinom- und PCa nachgewiesen[16,17].

Die Art, in der sich veränderte miRNA-Expression auf die maligne Progression auswirkt, lässt sich in den meisten Fällen als Kaskadeneffekt verstehen. Wenn eine miRNA verändert exprimiert wird, wirkt sich das im Folgenden auf eine Vielzahl von nachgeordneten Proteinen aus, die ihre Ziel-Moleküle darstellen. Diese können dann entweder durch Abwesenheit ihrer regulierenden miRNA herauf-, oder bei Überexpression dieser miRNA herabreguliert vorliegen. So können verschiedenste z. T. essentielle Ziele in zellulären Signalwegen zur selben Zeit beeinflusst werden. Da nachgeordnete Moleküle in Zellsignal-Kaskaden oft abhängig von den Faktoren sind, die stromaufwärts von ihnen liegen, können miRNAs auch indirekt auf wichtige nachgeschaltete Effektor-Moleküle Einfluss nehmen. Beispiele hierfür sind die Überexpression von BCL-2 und anderen Protoonkogenen in B-Zellen, in denen die miR-15a/16-1

herunterreguliert vorliegt (bei chronisch lymphatischer Leukämie), und die Tatsache, dass miR-17-92 mit einer c-myc Stimulation im Zusammenhang steht (in murinen B-Zell-Lymphomen nachgewiesen). Die klassische Ansicht von initial verändert vorliegenden Onkogenen oder Tumorsuppressoren, von denen die malignen Prozesse ausgehen, greift hier nicht mehr[17,20,21].

Der Mechanismus der RNAi wird inzwischen auch von der molekularbiologischen Forschung gezielt eingesetzt, um Gene funktionell auszuschalten (Gen-Silencing). Dies funktioniert auf die gleiche Art und Weise wie bei der natürlichen endogenen Gensuppression mittels kurzer komplementärer RNA-Stränge, welche als small interference RNA (siRNA) bezeichnet werden. Die RNA-Moleküle werden gentechnisch hergestellt und müssen lediglich von außen mittels Transfektion in die Zelle eingebracht werden[22].

Die Versuche, ein eindeutiges miRNA-Profil für das PCa zu finden, sind bis heute nicht gelungen. Obwohl sich viele Forschungsgruppen darum bemüht haben, mittels Microarray-Technologie ein komplettes Bild aller herab- und heraufregulierten miRNAs im PCa darzustellen, variierten die Ergebnisse von Studie zu Studie jedoch stark. Doch es gab auch viele Übereinstimmungen in den Studien, bei denen einige miRNAs sehr häufig in Erscheinung traten. Die gefundenen regulierten miRNAs standen dabei hauptsächlich mit essentiellen zellulären Funktions-Prozessen in Verbindung. So stellten sich miRNAs als verändert exprimiert heraus, die den Zellzyklus voran bringen und Apoptose-Resistenz vermitteln (miR-34, miR-20a, miR-32 und miR-23, miR-15a-16). Ebenso fielen miRNAs auf, welche Migration und Invasion forcieren (miR-15a, miR-21, miR-221/222) und androgen-unabhängiges Wachstum fördern (miR-221/222, miR-205, miR-146, miR-125b). Für epigenetische Reprogrammierung zeichneten sich vor Allem miR-101 und miR-449 verantwortlich[16]. Diese Fülle an verändert vorliegenden miRNA-Expressionen bestätigt erneut die Relevanz der miRNAs in malignen Prozessen. So wird sich das molekularbiologische Augenmerk in Zukunft auch beim PCa immer weiter auf den Bereich der RNAi, vermittelt durch miRNAs, richten. Therapien, in denen versucht wird spezifische, verändert regulierte miRNAs im Patienten herunter oder herauf zu

regulieren, könnten in einigen Jahren zu den bestehenden Optionen hinzukommen. Des Weiteren könnten miRNAs im PCa nicht nur als Ziel von medikamentöser Intervention interessant werden. Denn auch als Tumormarker kämen sie infrage, da einige miRNAs sehr stark veränderte Spiegel im PCa aufweisen und ähnlich wie das Prostata-spezifisches Antigen (PSA) in malignem Gewebe in die Blutbahn oder den Urin gelangen können[16,23].

Die aktuelle Forschung schreibt der miR-1 in physiologischen sowie in malignen Prozessen vieler Entitäten inzwischen eine große Rolle zu. So wird sie im Herzmuskelgewebe u. a. für das kardiale Remodeling nach Herzinfarkt, und für Hypertrophie induzierende Prozesse, sowie für die Regelung von Apoptose mit verantwortlich gemacht[24-26]. In Hepatozyten verhindert sie eine überschießende Lipogenese[27]. In malignem Gewebe ist sie zumeist herunterreguliert, da sie häufig tumorsuppressorische Eigenschaften aufweist. Die Rolle eines Tumorsuppressors konnte der miR-1 bereits in Geweben der Leber[28], des Uterus[29], der Blase[30], der Niere[31], des Colons[32], der Schilddrüse[33], der Lunge[34] sowie in Plattenepithelien im Kopf-Hals-Bereich[35] und des Sinus Maxillaris[36] zugeschrieben werden. Für die meisten dieser Gewebe konnten bereits präzisere Angaben zum Mechanismus der Tumorsuppression gemacht werden. So wirkt die miR-1 in Zellen der Leber, der Niere, des Colons, des Knochens, der Schilddrüse sowie in Plattenepithelien des Kopf-Halsbereiches anti-proliferativ. Anti-apoptotische Wirkung besitzt die miR-1 nachweislich in Nieren- und Plattenepithelgewebe des Sinus Maxillaris sowie in Knochengewebe. Einen G0/G1 oder G2 Zellzyklus-Arrest kann sie in Muskel-, Nieren- und Leberzellen erwirken. Einen Zusammenhang mit Verhinderung von Metastasierungs- und Invasionsprozessen wurde bereits in Muskel-, Nieren-, Colon- und Lungen-Gewebe nachgewiesen. In der Akuten leukämischen Leukämie wird ihr jedoch ein pro-proliferativer Charakter zugeschrieben[37].

Im PCa gelang es einigen Forschungsgruppen eine Reduktion der miR-1-Expression nachzuweisen[38-40]. Auch tumorsuppressorische Eigenschaften wurden dieser miRNA in diesem Zusammenhang zugesprochen. So wurde z. B. herausgefunden, dass eine Überexpression von miR-1 eine Herabregulation von Genen hervorruft, welche essentiell für Progression, Wachstum und

Profileration der Karzinomzellen sind[38]. miR-1 steht des Weiteren im Zusammenhang mit Prozessen der Metastasierung, wie z. B. der epithelial-mesenchmyalen Transition, welche dazu führt, dass Zellen sich aus ihrem Ursprungsgewebe lösen und befreien können, um sich dann an anderen Positionen wieder zu integrieren und zu wachsen. miR-1 wurde als Inhibitor solcher Prozesse vorgeschlagen[41]. Eine weitere tumorsuppressorische Funktion stellt der reprimierende Einfluss dar, welchen miR-1 auf eine onkogen-wirkende Proteinkinase (Purine Nukleosid Phosphorlyase, PNP) ausübt[39].

1.4 Zielstellung

Untersuchungen bezüglich des Gehaltes von HSP27 und miR-1 in PC-3- und LNCaP-Zellen, die im Vorfeld zu dieser Arbeit durch die Arbeitsgruppe vorgenommen wurden, wiesen auf eine Korrelation dieser beiden Faktoren hin. Des Weiteren wurde eine Funktion von miR-1 in der PCa-Progression vermutet, da die Höhe ihrer Expression in LNCaP- und PC-3-Zellen Unterschiede aufwies. Dabei ähneln LNCaP-Zellen in ihren Eigenschaften (AR-positiv und hormonabhängig) früheren Stadien und PC-3-Zellen (AR-negativ und hormonunabhängig) späteren Stadien der Progression des PCa.

Ziel dieser Arbeit war es zum einen eine HSP27-abhängige Expression von miR-1 zu bestätigen. Zum anderen sollten weitere miR-1-regulierte Faktoren in PC-3-Zellen identifiziert werden. Der Fokus lag hierbei vor allem auf PCa-relevanten HSPs und dem AR. Aus den gesammelten Informationen sollten dann die zellulären Funktionen von miR-1 im PCa abgeleitet werden.

2. Material

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
CFX96™ Real-Time System	Bio-Rad, München
Dokumentationseinheit ChemiDoc XRS+	Bio-Rad, München
Inkubator Nuaire™ US Autoflow	NuAire, Plymouth, USA
Neubauer-Zellzählkammer	Carl Roth, Karlsruhe
pH-Meter	Denver Instrument, Göttingen
Pipettensatz 0,5 – 1000 µl	Biohit, Rosbach v.d.H.
Reinstwasseranlage Milli-Q®	Millipore, Billerica, USA
SDS-PAGE-Zubehör 8x8 cm	Bio-Rad, München
Spektralphotometer Nano-Drop 2000c	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Stromversorgungsgerät PowerPack™	Bio-Rad, München
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell	Bio-Rad, München
Gewebeaufschließer Tissue Lyser II™	Qiagen, Hilden
Gewebeaufschließer Ultra-Turrax™ IKA	Sigma-Aldrich, München
Vakuumpumpe Vacusip	Integra Biosciences, Fernwald
Vakuumzentrifuge Concentrator plus	Eppendorf, Hamburg
Waage	KERN & Sohn GmbH
Wippschüttler UNITWIST-RT	Armin Baack, Schwerin
Zentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge PerfectSpin P	Peqlab, Erlangen
Zentrifuge Jouan MR1822	Jouan, Unterhaching

2.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
15 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
50 ml Falcon®	BD Biosciences, Heidelberg
Acryl-Einmalküvette	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier	Whatman, Dassel
Filterspitzen SafeSeal Tips Professional	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Gewebekulturflasche 75 cm²	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturschale Cell^{+} 78 cm²	Sarstedt, Nümbrecht

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Gewebekulturschale Cell^{+} 9,6 cm²	Sarstedt, Nümbrecht
Glaspasteurpipette	VWR International, Darmstadt
Kapillarspitze MµltiFlex Round Tip	BioScience, Salt Lake City, USA
Klebefolie BZO Seal Film für PCR	Biozym, Wien, Österreich
Nitrilhandschuhe Micro-Touch® Nitra-Tex®	Ansell Healthcare, Brüssel, Belgien
Nitrozellulosemembran PROTRAN®	Whatman, Dassel
PCR-96-Well TW-MT-Platte weiß	Biozym, Wien, Österreich
Petrischale	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitze	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 2 ml, SafeSeal	Sarstedt, Nümbrecht
Schutzhandschuhe Sterling Nitrile KC300	Kimberly-Clark, Roswell, US
Serologische Pipette	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatte CELL^{+} 6 well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
ZipTip® Pipette Tips	Millipore, Billerica, USA

2.3 Chemikalien und Biochemikalien

Substanz	Hersteller
1,4-Dithiothreitol	Carl Roth, Karlsruhe
1-Brom-3-Chlorpropan	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Aktinomycin D	Carl Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Feinchemie K.-H. Kallies KG, Sebnitz
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
CHAPS	Carl Roth, Karlsruhe
Complete™ Mini, EDTA-frei	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie® Brilliant Blue G 250	Fluka, Buchs, Schweiz
D(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
DEPC	Carl Roth, Karlsruhe
Desoxycholsäure-Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
DHT	Sigma-Aldrich, München
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe

Substanz	Hersteller
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol-2-Phosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Guanidinhydrochlorid	AppliChem, Darmstadt
Harnstoff	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
jetPEI™ DNA Transfection Reagent	Peqlab, Erlangen
Kaliumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Ferak, Berlin
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Darmstadt
Luminol Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
miScript miR-1 Inhibtior (20 nM)	Qiagen, Hilden
MOPS	Karl Roth, Karslsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nonidet™ P-40	Sigma-Aldrich, Steinheim
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
peqGOLD TriFast™	Peqlab, Erlangen
PMSF	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution	iNtRON biotechnology, Seongnam, Südkorea
Roti®-Block 10x Konzentrat	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
SDS	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Sensimix SYBR™ Hi-ROX	Bioline, Luckenwalde
siLentFectTM	Bio-Rad, München
SuperSignal® West Dura	Thermo Scientific, Rockford, USA
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Thioharnstoff	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Triton® X-100	Ferak, Berlin
Trypsin, Sequencing Grade	Promega, Madison, USA

Substanz	Hersteller
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.4 Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10 % SDS	10 % w/v SDS-Pellets
10x Laufpufferstocklösung	192 mM Glycin 24,8 mM Tris pH 8,3
1x SDS-Laufpuffer	10 % v/v 10x Laufpufferstocklösung 0,1 % v/v 10 % SDS
10x PBS	1,37 M NaCl 26,8 mM KCl 101,1 mM Na_2HPO_4 x 2 H_2O 17,6 mM KH_2PO_4 pH 7,4
10x TBS	0,2 M Tris 1,5 M NaCl pH 7,6
TBS-T	10 % v/v 10x TBS 0,1 % v/v Tween®20
50x TAE-Puffer	2 M Tris 0,057 % v/v Essigsäure 50 mM EDTA
1x TAE-Puffer	0,02 % v/v 50x TAE
2D-Lysepuffer	8 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 65 mM CHAPS 130 mM DTT 80 mM Tris
5x Proteinladepuffer	156 mM Tris, pH 6,8 25 % v/v Glycerol 5 % v/v SDS 12,5 % v/v β-Mercaptoethanol 0,2 % w/v Bromphenolblau
Antikörperlösung	5 % w/v BSA 10 % v/v 10x TBS 0,001 % v/v Tween®-20
Äquilibrierungspuffer	0,2 M Natriumacetat in 20 % Ethanol

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Blockierlösung	10 % v/v Rotiblock 10x Konzentrat
Bradford-Reagenz	10 % w/v Coomassie® Brilliant Blue G 250 5 % v/v Ethanol 8,5 % v/v H_3PO_4
BSA-Standard in 2D-Lysepuffer	100 % w/v BSA in 2D-Lysepuffer
BSA-Standard in A. bidest	100 % w/v BSA
DEPC-Wasser	0,1 % v/v DEPC Autoklaviert
ECL-Lösung A	25 % w/v Luminol Natriumsalz in 0,1 M Tris, pH 8,6
ECL-Lösung B	110 % w/v para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO
Hank´s Balanced Salt Solution (HBSS)	8 g/l NaCl 0,4 g/l KCl 0,06 g/l KH_2PO_4 0,048 g/l $MgSO_4$ 0,14 g/l $CaCl_2$ 0,35 g/l $NaHCO_3$ 1 g/l Glucose 0,01 g/l Phenolrot
Ponceau-S	0,2 % w/v Ponceau S 3 % v/v Trichloressigsäure
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris, pH 6,8
Tetracyclin-Stocklösung	12 mg Tetracyclin-Hydrochlorid in 1 ml 70 % Methanol
Transferpuffer	20 % v/v Methanol 10 % v/v 10x Laufpufferstocklösung
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, pH 8,8

2.5 Kits

Produkt	Hersteller
mirPremier™ miRNAs Isolations Kit	Sigma Aldrich, Steinheim
NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren
Primer Assay miR-1	Qiagen, Hilden
Primer Assay RU6B	Qiagen, Hilden

2.6 Enzyme

Produkt	Hersteller
miScript II RT Kit	Qiagen, Hilden
miScript SYBRTM Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
M-MLV Reverse Transkriptase (200u/µl)	Promega, Mannheim
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
RiboLock™ RNase Inhibitor (40u/µl)	Fermentas, St. Leon-Rot
Sensimix SYBR™ Hi-ROX	Bioline, Luckenwalde

2.7 Antikörper

Spezifität	Herkunft	Klonalität	Verdünnung	Hersteller
AR	Kaninchen	monoklonal	1:5000	Cell Signaling Technology, Danvers USA
GAPDH	Kaninchen	monoklonal	1:10000	Cell Signaling Technology, Danvers USA
HSP27	Mouse	monoklonal	1:10000	Cell Signaling Technology, Danvers USA
HSP60	Kaninchen	polyklonal	1:5000	Cell Signaling Technology, Danvers USA
HSP70	Kaninchen	monoklonal	1:5000	Cell Signaling Technology, Danvers USA
HSP90α	Kaninchen	monoklonal	1:5000	Cell Signaling Technology, Danvers USA

Spezifität	Herkunft	Klonalität	Verdünnung	Hersteller
HSP90β	Kaninchen	polyklonal	1:5000	Cell Signaling Technology, Danvers USA
Kaninchen	Ziege	polyklonal	1:5000	Cell Signaling Technology, Danvers USA
Maus	Pferd	Polyklonal	1:5000	Cell Signaling Technology, Danvers USA

2.8 Primer

Primer	Primer-Sequenz
AR-1689 FOR	5‘-CAACTCCTTCAGCAACAGCAGC-3‘
AR-1843 REV	5‘-ACTGCCTTACACAACTCCTTGG-3‘
AR-3657 FOR	5‘-CTCACTCTCTGCCTCCAACTTC-3‘
AR-3783 REV	5‘-GCTCTCCTTCTTCTCAGTGGTC-3‘
HSP60 FOR	5´-GARGCTGTGGCCGTTACAA-3´
HSP60 REV	5´-TAGTGCCATCCCCAGCTTC-3´
HSP70 FOR	5´-GCAAGGTGGAGATCATCG-3´
HSP70 REV	5´-CTTCATGCTCGACTGCAC-3´
HSP90α FOR	5´-GTCAGTTGCTTCAGCGTCC-3´
HSP90α REV	5´-AACATCCTCCTCCTCCATC-3´
HSP90β FOR	5´-GAGGAGGAGGTCGAGACTT-3´
HSP90β REV	5´-TGTCCAAGGCATCAGAAGC-3´

2.9 DNA-Plasmide

Plasmid	Hersteller
pSuperiorPURO	OligoEngine, Seattle, USA
pSuperiorPURO-shmiR-1	S. Peters, Greifswald
pSuperior	OligoEngine, Seattle, USA

2.10 Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach
G418 800 µg/ml	Invitrogen, Darmstadt

2.11 Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
PC-3-HSP27	M. B. Stope et al. World J Urol 30, 327-331 (2012)
LNCaP	American Type Culture Collection, Manassas, USA
PC-3	American Type Culture Collection, Manassas, USA

2.12 Zellkultur

Produkt	Hersteller/Zusammensetzung
Trypsin-EDTA (10x) 0,5/0,2 % in PBS	PAN Biotech, Aidenbach
2x Trypsin/EDTA	20 % v/v 10x Trypsin/EDTA in DPBS
DPBS	PAN Biotech, Aidenbach
Fötales Rinderserum (FCS)	Invitrogen, Darmstadt
Panexin NTA Serumersatz	PAN Biotech, Aidenbach
RPMI 1640 mit Phenolrot	PAN Biotech, Aidenbach
Transfektionsmedium ($RPMI^{-/-}$)	RPMI 1640 mit Phenolrot
Vollmedium ($RPMI^{+/+}$)	RPMI 1640 mit Phenolrot 1 % Penicillin/Streptomycin 10 % FCS

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zellpassage

Die Zelllinien LNCaP, PC-3 und PC-3-HSP27 wurden zweimal pro Woche im Verhältnis 1:5 oder 1:6 passagiert. Die Zellen wurden für die reguläre Passage in $RPMI^{+/+}$ Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert und bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert.

Die stabil transfizierte Zelllinie PC-3-HSP27 wurde zusätzlich mit dem Antibiotikum G418 inkubiert (19,2 µg/ml), um sicher zu stellen, dass sich Zellen ohne den eingebrachten Vektor und seine Resistenzkassette nicht vermehren konnten.

3.1.2 Transfektion von Zellen

Es wurden zwei Typen von transienten Transfektionen durchgeführt. Zur Transfektion von DNA-Plasmiden wurde das Transfektionsmittel Lipofectamin™ benutzt, um das Konstrukt pSuperiorPURO-shmiR-1 in LNCaP-Zellen einzubringen. Das Lipofectamin™ wurde so eingesetzt, dass es im Verhältnis 1:1,5 Lipofectamin™ (µl): DNA (µg) in dem Endvolumen von 3 ml pro Well vorlag. Dabei wurden 5 µg DNA (Konstrukt mit shmiR-1 oder Leevektor zur Kontrolle) pro Well eingesetzt, so dass im Verhältnis dazu 7,5 µl Lipofectamin™ verwendet wurden (ebenfalls pro Well). Die transfizierten LNCaP-Zellen wurden dann nach 48 h und nach 72 h für die Folgeversuche geerntet. Die RNA- und Proteinernte wurde dabei nur nach 72 h durchgeführt, um sicher zu gehen, dass das Konstrukt in der Zelle genug Zeit hatte auch transkribiert zu werden und bereits eine Wirkung auf den Zellmetabolismus ausüben konnte. Die 48 h-Ernte dient allein dem Nachweis von miRNA. Dieser wurde aber auch nach 72 h noch einmal wiederholt.

Bei dieser Art DNA in Zellen einzubringen, wird ein Transfektionsmittel verwendet, welches kleine Lipidvesikel enthält, welche die zu transfizierende DNA komplexieren und dadurch lipophil machen. Die lipophilen DNA-Vesikel-Komplexe können dann durch Zell- und Kernmembran, welche ebenfalls sehr lipophil sind, hindurch gelangen. Das Insert shmiR-1 stellt eine Vorstufe der reifen miR-1 dar, welche nach Transfektion in der Zelle eine für die miRNA-Progression typische Haarnadelschleife ausbildet. Der Haarnadelschleifen-Vorläufer wird dann von spezifischen Enzymen erkannt und bis zur fertigen miRNA weiterprozessiert

Für die Transfektion von siRNA-Molekülen wurde siLentFect^{TM} benutzt, ein kationisches Lipid, welches entwickelt wurde um besonders kleine RNA Moleküle in Zellen einbringen zu können. Die biochemisch konstruierten RNA-Moleküle, welche die komplementäre Sequenz zur miR-1 enthielten, wurden somit direkt, ohne Vektorshuttle, in PC-3-Zellen eingebracht. Die Zellen wurden dabei meist im Verhältnis 1:4 auf 6-Well-Platten umgesetzt. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen in der Hälfte der Wells mit dem miR-1-spezifischen Inhibitor transfiziert, die andere Hälfte wurde nur mit dem verwendeten Transfektionsmittel inkubiert und diente als Kontrolle. Das verwendete Transfektionsmittel siLentFect^{TM} wurde dabei nach der Herstellerempfehlung verwendet. Für den 6-Well-Maßstab wurden jeweils 2,5 µl des Reagenzes mit 250 µl RPMI$^{-/-}$ vermischt und dann pro Well in einem Endvolumen von 1,5 ml RPMI$^{-/-}$ inkubiert. Das serum- und antibiotikafreie RPMI$^{-/-}$ wurde verwendet, da die erwähnten Zusätze erfahrungsgemäß einen störenden Einfluss auf die Transfektion hätten. Der transfizierte Inhibitor wurde dabei so eingesetzt, dass er im Endvolumen pro Well in einer Molarität von 40 nM vorlag. Dies entsprach einem Einsatz von 3 µl Inhibitor pro Well in 1,5 ml Endvolumen bei einer Ausgangsmolarität von 5 µM der Stocklösung. Die Zellen wurden dann nach 48 h Inkubationszeit für die Folgeversuche geerntet.

Bei dieser Methode wird ein Großteil der Ziel-miRNA innerhalb der Zelle gebunden und degradiert. Dadurch wird verhindert, dass die so blockierte miRNA ihre Funktion erfüllt und ihrerseits an mRNA Zielsequenzen binden kann.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Präparation von miRNA

miRNA wurde einerseits aus den sich in Kultur befindlichen PC-3- sowie LNCaP-Zellen isoliert, zum anderen aus primärem PCa-Gewebe.

Das Gewebe stammte dabei aus Prostatektomien, welche durch die Klinik und Poliklinik für Urologie der Universität Greifswald durchgeführt wurden. Die Gewebeproben wurden nach Entnahme direkt in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert. Um die malignen Areale erkennen und von den nicht malignen unterscheiden zu können, welche als Kontrolle dienen sollten, wurden die Prostata-Gewebestücke durch die Greifswalder Pathologie, vertreten durch Dr. med. Katja Evert, untersucht. Dr. Evert markierte anschließend die Stellen, welche malignes Gewebe enthielten. Diese Bereiche wurden dann von dem Assistenzarzt Andreas Streitbörger heraus gestanzt und zur Verfügung gestellt.

Für die Versuche mit menschlichem Prostatazellgewebe bestand ein Ethikvotum unter der Registrierungsnummer BB 21/12. Der Titel des Votums lautete: „Identifizierung Androgenrezeptor-abhängiger Faktoren der Resistenz gegenüber Chemotherapie und Apoptose in Gewebeproben und Blutseren von PCa-Patienten“

Zur Gewebepräparation wurden Gewebestücke von 40 bis 60 mg in 1 ml Trizol aufgenommen und verschieden weiterbearbeitet. Die eine Hälfte wurde mittels UltraTurrax™, die andere Hälfte mittels des TissueLyser II™ Systems aufgeschlossen. Dies geschah so, da zu Anfang noch unklar war, welche Methode sich am besten eignet, um das Prostatagewebe aufzuschließen. Mit dem UltraTurrax™ benötigte man auf Stufe 2 ungefähr 20 - 25 Minuten bis zum Erreichen einer homogenen Lösung. Mit dem TissueLyser II™ dauerte es mit 30 Hz Schüttelfrequenz ebenfalls 20 Minuten. Aus den so homogenisierten Proben wurde dann mittels Trizol-Präparation (siehe unten) die gesamte RNA isoliert. Aus der präparierten RNA wurde daraufhin mit Hilfe des miRNA spezifischen miScript II™ RT Kits unter Verwendung des Hi-Spec-Puffers,

welcher Teil des Kits ist, hautsächlich die miRNA-Fraktion in DNA umgeschrieben (siehe unten).

Zur Präparation von miRNA aus Zellen wurde das Kit MirPremier II™ eingesetzt. Das Kit bedient sich der Methode der Isolation und Aufreinigung mittels Bindung der RNA an eine Silica-Membran. Zunächst wurden die transfizierten Zellen kurz mit HBSS-Puffer gewaschen, um danach gleich im miRNA-Lysis-Puffer des Kits aufgenommen und nach 5 min in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt zu werden. Von dort an wurde nach dem Protokoll des Herstellers weiter verfahren. Die RNA wird während des Verfahrens an die Silica-Membran gebunden, aufgereinigt und in DEPC Wasser eluiert. Die miRNA wurde dabei in einem Volumen von nicht mehr als 18 µl aufgenommen. Dadurch betrug die Endkonzentration nach der photometrischen Bestimmung mittels NanoDrop 2000™ in den meisten Fällen ungefähr 200 ng/µl. Anschließend wurde die miRNA mit Hilfe des miScript II™ RT Kits umgeschrieben (siehe unten).

3.2.2 Quantitative RT-PCR von miRNA

Für den quantitativen Nachweis mittels Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (rtPCR) muss die miRNA zunächst von RNA in ein komplementäres cDNA-Template umgeschrieben werden. Hierfür macht man sich die Eigenschaften von viralen RNA-abhängigen DNA-Polymerasen mit Exonuklease-Aktiviät zu Nutze, welche RNA in DNA umschreiben können. Im Vergleich zum Umschreiben der totalen RNA- oder der mRNA-Fraktion einer Probe geschieht dies bei der miRNA anders. Die miRNA muss zunächst einmal mit Hilfe eines entsprechenden Enzyms polyadenyliert werden. Dadurch kann bei der reversen Transkription (RT) ein oligoDT Primer an die miRNA binden. Dieser Schritt ist ebenfalls typisch für die Amplifikation von mRNA, welche schon von Vornherein mit einem Poly-A-Schwanz ausgestattet ist. Der oligoDT-Primer ist im Falle der miRNA-Umschreibung mit einer universalen Marker-Sequenz markiert. Dadurch müssen die späteren miRNA-Primer in der rtPCR nur aus Forward-Sequenzen bestehen, denn der reverse Primer ist durch seine Universalmarkierung spezifisch für alle miRNAs. Die RT-Reaktionen wurden mit Hilfe des miScript II

RT™ Kits durchgeführt. Der Einzelansatz sah dabei folgendermaßen aus. Es wurde ein variables Volumen der isolierten RNA genommen, um auf eine Menge von 2 µg RNA zu kommen, die umgeschrieben werden sollte. Dieses Volumen wurde mit nukleasefreiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt und danach je 2 µl Nukleotid-Mix und 2 µl reverse Transkriptase sowie 2 µl Hi-Spec-Puffer dazu gegeben. Daraufhin wurde der Ansatz im Thermocycler 60 Minuten lang bei 37 °C und zur Inaktivierung der reversen Transkriptase danach noch einmal 5 Minuten bei 95 °C inkubiert.

Nach der RT erfolgte der quantitative Nachweis der miRNA mittels rtPCR. Das gesamte Verfahren der RT mit anschließender rtPCR bezeichnet man auch als quantitative RT-PCR (qRT-PCR).

Die rtPCR ist eine zyklische Reaktionsabfolge, die den Zweck hat, kurze DNA-Sequenzen (bis zu ca. 3000 Nukleotide) zu vervielfältigen. Dabei wird die DNA über eine DNA-abhängige DNA-Polymerase amplifiziert, welche Nukleotide zur Synthese neuer DNA-Stränge nach dem Vorbild des komplementären Matrizenstranges aneinander reiht. Dies kann sie nicht *de novo* tun. Sie benötigt also ein kurzes Stück DNA oder RNA als Startpunkt, welches zuvor an den zu kopierenden Strang anheftet. Diese kurzen Synthese-Start-Stücke werden als Primer bezeichnet. Um eine rtPCR durchzuführen, braucht man daher einen Forward-Primer für den einen und einen Reverse Primer für den komplementären Strang. Man wählt die Primersequenzen so, dass diese den Bereich von Interesse auf der DNA flankieren, so dass nur dieser Bereich amplifiziert wird. Damit die Primer und die Polymerase binden können, muss der DNA-Doppelstrang zunächst physikalisch getrennt (denaturiert) werden, indem die DNA bei 95 °C inkubiert wird. Daraufhin folgt eine Phase, in der die Inkubations-Temperatur auf ca. 50-65 °C herabgesenkt wird, die jeweils von der Schmelztemperatur der Primer abhängig ist. Dadurch können die Primer, je nach ihrer Schmelztemperatur spezifisch binden, damit anschließend die Polymerase bei ihrer optimalen Arbeitstemperatur (ca. 72 °C) die Stränge verlängern kann. Dieser Zyklus wird im Falle der miRNA-Amplifikation 44-mal wiederholt.

Die Detektion der amplifizierten cDNA erfolgte mittels SYBR green. Dieser Floreszenz-Farbstoff interkaliert ausschließlich in doppelsträngige DNA. Das Fluoreszenz-Signal korreliert in seiner Stärke mit der Menge an amplifizierter DNA. Dadurch lässt die Stärke des Signals einen Rückschluss auf den Ausgangsgehalt der eingesetzten Template-cDNA zu. Die Ausgangsmenge an miRNA wurde mittels relativer Quantifizierung bestimmt. Hierbei wird der relative miRNA Gehalt der Probe mit dem einer Kontroll-mRNA verglichen. Bei dieser handelt es sich zumeist um die Transkripte eines Housekeeping-Gens. In diesem Fall war es die snRNA U6, die von allen untersuchten Zellen konstitutiv exprimiert wird.

Die rtPCR wurde mit Hilfe von Reagenzien des miScript II SYBR™ green PCR Kits durchgeführt. Dieses Kit verfügte über eine Hot-Start-Taq-Polymerase, welche bereits mit allen benötigten Zusatzkomponenten in einer Gesamtmixtur vorlag (QuantiTect™ SYBR green PCR Mastermix). Zudem verfügte das Kit über den bereits erwähnten Universalprimer für miRNAs. Zu einem Einzelansatz gehörten dann noch der miR-1 Forward-Primer und die (bereits vorgelegte) Template-cDNA. Somit wurde zu einem Einzelansatz im Detail folgendes pipettiert. 12,5 µl QuantiTect™ SYBR green PCR Mastermix, 2,5 µl Universalprimer und 2,5 µl miR-1 Forward-Primer (miR-1 Primer wurde 1:2 oder 1:5 und der U6 Primer wurde 1:10 oder 1:20 vorverdünnt), 4,5 µl H_2O und 3 µl cDNA (bereits in die einzelnen Wells vorgelegt). Das Endvolumen betrug somit 25 µl pro Ansatz.

Das hierfür benutzte rtPCR Programm sah folgendermaßen aus:

Aktion		Temperatur	Zeit
1	Initiale Denaturierung der DNA	95 °C	15 min
2	Denaturierung	94 °C	15 sec
3	Annealing der Primer	55 °C	15 sec
4	Strangsynthese	70 °C	10 sec
	Wiederholung Schritt 2-4	44x	
5	Denaturierung	95 °C	10 sec
6	Schmelzkurvenanalyse	Von 55 bis 95 °C in 0,5 °C Schritten	

3.2.3 Trizol-Präparation

Diese Art der Präparation und Aufreinigung von organischen Verbindungen bedient sich dem Prinzip der Phasentrennung in eine polare und eine unpolare Phase. In die einzelnen Phasen verteilen sich dementsprechend organische Moleküle gemäß ihrer eigenen stofflichen Beschaffenheit.

Die Moleküle von Interesse, die durch diese Methode hauptsächlich isoliert und aufgereinigt werden, sind DNA, RNA und Proteine. Nach erfolgter Phasentrennung siedeln sich RNA-Moleküle in der oberen (wässrigen) Phase an, während Proteine sich eher in der unteren (Phenol-haltigen) Phase befinden. Die DNA ist als weißer Ring in der Mitte der beiden Phasen zu finden.

Nach Zugabe von 2-Bromo-Chloro-Propan und erfolgter Phasentrennung nach Zentrifugation bei ungefähr 12.000 U/min wurde die RNA-haltige wässrige Phase von dem Rest getrennt und in 2-Propanol überführt. Nach Zentrifugation bei 12.000 U/min befand sich die RNA gefällt und pelletiert am Boden des Reaktionsgefäßes. Von dort an wurde sie noch dreimalig mit 75 % Ethanol gewaschen und unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Das aufgereinigte Pellet wurden schließlich in DEPC-haltigem Wasser resuspendiert. Die RNA wurde anschließend photometrisch mit dem NanoDrop 2000™ bei einer Wellenlänge von 230 nm gemessen und quantifiziert.

Die untere (Protein und DNA-haltige) Phase wurde mit 75 % Ethanol versetzt und ebenfalls bei 12.000 U/min abzentrifugiert. Danach wurde das Gemisch im Überstand in ein neues Reagenzgefäß überführt und mit 2-Propanol versetzt. Nach Zentrifugation bei zuvor benutzter Geschwindigkeit befand sich dann das Proteinpellet gefällt an der Unterseite des Gefäßes. Das Pellet wurde nun zum Aufreinigen zunächst dreifach mit Guanidinium-HCL gewaschen und ab zentrifugiert (7.500 U/min). Danach erfolgte noch ein Waschschritt mit 75 % Ethanol. Das Pellet wurde dann in 2D-Lyse-Puffer aufgenommen und einstündig darin inkubiert, bevor die gelösten Proteine weiter verwendet oder bei -80 °C eingefroren wurden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte ebenfalls photometrisch mit dem NanoDrop 2000™ bei einer Wellenlänge von

580 nm. Um die Proteine auf dieser Wellenlänge photometrisch erfassbar zu machen wurde zuvor ein Bradford Assay durchgeführt.[42]

3.2.4 Quantitative RT-PCR von mRNA

Im Gegensatz zu der bereits erwähnten RT von miRNA müssen den mRNAs keine Poly-A-Schwänze mehr hinzugefügt werden, da sie bereits über solche verfügen und dadurch auch mittels des oligoDT-Primers von der restlichen zellulären RNA während der RT abgrenzbar sind. So werden bei der Verwendung der oligoDT-Primer nur mRNAs in cDNA umgeschrieben. Dadurch lassen sich nach der folgenden rtPCR Rückschlüsse auf die Transkriptionsrate der Gene von Interesse sowie indirekt auch auf deren Expression ziehen. Das Prinzip ist das gleiche wie bei der miRNA-RT, nur dass hier andere Reagenzien und ein anderer Ansatz benutzt wurden. Ein Einzelansatz bestand hierbei aus folgenden Komponenten: Gesamt-RNA (immer 1 µg) zusammen mit H_2O ad. 13,7 µl. Dieser Mix wurde dann 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend der Mastermix aus 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 0,5 µl RiboLock und 0,8 µl M-MLV reverse Transkriptase hinzu pipettiert.

Diese rtPCR auf mRNA-Basis wurde dafür verwendet, Transkriptionsraten von HSP70, HSP90α und HSP90β sowie die des AR nach zuvor erfolgter miR-1-Inhibition bzw. Überexpression zu charakterisieren. Im Gegensatz zum miR-1-Primer muss hier eine Amplifikation mit zwei spezifischen Primern geschehen. Also mit einem Forward- und einem Reverse-Primer. Der Einzelansatz lautete wie folgt: 10 µl HI-ROX Sensimix, je 1 µl Forward- bzw. Reverse-Primer und 35 µl H_2O. Es wurden 3 µl der cDNA aus der RT Reaktion in die Wells vorgelegt. Die cDNA wurde dafür zuvor noch 1:15 verdünnt.

Es wurde folgendes Programm für alle HSPs sowie den AR benutzt:

Aktion		Temperatur	Zeit
1	Initiale Denaturierung der DNA	95 °C	10 min
2	Denaturierung	95 °C	10 sec
3	Annealing der Primer	55,9 °C	15 sec
4	Strangsynthese	72 °C	10 sec
	Wiederholung Schritt 2-4	44x	
5	Denaturierung	95 °C	10 sec
6	Schmelzkurvenanalyse	Von 65 bis 95 °C in 0,5 °C Schritten	

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Durch das Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS), welches sich den Proteinen anlagert und deren native Ladung überlagert, werden alle Proteine mit einer negativen Nettoladung versehen (die Kopfgruppe des SDS ist negativ geladen) und wandern somit während der Elektrophorese in Richtung Anode. Die Proteine durchwandern dabei das Netzwerk aus polymerisierten Polyacrylamid-Fasern je nach ihrem Molekulargewicht mit verschiedener Geschwindigkeit. Durch den gleichzeitigen Auftrag eines Größenstandards konnte das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine abgeleitet werden. Es wurden alle Gele selbst hergestellt und pro Lauf jeweils ein großporigeres Sammelgel und ein kleinporiges Trenngel gegossen. Das Sammelgel dient dem Zweck, die Proteine am Übergang von Sammel- und Trenngel zu konzentrieren. Der Unterschied in den pH-Werten beider Gele, sowie die in den Puffern verwendeten Ionen, spielen dabei eine wichtige Rolle, da dadurch eine Konzentrierung der Proteine am Übergang der beiden Gele erreicht wird, sowie das Laufverhalten der Proteine positiv beeinflusst und die Auflösung im Trenngel verbessert wird.

Abgebildet ist ein Einzelansatz-Pipettierschema von Trenn- und Sammelgel. Das Polyacrylamid (Rotiphorese™) wird im Zuge der Polymerisation quervernetzt und bildet dadurch das charakteristische Faser-Netzwerk. Die

Reaktion wird dabei durch das APS als Radikal-Lieferant gestartet und durch das TEMED katalysiert.

Die Elektrophorese wurde konstant bei 120 V durchgeführt. Dabei wurden die Gelkammern nach Herstellerangaben mit Glycin-haltigem Laufpuffer befüllt. Die Taschen wurden stets mit 30 µg Protein in maximal 20 µl Volumen aufgefüllt.

	10 % Trenngel	**Sammelgel**
A. bidest	2,4 ml	2,1 ml
Trenngelpuffer	1,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	375 µl
Rotiphorese® Gel 30	2 ml	500 µl
10 % SDS	60 µl	30 µl
10 % APS	60 µl	30 µl
TEMED	6 µl	3 µl

3.3.2 Western-Blotting

Der Western-Blot ist ein Verfahren, bei dem zuvor über SDS-PAGE aufgetrennte Proteine über ein elektrisches Feld auf eine spezielle Membran übertragen werden. Diese Membran wird später mit Enzym-gekoppelten spezifischen Antikörpern inkubiert, welche die Proteine von Interesse dann detektierbar machen.

Die Proteine, welche sich zu Anfang noch in den PAGE-Gelen befinden, sind noch durch das SDS negativ geladen. Diese Ladung wird ausgenutzt, um die Proteine aus dem Gel auf eine hydrophobe Nitrozellulose- (oder PVDF-) Membran zu übertragen. Dabei behalten die Proteine bei der Wanderung aus den Gelen auf die Membran (in Richtung Anode) ihr Auftrennungs-Muster aus der SDS-PAGE bei. Nach erfolgter Übertragung werden die Membranen noch mit proteinhaltigem Substrat blockiert, um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu verhindern. Nach einigen Waschschritten erfolgt dann die Antikörper-Zugabe. Der Erst-Antikörper ist dabei spezifisch für das zu detektierende Protein. Der danach hinzugegebene Zweit-Antikörper ist spezifisch für den konstanten (Fc-) Teil des Erst-Antikörpers und bindet diesen

daher. Der Zweit-Antikörper ist außerdem mit einem Enzym gekoppelt, welches eine Chemilumineszenz-Reaktion katalysiert und durch die Umsetzung eines zugegebenen Substrates die markierten Proteine sichtbar macht.

Der Elektro-Blotting-Vorgang wurde mit 60 mA pro Membran/Gel für eine Stunde durchgeführt. Nach einstündiger Blockierung mit Roti™-Block und einigen kurzen Waschschritten mit TBS-T Lösung wurde der Primärantikörper, welcher spezifisch für das Protein von Interesse war (in diesem Fall HSP70, HSP90α, HSP90β und AR), hinzugegeben. Die Erstantikörper-Inkubation wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Anschließend erfolge die Zweitantikörper-Inkubation, welche für eine Stunde bei Raumtemperatur erfolgte. Nach weiteren Waschschritten erfolge die Zugabe von Detektionslösung, welche im Falle von HSP70 und HSP90α die Homemade-Lösung und im Falle von HSP90β und dem AR die kommerzielle Fertiglösung SuperSignal™ war. Die beiden letztgenannten Proteine konnten mit der Homemade-Lösung nur unzureichend stark dargestellt werden. Die Detektion wurde mit dem Western-Blot-Dokumentations-System ChemiDoc™ der Firma Bio-Rad™ durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 miR-1-Nachweis im Zellkulturmodell

Zunächst konnten Daten zur basalen miR-1-Expressionsrate in den Zelllinien LNCaP, PC-3 und PC-3-HSP27 bestätigt werden, die teilweise bereits im Vorfeld von Tina Schubert erhoben wurden (Abb.1). Diese Daten wiesen Unterschiede im miR-1-Expressions-Verhalten der drei Zelllinien auf. Die beiden Zelllinien LNCaP und PC-3 wurden als Zellkulturmodell des PCa ausgewählt, weil sie in ihren Eigenschaften verschiedenen Stadien des PCa ähneln. So sind die LNCaP-Zellen noch hormonabhängig und AR positiv, die PC-3-Zellen jedoch bereits hormonunabhängig und AR negativ. Des Weiteren konnte bereits im Vorfeld durch Tina Schubert nachgewiesen werden, dass HSP27 in LNCaP-Zellen im Vergleich zu PC-3-Zellen erhöht exprimiert wird.

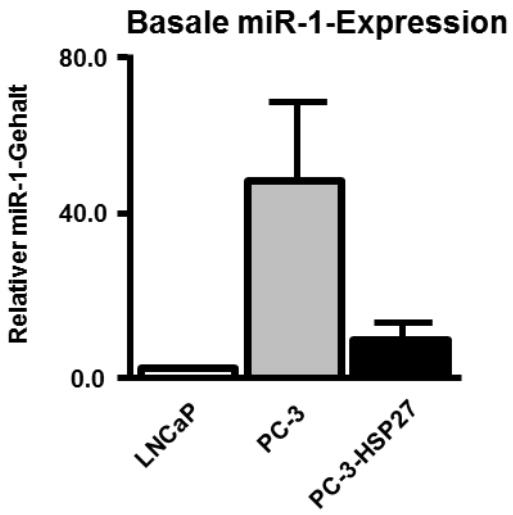

Abb.1 Basale miR-1-Expression in verschiedenen Zelllinien des PCa.
Es wurde miR-1 aus den Zelllinien LNCaP, PC-3 und PC-3-HSP27 isoliert und mittels rtPCR nachgewiesen. Die LNCaP-Zellen wurden in diesem Diagramm als Kontrolle auf eine einfache Expression normalisiert. Die Zellen wurden im 6-Well Maßstab ausgesät und ohne jegliche Zusätze für 48 h in Kultur gehalten. Danach erfolgte die Zellernte und miR-1-Präparation. Dieses Experiment wurde dreifach wiederholt.

So bestätigte sich, dass die PC-3-Zellen im Vergleich zu den LNCaP-Zellen tendenziell eine erhöhte miR-1-Expression aufwiesen (im Mittel 48,9-fach höher als die Expression der LNCaP-Zellen, $p = 0{,}12$). Die PC-3-Zellen, in die das HSP27 im Voraus stabil transfiziert wurde (PC-3-HSP27), zeigten jedoch im Gegenschluss eine starke Tendenz zu erniedrigter miR-1-Expression im Vergleich zu den PC-3-Zellen ohne stabile Transfektion mit HSP27 (im Mittelwert 9,2-fach höher als in LNCaP-Zellen, $p = 0{,}1$).

Es zeigte sich demnach, dass LNCaP-Zellen, welche im Vergleich zu PC-3-Zellen eine hohe HSP27-Expression aufweisen, tendenziell über einen niedrigen miR-1-Gehalt verfügen. Im Gegensatz dazu ließ sich in PC-3-Zellen eine Tendenz zu hohen miR-1- und niedrigen HSP27-Expressionsraten im Vergleich zu LNCaP-Zellen beobachten.

Diese Experimente haben ebenso gezeigt, in welchen Zelllinien eine Inhibition bzw. eine Überexpression der miR-1 sinnvoll ist. So erwiesen sich die PC-3-Zellen mit ihrem erhöhten miR-1-Gehalt als die für eine Inhibition am besten geeigneten Zellen. Für eine Überexpression sind die LNCaP-Zellen mit ihrem geringen miR-1-Gehalt prädestiniert.

4.2 miR-1-Regulation in primärem PCa-Gewebe

Nachdem die miR-1-Expression im Zellkulturmodell untersucht wurde, sollte überprüft werden, wie es sich mit ihrer Expression in menschlichem primärem PCa-Gewebe verhält. Das Material hierfür stammte aus Prostatektomien, welche in der Klinik und Poliklinik für Urologie Greifswald durchgeführt wurden. Verglichen wurde der miR-1-Gehalt von malignen Arealen der Gewebeprobe mit dem von nicht maligen Arealen desselben Gewebestückes.

miR-1 erschien dabei in den malignen Bereichen auf das 0,2-Fache der Expression herabreguliert, die in den benachbarten Kontroll-Bereichen nachweisbar war (Abb.8). Dieser Trend wurde durch die Untersuchung zweier menschlicher Prostatae gezeigt.

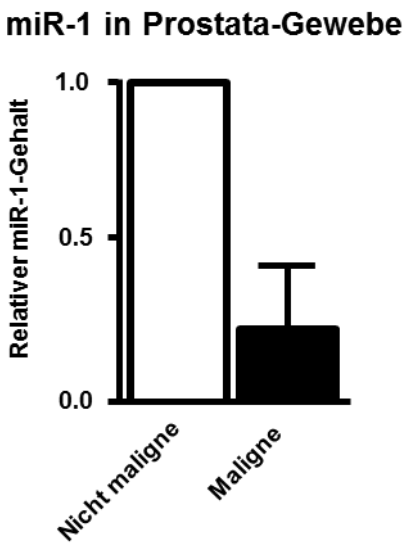

Abb.8 miR-1-Gehalt in malignem menschlichen Prostata-Gewebe im Vergleich zu benachbartem unveränderten Gewebe.
Die Gewebeproben wurden menschlichen Prostatae entnommen, welche direkt nach der operativen Entnahme in flüssigem Stickstoff gelagert wurden. Danach wurden diese durch eine Vertreterin der Pathologie Greifswald begutachtet, die dann die malignen Bereiche markierte. Die malignen Bereiche wurden daraufhin heraus gestanzt (sowie auch benachbartes Kontroll-Gewebe) und nach Lyse des Gewebes die totale RNA isoliert. Daraus wurde dann mittels rtPCR der miR-1-Gehalt der jeweiligen Proben ermittelt. Dieser Vorgang wurde mit den Prostatae zweier Patienten durchgeführt. Die miR-1-Expression im Kontrollgewebe wurde auf eins normalisiert.

4.3 Inhibition und Überexpression von miR-1 in PC-3- und LNCaP-Zellen

Um die Auswirkungen von miR-1-Regulation in PCa-Zellen auf verschiedene Faktoren hin untersuchen zu können, musste zunächst ein System etabliert werden, in dem miR-1 nach Bedarf in den geeigneten Zellen artifiziell hoch- oder herunterreguliert werden konnte.

4.3.1 miR-1-Überexpression in LNCaP-Zellen

Wie bereits angedeutet eigneten sich die LNCaP-Zellen aufgrund ihres geringen miR-1-Gehaltes am besten für eine Überexpression dieses Moleküls. Mögliche Auswirkungen veränderter miR-1-Konzentration auf verschiedene

Zielproteine und andere Faktoren würden sich unter diesen Umständen deutlicher zu erkennen geben.

Die Effizienz der Überexpression erschien sehr hoch. So konnte nach 48 h eine Überexpression der miR-1 in LNCaP-Zellen festgestellt werden, die in der Tendenz etwa um das 5200-fache höher war als in den kontroll-transfizierten LNCaP-Zellen (p = 0,2) (Abb.2).

Nach 72 h konnte im Vergleich zum 48 h-Wert eine Absenkung auf ungefähr das 540-fache der Kontrolle beobachtet werden (p = 0,18).

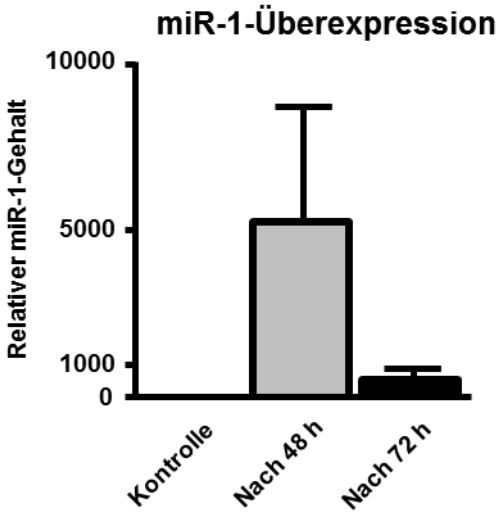

Abb.2 Überexpression der miR-1 in LNCaP-Zellen.
Die Zellen wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und nach 24 Stunden mit einem miR-1-Überexpressions-Vektor transfiziert. Nach 48 h und nach 72 h erfolgten die Zellernte mit anschließender miRNA-Präparation sowie der Nachweis der miRNA mittels rtPCR. Dieser Versuch wurde dreifach wiederholt. Die Kontrolle wurde auf eins normalisiert.

4.3.2 miR-1-Inhibition in PC-3-Zellen

Die hohe miR-1-Expressionsrate in PC-3-Zellen konnte mittels des Inhibitors signifikant auf das durchschnittlich 0,37-Fache des Normalpegels herabgesenkt werden ($p < 0{,}0001$) (Abb.3). Die Ergebnisse der einzelnen Versuche waren recht unterschiedlich. Zum einen gelangen relativ potente Knock-downs der miR-1 auf bis zu 5 % des Ausgangswertes, zum anderen zeigte sich bei einigen Versuchen nur eine Reduktion des miR-1-Gehaltes auf 77 % des Basal-Wertes in PC-3-Zellen.

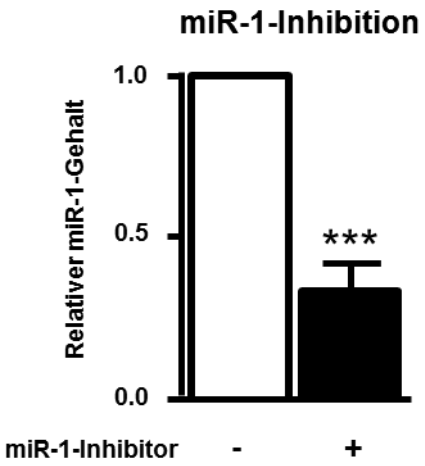

Abb.3 Inhibition der miR-1 in PC-3-Zellen.
Die PC-3-Zellen wurden zunächst auf 6-Well-Maßstab umgesetzt und nach 24 h transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Ernte mit anschließender miRNA-Präparation und Quantifizierung des miR-1-Gehaltes der Proben mittels rtPCR. Für die Inhibition wurden 40 µM des Inhibitors eingesetzt. Das Experiment wurde siebenmal wiederholt. Die Kontrolle wurde auf eins normalisiert.

4.4 Die Auswirkung von miR-1-Regulation auf PCa-relevante HSPs

HSP70 und HSP90 vermitteln einige maligne Eigenschaften innerhalb des PCa. So stabilisieren sie z. B. die zytoplasmatische Form des, für die Proliferation des Karzinoms wichtigen, AR und ermöglichen die Bindung an sein Hormon. HSP70 hat darüber hinaus ebenfalls relevante pro-proliferative Eigenschaften und das HSP90 verfügt des Weiteren über stabilisierende Funktion für mutierte Onkogene. Das HSP90 besitzt dabei verschiedene Isoformen. Daher wurden im Rahmen dieser Versuche die Isoformen HSP90α und HSP90β auf ihr Expressionsverhalten nach Modulation des miR-1-Gehaltes in verschiedenen Zelllinien untersucht.

Im Anschluss an den erbrachten Nachweis für eine erfolgreiche Überexpression bzw. Inhibition von miR-1 wurden RNA- und Proteinproben der behandelten Zellen aufbereitet, mit dem Ziel herauszufinden, ob die artifizielle Hoch- bzw. Herunterregulierung der miR-1-Auswirkungen auf die Expression von HSP70, HSP90α oder HSP90β hatte.

Es wurden Western-Blot-Analysen und rtPCR-Reaktionen durchgeführt, um Veränderung der HSP-Regulation auf mRNA- und Proteinebene erfassen zu können.

4.4.1 Expression der HSPs nach miR-1-Inhibition und -Überexpression

Wie bereits zuvor erwähnt fand die Überexpression der miR-1 stets in LNCaP-Zellen statt, da hier der miR-1-Gehalt im Vergleich zu PC-3-Zellen niedrig ist. Die Inhibition von miR-1 wurde immer in PC-3-Zellen durchgeführt, in denen ihr Gehalt hoch ist.

Bei HSP70 kam es nach Überexpression von miR-1 zu einem inversen Effekt zwischen mRNA- und Proteinebene. Der RNA-Gehalt erschient erniedrigt (0.65-fach, $p < 0{,}0001$) und die Protein-Expression erzielte einen Wert von 1,16

(p = 0,13), was tendenziell als leichte Anhebung im Vergleich zur Kontrolle beschrieben werden kann (Abb.4).

Nach miR-1-Inhibition erschien HSP70 auf mRNA-Ebene leicht erhöht mit einem Durchschnittswert von 1,17 (p = 0,36), und auf Proteinebene gegensätzlich dazu im Mittel auf das 0,68-Fache (p = 0,067) des Ausgangswertes erniedrigt (Abb. 4).

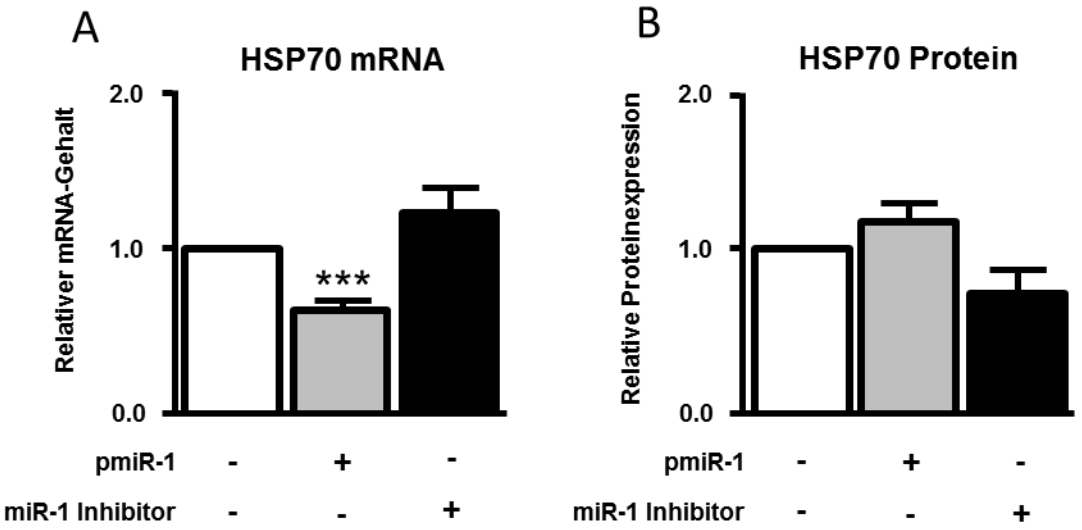

Abb.4 Auswirkungen von miR-1-Überexpression in LNCaP-Zellen und Inhibition in PC-3-Zellen auf HSP70.
Verglichen wurden mRNA- (A) und Proteinebene (B) jeweils nach Überexpression und Inhibition von miR-1. pmiR-1 steht dabei für den Überexpression-Vektor mit shmir-1-Insert. Die Säule jeweils links in der Grafik stellt die Kontrolle dar. Die Säulen in der Mitte zeigen Daten der Überexpression und die jeweils rechts gelegene Säule steht für die Daten nach Inhibition von miR-1. Die Proteindaten wurden mittels Western-Blot-Analyse und die mRNA-Daten über rtPCR ermittelt. Die Daten aus den Inhibitions-Versuchen stellen eine Kombination aus fünf unabhängig durchgeführten Versuchen dar. Die Ergebnisse aus den Überexpressions-Versuchen stammen aus drei unabhängigen Versuchen. Die Kontrolle wurde hierbei für alle Versuche auf eins normalisiert.

Nach Überexpression von miR-1 erwies sich HSP90α auf mRNA-Ebene signifikant erhöht (mRNA: 1,58-fach, $p = 0,05$) und auf Proteinebene signifikant herunterreguliert (0,88-fach, $p = 0,0002$) (Abb.5, A).

Nach miR-1-Inhibition zeigte das HSP90α eine ebenfalls signifikante Erhöhung auf mRNA-Ebene mit Mittelwerten von 2,04 ($p = 0,011$). Allerdings konnte hier auch eine signifikante Erhöhung des Proteingehalts mit einem Wert von 1,71 ($p = 0,016$) auf Proteinebene verzeichnet werden (Abb. 5, C).

Nach miR-1-Überexpression erwies sich HSP90β signifikant um das 5,6-Fache ($p < 0001$), im Vergleich zur Kontrolle, auf mRNA Ebene erhöht. Eine ebenfalls signifikante Erhöhung zeigte HSP90β auf Proteinebene (1,43-fach, $p = 0,0005$) (Abb.5, B).

Nach Inhibition erschien das HSP90β, gegensätzlich zu den Ergebnissen der miR-1-Überexpression, auf mRNA- und Proteinebene erniedrigt (mRNA: 0,85-fach, $p = 0,54$, Protein: 0,61-fach, $p = 0,073$ im Vergleich zur Kontrolle) (Abb.5, D).

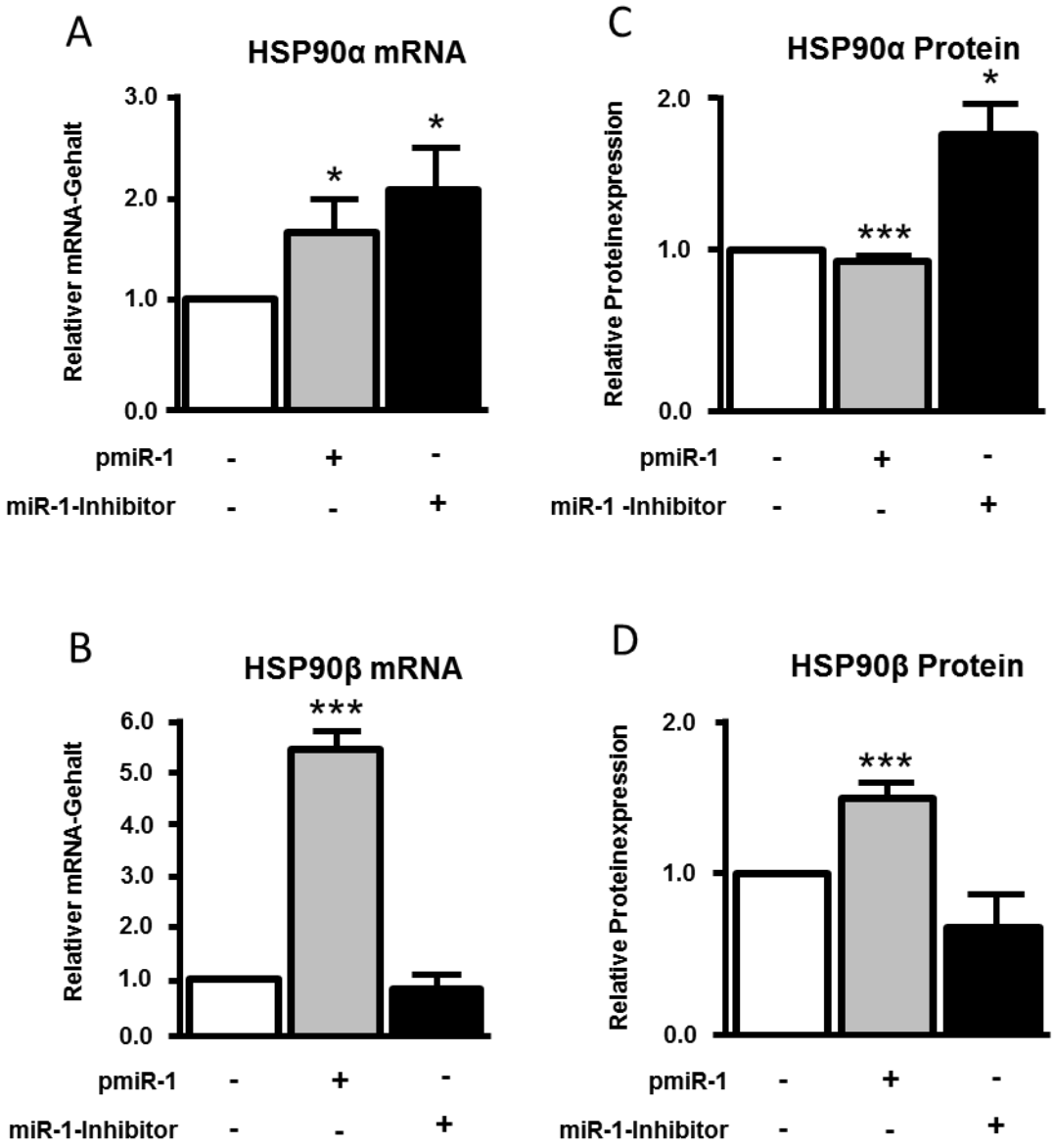

Abb.5 Auswirkungen von miR-1-Überexpression und -Inhibition auf HSP90α und HSP90β.
Es sind mRNA-Gehalt von HSP90α und HSP90β (A bzw. B) und Proteingehalt dieser HSPs (C bzw. D) nach miR-1-Überexpression (in LNCaP-Zellen) sowie Inhibition (in PC-3-Zellen) dargestellt. pmiR-1 steht dabei für den Überexpressions-Vektor mit shmir-1-Insert. Die Säule jeweils links in der Grafik stellt die Kontrolle dar. Die Säulen in der Mitte zeigen Daten der Überexpression und die jeweils rechts gelegene Säule steht für die Daten nach Inhibition von miR-1. Die Proteindaten wurden mittels Western-Blot-Analyse und die mRNA-Daten mit Hilfe von rtPCR ermittelt. Die Experimente wurden fünffach bei vorheriger Inhibition und dreifach nach Überexpression der miR-1 wiederholt. Die Kontrolle wurde auf eins normalisiert.

4.5 Die Auswirkungen der miR-1-Regulation auf den AR

Nachfolgend wurden die Auswirkungen von miR-1-Überexpression und -inhibition auf den AR in LNCaP- (Überexpression) und PC-3-Zellen (Inhibition) untersucht. Dabei waren vor allem bei der Überexpression in LNCaP-Zellen deutliche Ergebnisse zu erwarten, da die LNCaP-Zellen den AR noch konstitutiv exprimieren. In AR-negativen PC-3-Zellen gab es auf Proteinebene wie erwartet nach miR-1-Inhibition keine messbaren Ergebnisse.

Mittels dieser Versuche sollte geklärt werden, ob die miR-1 einen für die PCa-Genese wichtigen Proliferations-Faktor reguliert und in welche Richtung diese Regulation geht. Diese Ergebnisse sollten somit aufzeigen welche Funktion der miR-1 im PCa zugewiesen werden könnte.

Nach Überexpression von miR-1 zeigte sich eine tendenzielle Reduktion des AR-mRNA-Gehalts auf das 0,46-Fache ($p = 0{,}093$) des Ausgangswertes (Abb.6, A).

Die Proteinexpression des AR erwies sich als signifikant erniedrigt (durchschnittlich auf das 0,56-Fache der Kontrolle, $p = 0{,}01$) (Abb. 6, B).

Nach Inhibition konnte auf mRNA-Ebene ein inverser Effekt zu dem der Überexpression nachgewiesen werden. Hier stieg der mRNA-Gehalt tendenziell auf das 1,56-Fache an und bestätigte somit noch einmal die Ergebnisse aus der Überexpression (Abb. 6, A).

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Überexpression von miR-1 eine Herunterregulation des AR auf mRNA- und Proteinebene zu bewirken scheint. Nach Inhibition der miR-1 geschieht dann folgerichtig auf mRNA-Ebene das Gegenteil und es kommt zu einer leichten Hochregulation der AR-mRNA.

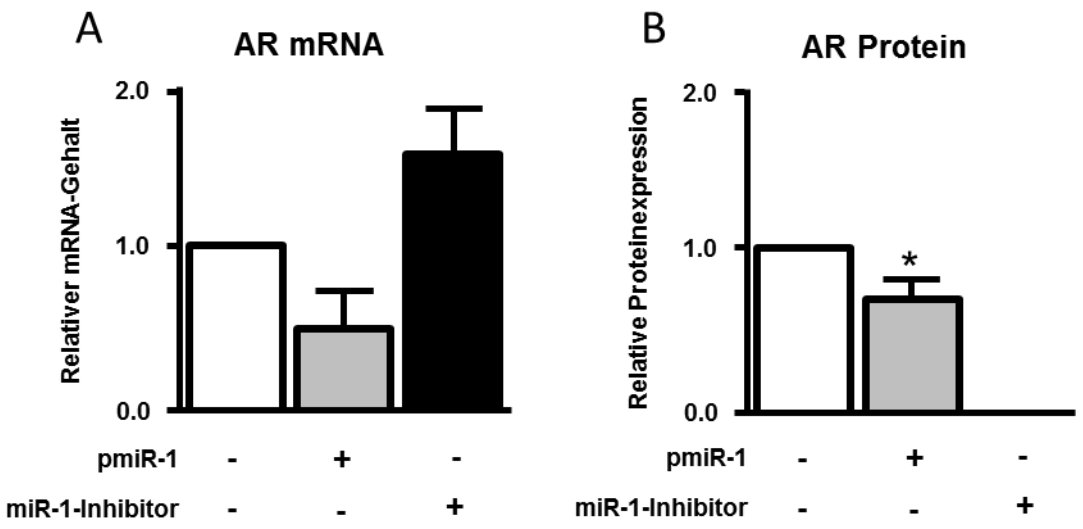

Abb.6 Auswirkungen von miR-1-Überexpression und -Inhibition auf den relativen mRNA-Gehalt und Proteinexpression des AR.
Dargestellt sind die Ergebnisse von rtPCR für die mRNA-Ebene (A) und Western-Blot-Analyse für die Proteinebene (B). pmiR-1 steht dabei für den Überexpressions-Vektor mit shmir-1-Insert. Die Säule jeweils links in der Grafik stellt die Kontrolle dar. Die Säulen in der Mitte zeigen Daten der Überexpression und die jeweils rechts gelegene Säule steht für die Daten nach Inhibition von miR-1. Die Daten für die Inhibition resultieren aus zwei unabhängigen Versuchen. Veränderungen auf Proteinebene konnten nach Inhibition der miR-1 in PC-3-Zellen nicht ermittelt werden, da diese den AR nicht mehr exprimieren. Für die Überexpression wurden Daten aus drei unabhängigen Versuchen verwendet. Die Kontrolle wurde auf eins normalisiert.

4.6 Identifizierung von Zielen der miR-1-Regulation in PC-3-Zellen via DNA-Microarray-Analyse

Um nach weiteren möglichen Zielen von miR-1-Regulations-Mechanismen in PCa-Zellen zu suchen, wurde eine DNA-Microarray-Analyse nach miR-1-Inhibition in PC-3-Zellen durchgeführt. Dafür wurden PC-3-Zellen nach dem bereits erwähnten Prinzip mit dem miR-1-Inhibitor transfiziert und nach 48 h geerntet. Danach wurde die RNA der geernteten Zellen für die Microarray-Analyse präpariert und mittels rtPCR überprüft, ob der durchgeführte miR-1-Knock-down durch den Inhibitor nachweisbar funktioniert hat. Es wurden insgesamt drei RNA-Proben aus drei unabhängigen Inhibitor-Transfektionen zur DNA-Array-Untersuchung abgegeben. In jedem der drei Ansätze konnte ein Knock-down der miR-1 nachgewiesen werden, allerdings in verschiedener Potenz. Es wurden ebenso drei Ansätze von kontroll-transfizierten PC-3-Zellen zur Analyse gegeben, um mögliche Expressions-Veränderungen der Zellen mit miR-1-Inhibition gegenüber dem normalen Status in PC-3-Zellen vergleichen zu können.

Die Daten sprachen für eine signifikante Veränderung des Expressions-Profils von 22 Genen gegenüber der Kontrolle. 21 davon erwiesen sich als hochreguliert (zwischen 4.05-fach und 17,7-fach), eines als herunterreguliert (1,85-fach) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Ergebnis der Microarray-Analyse nach miR-1-Inhibition in PC-3-Zellen. Dargestellt sind die im Vergleich zur Kontrolle verändert regulierten Gene auf RNA-Ebene
[A]) Gibt an wie stark sich der RNA-Gehalt der jeweiligen reguliert erscheinenden Gene (Primary Sequence Name) von dem der Kontrollansätze unterscheidet.
[B]) Die Ergebnisse wurden mittels t-Test in ihrer Signifikanz bestätigt.

Tabelle 1

Sequence Code	Sequence ID	Primary Sequence Name	Sequence Description	Intensity [1_Mir Control] (Intensity Profile)	Intensity [3_Mir Control] (Intensity Profile)	Intensity [5_Mir Control] (Intensity Profile)	Intensity [2_Mir Inhibitor] (Intensity Profile)	Intensity [4_Mir Inhibitor] (Intensity Profile)	Intensity [6_Mir Inhibitor] (Intensity Profile)	ANOVA_P-value	P-value (Ratio Experiment) A	Ratio Fold Change (Ratio Experiment) B
7949124	961623	PYGM	phosphorylase, glycogen, muscle	24	32	35	***26***	568	1024	1.23E-06	0.02181	**17.74**
8052004	978087			24	23	23	***22***	413	647	1.74E-08	0.01779	**15.30**
8034974	957578	EPHX3	epoxide hydrolase 3	19	20	21	***21***	237	360	3.39E-07	0.01867	**10.29**
7903980	976745	C1orf162	chromosome 1 open reading frame 162	27	32	32	***30***	414	323	0.00003	0.01496	**8.44**
8081298	966468	GPR128	G protein-coupled receptor 128	11	11	11	***10***	122	148	1.94E-06	0.02098	**8.36**
7934979	963788	ANKRD1	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	26	28	45	***32***	410	241	0.02184	0.02628	**6.82**
8012949	958550	CDRT1	CMT1A duplicated region transcript 1	11	22	15	***30***	121	160	0.01112	0.00899	**6.44**
7966127	969482	SELPLG	selectin P ligand	83	85	78	***64***	649	871	0.01477	0.01802	**6.43**
8109981	981735	FGF18	fibroblast growth factor 18	50	47	63	***58***	546	316	0.01944	0.02347	**5.74**
7909789	981700	TGFB2	transforming growth factor, beta 2	79	76	69	***78***	762	434	0.01944	0.02391	**5.70**
8168345	978679	ACRC	acidic repeat containing	21	24	24	***29***	246	117	0.00116	0.0364	**5.68**
7918794	976825	AMPD1	adenosine monophosphate deaminase 1 (isoform M)	14	13	13	***10***	140	67	0.00157	0.06025	**5.43**
7920487	974771	C1orf189	chromosome 1 open reading frame 189	19	16	17	***16***	127	139	0.00367	0.0216	**5.43**
7959484	959118	CCDC62	coiled-coil domain containing 62	20	26	21	***25***	169	166	0.00745	0.01563	**5.37**
8146024	983854	ADAM32	ADAM metallopeptidase domain 32	32	44	34	***28***	292	254	0.02178	0.02124	**5.25**
7947947	979851	AGBL2	ATP/GTP binding protein-like 2	16	21	18	***22***	148	118	0.00802	0.01815	**5.19**
8114080	962761	GDF9	growth differentiation factor 9	21	27	20	***27***	204	101	0.02184	0.03784	**4.93**
7927827	963968	MYPN	myopalladin	26	32	34	***28***	221	177	0.01944	0.02222	**4.66**
7946454	984081	SCUBE2	signal peptide, CUB domain, EGF-like 2	22	20	24	***26***	172	93	0.01944	0.03754	**4.33**
7972713	955994	EFNB2	ephrin-B2	44	48	49	***43***	300	246	0.02178	0.02058	**4.18**
8138009	956540	RSPH10B	radial spoke head 10 homolog B (Chlamydomonas)	15	18	16	***12***	95	91	0.04904	0.0371	**4.05**
8150906	985074	IMPAD1	inositol monophosphatase domain containing 1	443	481	514	***309***	214	255	0.04274	6.15E-06	**-1.85**

Es wurde anschließend versucht die Daten in einen funktionellen Gesamtkontext zu bringen und nach Zellsignalwegen zu suchen, in denen möglichst viele, der Gene eine Rolle spielen, die durch die Daten als miR-1-reguliert vorgeschlagen wurden. Dies wurde mit Hilfe einer Ingenuity Pathway Analysis (IPA) durchgeführt. Der durch die miR-1-Inhibition identifizierte Signalweg mit der höchsten Relevanz beinhaltet u. a. als zentral regulierte Elemente die Gene TGFB1 und TGFB2 (Abb.7, rechts). TGFB2 erwies sich dabei bereits im Microarray als ein direkt durch die miR-1-reguliertes Ziel.

TGFB2 zeigte sich demnach hochreguliert in Abwesenheit der miR-1. Und über den gefundenen Signalweg kann auch von einer hypothetischen Heraufregulation von TGFB1 als nachgeschalteten Effekt gesprochen worden. Denn TGFB1 wird in dem Signalweg direkt durch zwei Proteine aktiviert, welche sich wie TGFB2 ebenfalls als Ziel negativer Regulation durch miR-1 erwiesen haben (SELPG und ANKRD1). Des Weiteren wurde ERK1/2 als relevante aber indirekte Komponente des miR-1-beeinflussten Signalweges identifiziert (Abb.7).

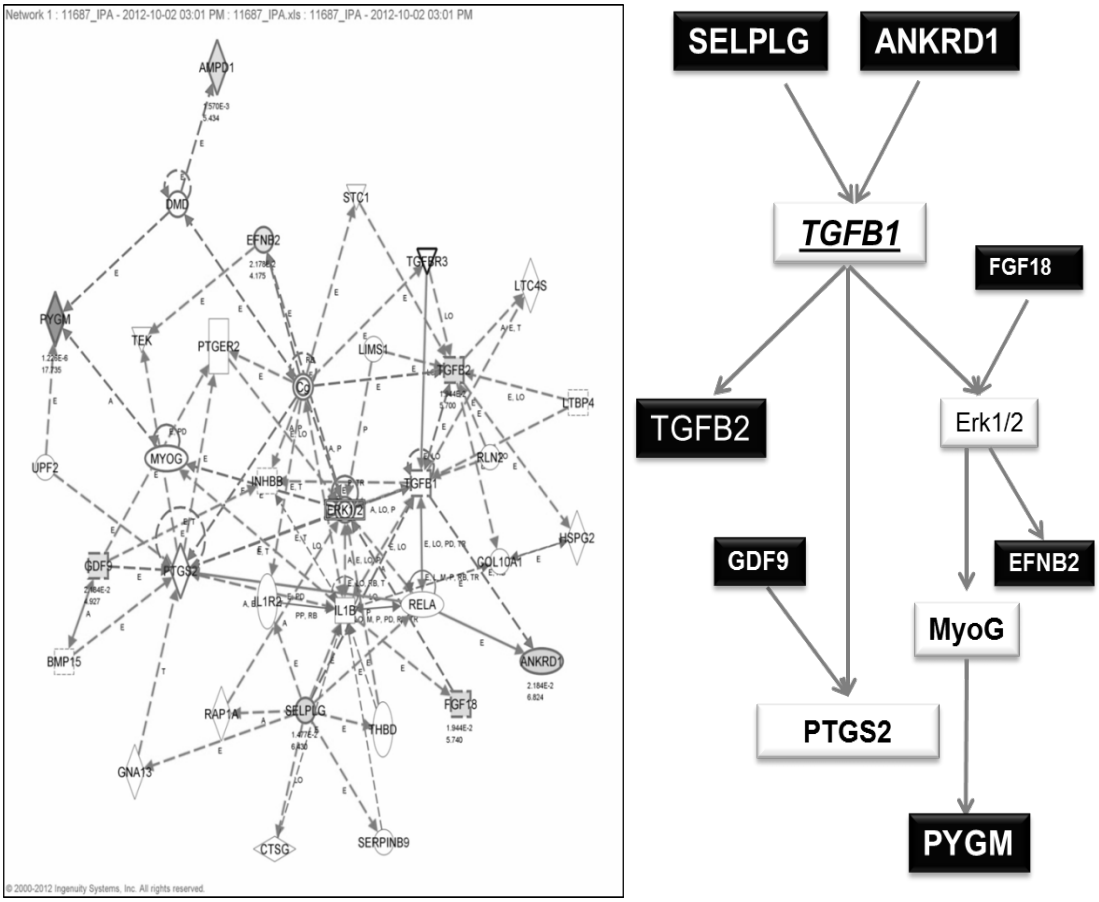

Abb.7 Nach miR-1-Inhibition veränderte zelluläre Signalwege mit hoher Relevanz.
Die im Microarray als miR-1-abhängig reguliert erscheinenden Gene wurden mittels IPA unter Berücksichtigung bekannter zellulärer Signalwege in einen Kontext gebracht, der durch einen Signalweg repräsentiert wird, in dem TGFB1 und TGFB2 eine zentrale Rolle spielen. Die schwarz markierten Gene stellen dabei Faktoren dar, die sich im Microarray als direkt durch miR-1 reguliert darstellten.

5. Diskussion

HSPs besitzen in Zellen des Prostata-Gewebes mehrere wichtige Funktionen. Neben ihrer Funktion als Faltungshelfer bei der Proteinsynthese sind sie in der Lage Zellsignalwege zu beeinflussen, welche mit Zellüberleben, Zellwachstum und Proliferation in Verbindung stehen. Dadurch können sie Zellen eine Resistenz gegenüber ungünstigen Umweltbedingungen und Zellstress vermitteln[4,12,15]. Des Weiteren stabilisieren sie den zytoplasmatisch vorliegenden AR und ermöglichen ihm die spezifische Substratbindung, wodurch eine Aktivierung dieses wichtigen pro-proliferativen Transkriptionsfaktors erst ermöglicht wird[3,5,43].

Viele Eigenschaften der HSPs spielen auch während der malignen Progression des PCa eine essentielle Rolle. Ihre zytoprotektiven Funktionen schützen die Zellen auch während maligner Prozesse, da diese ebenfalls Zellstress bedeuten[11,12]. Die HSPs modulieren des Weiteren Signalwege, welche mit Proliferation und autonomen Zellwachstum in Verbindung stehen. Dadurch tragen dazu bei, dass sich maligne Zellen unbegrenzt und unabhängig von Signalen aus dem Umfeld vermehren können[12,15]. Dazu kommt, dass HSPs mutierte Onkogene stabilisieren und aktiv in apoptotische Prozesse eingreifen können[4,43]. Die HSPs stabilisieren durch die Gesamtheit ihrer Funktionen maligne Prozesse, was auch erklärt warum viele von ihnen im PCa hochreguliert vorliegen[11,44].

Im PCa werden die genannten HSP-Eigenschaften zu einem Großteil durch HSP27, HSP70 und HSP90 vermittelt[4,5,45]. HSP27 hat neben seiner AR-modulierenden Funktion vor allem anti-apoptotischen Charakter[4]. HSP70 wirkt pro-proliferativ[15], anti-apoptotisch[4] und fördert die Resistenz der Zellen gegenüber Chemotherapie[44]. Und HSP90 wirkt hauptsächlich stabilisierend auf mutierte Onkogene[43]. Zusammen modulieren und stabilisieren diese HSPs den AR und vermitteln seine Aktivität[3,5,11].

In Anbetracht ihrer vielen Funktion während der Karzinom-Entstehung und Progression erschien eine nähere Betrachtung dieser HSPs sinnvoll.

Arbeiten unserer Gruppe konnten bereits bestätigen, dass HSP27 in der Lage ist den AR zu regulieren. Es wurde gezeigt, dass die AR-Konzentrationen in LNCaP-Zellen abhängig von ihrem intrazellulären Gehalt an HSP27 deutlich variieren[45].

Des Weiteren wurde ebenfalls im Vorfeld durch Tina Schubert eine Regulation von miR-1 durch HSP27 festgestellt. Denn es zeigte sich, dass miR-1 in LNCaP-Zellen, in denen HSP27 exprimiert wird, einen geringen Gehalt aufwies im Vergleich zu PC-3-Zellen, in denen miR-1 hochgradig exprimiert und HSP27 herabreguliert wird. Ein Wiedereinbringen von HSP27 in PC-3-Zellen, mittels Transfektion, führte dann wieder zu einer Reduktion der miR-1-Konzentration. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden.

Neben der weiteren Untersuchung der miR-1-HSP27-Signalachse galt es in dieser Arbeit mögliche Ziele der miR-1-Regulation zu überprüfen bzw. zu identifizieren. So boten sich als zu untersuchende Ziele zum einen der AR an, aufgrund seiner wichtigen pro-proliferativen Funktion im PCa[11] und engen Verbindung zu HSP27[45]. Zum anderen sollten weitere PCa-relevante HSPs auf eine mögliche Verbindung zur miR-1 hin untersucht werden. Eine Microarray-Analyse lieferte schließlich die Möglichkeit eine große Anzahl an regulierten Zielen auf einmal zu identifizieren.

Die Modulation der miR-1-Konzentration in Prostatakarzinom-Zelllinien (LNCaP, PC-3) zeigte z. T. deutliche Auswirkungen auf die HSP-Expression. So erwies sich HSP70 auf mRNA-Ebene nach miR-1-Überexpression als signifikant herab- und nach miR-1-Inhibition heraufreguliert. Die Regulation schien sich aber kaum auf die Proteinebene auszuwirken. Hier erwies sich die HSP70-Regulation als gegensätzlich zur mRNA-Ebene. Dies könnte auf eine Gegenregulation der Zellen auf Proteinebene hinweisen. Möglicherweise handelt es sich hierbei aber auch nur um ein Artefakt im Zellkultursystem. In der Literatur wurde für Kardiomyozyten bereits eine ähnliche Regulation des HSP70 beschrieben. Der Unterschied war hier, dass miR-1 ausschließlich auf Proteinebene einen regulativen Effekt auf HSP70 ausübte, nicht aber auf mRNA-Ebene[46]. Grund hierfür könnten unterschiedliche posttranslationale Regulations-Mechanismen in PCa-Zellen und Kardiomyozyten sein.

Die Herabregulation von HSP70 auf mRNA-Ebene nach miR-1-Überexpression lässt sich durch eine tumorsuppressorische Funktion der miR-1, welche bereits in der Literatur beschrieben wurde, erklären[38]. HSP70 spielt wie zuvor erwähnt in der Progression von Karzinomen eine wichtige Rolle als pro-proliferativer Faktor[15]. Eine Herabregulation eines solchen Faktors durch eine tumorsuppressorisch agierende miR-1 erscheint plausibel.

Zur Untersuchung einer möglichen miR-1-Regulation von HSP90 wurden für diese Arbeit die beiden Isoformen HSP90α und HSP90β betrachtet. Bisher gab es viele Untersuchungen zu HSP90 im PCa, wobei jedoch nahezu niemals zwischen den beiden Isoformen differenziert wurde.

HSP90α zeigte sich auf mRNA-Ebene sowohl nach Überexpression als auch nach Inhibition von miR-1 signifikant heraufreguliert. Auf Proteinebene war dieser Effekt dann nur noch nach Inhibition zu beobachten, wobei der Proteingehalt nach Überexpression annähernd gleich blieb.

HSP90β erwies sich nach Überexpression von miR-1 auf mRNA- und Proteinebene als signifikant heraufreguliert. Nach Inhibition zeigte sich konsekutiv eine Herabregulation dieser HSP90-Isoform auf mRNA- und Proteinebene.

Die Ergebnisse für HSP90α und HSP90β zeigen nach Überexpression von miR-1 bei beiden Isoformen eine Induktion. Diese scheint sich etwas stärker auf das HSP90β auszuwirken, da hier eine Heraufregulation auf mRNA- und Proteinebene nach miR-1 Überexpression zu verzeichnen ist, die sich konsekutiv nach Inhibition durch eine Herabregulation bestätigt. Warum sich bei HSP90α nach Überexpression sowie nach Inhibition von miR-1 eine Induktion beobachten lässt, bleibt offen. Jedoch lässt die Induktion dieser HSP90-Isoform nach miR-1-Inhibition, auf mRNA- und Proteinebene, prinzipiell auf eine negative Regulation durch miR-1 schließen, die lediglich durch die erhöhte mRNA-Konzentration nach miR-1-Überexpression kontrastiert wird. Möglicherweise sind dies Effekte von Gegenregulationen, die in Ermangelung von Informationen aus der Literatur nicht gänzlich geklärt werden können. Da HSP90 zur Stabilisierung des AR beiträgt[3] ließ sich vermuten, dass miR-1 ein

Suppressor des HSP90 ist und damit indirekt die AR-Aktivität und somit die Proliferation, im Sinne eines Tumorsuppressors, hemmt[38].

Dies konnte jedoch in letzter Konsequenz nicht bestätigt werden. Da es bisher keine Untersuchungen zur Beziehung zwischen miR-1 und den HSP90-Isoformen im PCa gibt, fehlen Vergleichswerte, die eine weitere Interpretation der Ergebnisse erlauben.

Aufgrund der bereits dargestellten Regulation des AR und miR-1 durch HSP27 wurde eine mögliche Verbindung dieser beiden HSP27-regulierten Faktoren vermutet. Auch die bereits gezeigte miR-1-Regulation von HSP70 und möglicherweise HSP90α, welche den AR stabilisieren und seine Funktion vermitteln, untermauerte diese These[3,5,11]. Zudem spielt der AR in seiner pro-proliferativen Funktion im PCa eine zentrale Rolle[2] und ist ein Regulator potentiell anti-therapeutischer Zellantworten[47]. Auch dadurch ist er ein plausibles Ziel einer tumorsuppressorisch agierenden miR-1.

Zur Untersuchung einer möglichen Regulation des AR durch miR-1 wurde auch hier die miR-1-Konzentration innerhalb des Zellkulturmodells, bestehend aus LNCaP- und PC-3-Zellen, durch Überexpression und Inhibition moduliert.

Die Ergebnisse zeigten eine plausible Inversität zwischen Überexpressions- und Inhibitions-Versuchen. Demnach erwies sich der AR nach miR-1-Überexpression auf mRNA- und Proteinebene als signifikant herabreguliert. Nach Inhibition kam es tendenziell zur konsekutiven Heraufregulation auf mRNA-Ebene. Da die Inhibitions-Versuche in PC-3-Zellen stattfanden, konnten auf Proteinebene keine Signale für den AR ausgewertet werden. PC-3-Zellen exprimieren keinen AR mehr auf Proteinebene und sind Androgen-unabhängig[11], wurden aber für die miR-1-Inhibition ausgewählt, da sie basal über einen hohen miR-1-Gehalt verfügen.

Es konnte demnach nachgewiesen werden, dass miR-1 im PCa den AR als einen essentiellen Proliferations-Faktor[11] regulieren kann. Durch den gezeigten AR-supprimierenden Effekt kann miR-1 in diesem Rahmen eine anti-proliferative, erneut tumorsuppressorische Rolle zugewiesen werden. Dass miRNAs im PCa zu einer AR-Regulierung imstande sind, wurde bereits in der

Literatur beschrieben. So haben u. a. miR-34a[48], miR-34c[49], miR-31[50], miR- let 7c[51] und miR-488[52] einen solchen Effekt gezeigt. Des Weiteren konnten Östling et al. für 12 weitere miRNAs nicht nur AR-regulierende sondern auch konsekutiv proliferations-hemmende Wirkung in PCa-Zellen nachweisen[49]. Dies sollte in Zukunft auch für miR-1 überprüft werden. Da alle Transfektionen im Zuge dieser Arbeit transient waren, würde eine stabile miR-1-überexprimierende Zelllinie eine Möglichkeit bieten, das Proliferations-Verhalten unter dauerhaft erhöhten miR-1-Konzentrationen zu beobachten.

In der Literatur lassen sich bis jetzt keine Hinweise auf den Zusammenhang zwischen miR-1 und dem AR finden, so dass die vorliegende Arbeit zum ersten Mal die Regulation des AR durch die miR-1 aufzeigt.

Zur Identifikation weiterer miR-1-regulierter Faktoren im PCa wurde eine DNA-Microarray-Untersuchung des Transkriptoms von PC-3-Zellen durchgeführt, welche zuvor mit einem miR-1-Inhibitor behandelt wurden. Die Analyse der Array-Daten ergab u. a. eine signifikante Heraufregulation von 21 Genen unter miR-1-Inhibition. Unter den hochregulierten Genen befand sich u. a. das für PC-3-Zellen pro-proliferativ und anti-apoptotisch wirkende TGF-β2[53]. Nachdem für die miR-1-regulierten Gene eine IPA durchgeführt wurde, konnte ein Netzwerk aus Signalwegen erstellt werden, in dem die direkt miR-1-regulierten Gene sowie weitere Faktoren miteinander in Verbindung gebracht werden konnten. Dabei erwiesen sich u. a. auch TGF-β1 und Erk1/2 als Faktoren, welche in PC-3-Zellen indirekt durch miR-1 reguliert werden.

TGF-β ist ein wichtiger Faktor der malignen Progression des PCa. Er wirkt vor Allem in späten Stadien pro-proliferativ, und ist wie der AR z. T. für potentiell anti-therapeutische Zellantworten verantwortlich[10]. Zusammen mit dem ebenfalls im DNA-Array als indirektes Regulationsziel von miR-1 identifizierten ERK1/2 ist TGF-β zudem an Invasivitäts- und Metastasierungs-Prozessen beteiligt[41]. miR-1 stellte sich im DNA-Array und der IPA als Suppressor dieser beiden Faktoren dar.

miR-1 unterdrückt demnach TGF-β bedingte Proliferation sowie weitere maligne Prozesse wie Invasivität und Metastasierung und lässt sich in diesem Kontext

erneut als Tumorsuppressor beschreiben. In Zukunft sollte eine experimentelle Überprüfung von TGF-β-Zellsignalwegen unter diesen Gesichtspunkten erfolgen. Als Kontrolle der Ergebnisse sollte zudem ein Microarray des Transkriptoms von LNCaP-Zellen erfolgen in denen miR-1 überexprimiert wurde.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass miR-1 in der Lage ist eine Vielzahl zentraler Faktoren in der Progression des PCa zu regulieren. Dies gilt für HSP70, das durch miR-1 ,zumindest auf mRNA-Ebene, supprimiert und dadurch in seiner pro-proliferativen Funktion inhibiert wird[15]. Möglicherweise ist dies aber auch für HSP90α der Fall, welches, allerdings nicht ganz Widerspruchs-frei, auf mRNA und Proteinebene, durch miR-1 negativ reguliert erscheint. Dies könnte dann zusammen mit der HSP70-Regulation einen miR-1-vermittelten, AR-destabilisierenden Effekt bedeuten, was sich indirekt wieder über eine Funktions-Minderung des AR anti-proliferativ auswirken würde. Lediglich HSP90β ließ sich nicht in dieses supprimierende Schema der HSP-Regulation durch miR-1 einordnen, was, wie bereits erwähnt, an einem Gegenregulations-Mechanismus liegen könnte. Des Weiteren zeigte miR-1 einen supprimierenden Effekt auf die beiden pro-proliferativen, potentiell anti-therapeutisch agierenden, Faktoren AR und TGF-β[10,11], von denen letzterer ebenfalls an Metastasierungs-Prozessen beteiligt ist[41].

Die in dieser Arbeit gezeigten, zum größten Teil anti-proliferativen, Eigenschaften von miR-1 verleihen ihr den Charakter eines Tumorsuppressors im PCa. Folglich wäre die Herabregulation von miR-1 während der Progression ein möglicher Resistenzmechanismus von PCa-Zellen.

Diese These wird untermauert durch die Ergebnisse des miR-1-Nachweises in malignem Prostata-Gewebe aus Patienten-Proben. Dort zeigte sich die miR-1 als deutlich herabreguliert im Vergleich zum umgebenden gesunden Gewebe. Im Rahmen dieser Arbeit war es leider nur möglich zwei dieser Nachweise durchzuführen. Um die Ergebnisse letztlich zu bestätigen, sollten noch weitere Nachweise erfolgen.

Die auch schon in der Literatur beschriebene Herabregulation der miR-1 in PCa-Gewebe[40] könnte in Verbindung mit einer gleichzeitigen Erhöhung des HSP27 in malignem Prostata-Gewebe stehen, wie sie durch Cornford et al. gezeigt wurde[54]. Eine gleichzeitige Untersuchung der HSP27- und miR-1-Spiegel in primärem PCa-Gewebe konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden und könnte eine zukünftige Zielstellung sein.

In jüngster Zeit untersuchten weitere Arbeitsgruppen einige Eigenschaften der miR-1 im PCa. Alle zur Zeit der Erstellung dieser Arbeit erschienenen Publikationen bestätigten die hier getätigte Schlussfolgerung, dass miR-1 anti-proliferative Funktion habe und als Tumorsuppressor bezeichnet werden könne. Hudson et. al beobachteten ebenso eine Reduktion der miR-1-Expression in PCa-Gewebe, allerdings in Fernmetastasen. Die darauf folgenden Untersuchungen zeigten, dass miR-1 epigenetisch stummgeschaltet zu sein schien. Des Weiteren konnten sie beweisen, dass aus miR-1-Überexpression eine Herunterregulation von Genen aus Signalwegen resultierte, die für die Zellzyklus-Progression, das Wachstum und die Teilung der Karzinomzellen verantwortlich sind. Auch eine Verbindung der miR-1 zu Metastasierungs-Prozessen konnte, ähnlich wie in dieser Arbeit, hergestellt werden[38]. Kojima et al fanden ebenfalls reduzierte miR-1-Konzentrationen im PCa vor. Sie schlossen daraus, dass miR-1 antiproliferative, wachstums-inhibierende Eigenschaften aufweist[39]. Ambs et al. entdeckten in ihren Expressions-Analysen von miRNAs in PCa-Gewebe ebenfalls eine miR-1-Herabregulation und identifizierten eine Proteinkinase mit onkogenem Potential als eines der miR-1-Ziele in diesen malignen Zellen[40]. Diese Kinase (Protein Tyrosin Kinase 9) befand sich jedoch nicht unter den miR-1-regulierten Genen, die im Microarray dieser Arbeit gefunden wurden. Bereits erwähnt wurde die Arbeit von Liu et al, die nicht nur die miR-1 mit der epithelial-mesenchymalen Transition in Verbindung bringt, sondern die miR-1 auch als wichtigen Faktor in tumorsuppressorischen Programmen darstellt[41].

Aus der Gesamtheit der Ergebnisse lässt sich ein Netzwerk aufstellen, in dessen Zentrum miR-1 als Tumorsuppressor steht. Anfangs wurde beschrieben, dass das HSP27 direkte negativ regulatorische Wirkung auf miR-1

hat, welche ihrerseits wiederum reprimierende Effekte auf TGF-β sowie auf ERK1/2, den AR sowie HSP70 und vermutlich HSP90α hat. Die Regulation von miR-1 auf den AR wirkt sich dabei zum einen direkt reprimierend aus, zum anderen wird der AR u. a. von HSP70 und HSP90α komplexiert, welche wie gezeigt von miR-1 supprimiert werden können. miR-1 hat folglich über dieses Netzwerk die Möglichkeit zur Suppression mehrerer essentieller zellulärer Mechanismen wie Proliferation, AR-Stabilität und Zell-Migration.

In Zukunft könnte miR-1 ein potentes Ziel pharmakologischer Interventionen werden, da sie über die Fähigkeit verfügt, mehrere relevante Faktoren der Progression des PCa zu supprimieren und damit effektiv das Tumorwachstum beeinflussen könnte.

6. Zusammenfassung

mikroRNAs (miRNAs oder miRs) sind kurze nicht-kodierende RNA-Moleküle, welche die Expression einer Vielzahl von Genen regulieren können. Das versetzt sie in die Lage, onkogene Zellsignalwege auf mehreren Ebenen fördern oder hemmen zu können. Die Rolle von miRNAs im Prostatakarzinom (PCa) wird zurzeit intensiv untersucht. Einen Beitrag dazu liefert diese Arbeit, welche die Rolle der miRNA miR-1 in PCa-Zellen charakterisiert. Untersucht wurde das Expressionsverhalten von Hitzeschock-Proteinen (HSPs) und Androgenrezeptor (AR) in PCa-spezifischen Zelllinien nach Überexpression bzw. Inhibition von miR-1. Des Weiteren wurde mit Hilfe einer Microarray-Untersuchung nach weiteren Zielen von miR-1-Regulation gesucht. Dabei erwies sich miR-1 als zentraler Faktor in einem regulatorischen Netzwerk, in dem sich HSP70, HSP90α, AR und TGF-β als Ziele miR-1-gesteuerter Suppression darstellten. miR-1 selbst unterliegt dabei ihrerseits der Regulation durch HSP27. Die Suppression von AR und HSPs hat letztlich anti-proliferative zelluläre Effekte zur Folge. Zum einen, weil HSP70 und AR pro-proliferativ wirken, zum anderen, da HSP70 und HSP90α den AR stabilisieren und dadurch seine pro-proliferative Funktion vermitteln. Auch das im Zuge einer Mircoarray-Untersuchung identifizierte miR-1-Ziel TGF-β wird durch diese miRNA negativ reguliert, was ebenfalls anti-proliferative Wirkung auf PCa-Zellen hat. Zudem wird TGF-β mit Metastasierungs-Prozessen in Verbindung gebracht, auf die miR-1, über die Suppression von TGF-β, möglicherweise regulatorisch einwirken kann. Die in dieser Arbeit gezeigte Herabregulation von miR-1 in menschlichem PCa-Gewebe bestätigt die *in vitro* Ergebnisse und lässt die Schlussfolgerung zu, dass miR-1 die Funktion eines Tumorsuppressors im PCa besitzt, welcher im Zuge der Malignisierung des Karzinoms, im Sinne eines Resistenz-Mechanismus, herunterreguliert wird. Damit stellt die miR-1 ein mögliches Ziel zukünftiger pharmakologischer Intervention bei der Therapie des PCa dar.

7. Literaturverzeichnis

1. Robert Koch Institut (RKI) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID), *Krebs in Deutschland 2007/2008*, (Berlin, 2012).

2. S. Koochekpour, "Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer.," *Asian J Androl.* 12, 639-657 (2010).

3. A. Zoubeidi, A. Zardan, E. Beraldi, L. Fazli, R. Sowery, P. Rennie, C. Nelson, and M. Gleave, "Cooperative interactions between androgen receptor (AR) and heat-shock protein 27 facilitate AR transcriptional activity," *Cancer Res.* 67, 10455-10465 (2007).

4. C. Garrido, M. Brunet, C. Didelot, Y. Zermati, E. Schmitt, and G. Kroemer, "Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties," *Cell Cycle* 5, 2592-2601 (2006).

5. S. S. Tan, I. Ahmad, H. L. Bennett, L. Singh, C. Nixon, M. Seywright, R. J. Barnetson, J. Edwards, and H. Y. Leung, "GRP78 up-regulation is associated with androgen receptor status, Hsp70-Hsp90 client proteins and castrate-resistant prostate cancer," *J Pathol.* 223, 81-87 (2011).

6. D. Djakiew, "Dysregulated expression of growth factors and their receptors in the development of prostate cancer," *Prostate* 42, 150-160 (2000).

7. N. M. Navone, P. Troncoso, C. J. Conti, and et al., "p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma.," *J Natl Cancer Inst.* 85, 1657-1669 (1993).

8. Tricoli JV, Gumerlock PH, deVere White RW, and et al., "Alterations of the retinoblastoma gene in human prostate adenocarcinoma.," *Genes Chromosomes Cancer.* 15, 108-114 (2012).

9. T. J. McDonnell, P. Troncoso, S. M. Brisbay, and et al., "Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer.," *Cancer Res.* 52, 6940-6944 (1992).

10. M. B. Stope, C. Rönnau, T. Schubert, M. Burchardt, C. Börgermann, and et al., "Transforming growth factor ß im Prostatakarzinom - Zelluläre Wirkungen und molekulare Grundlagen," *Der Urologe* 52 378-383 (2013).

11. M. B. Stope, A. Sauermann, C. Ronnau, U. Zimmermann, R. Walther, and M. Burchardt, "Androgen receptor and heat shock proteins in

progression of prostate cancer cells," *Int. J Clin Pharmacol. Ther.* 50, 65-67 (2012).

12. S. K. Calderwood, M. A. Khaleque, D. B. Sawyer, and D. R. Ciocca, "Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis," *Trends Biochem. Sci.* 31, 164-172 (2006).

13. S. M. Dehm and D. J. Tindall, "Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer," *Mol Endocrinol.* 21, 2855-2863 (2007).

14. N. Shore, M. Mason, and T. M. de Reijke, "New developments in castrate-resistant prostate cancer," *BJU. Int.* 109 Suppl 6, 22-32 (2012).

15. C. M. Hung, Y. H. Su, H. Y. Lin, J. N. Lin, L. C. Liu, C. T. Ho, and T. D. Way, "Demethoxycurcumin Modulates Prostate Cancer Cell Proliferation via AMPK-Induced Down-regulation of HSP70 and EGFR," *J. Agric. Food Chem.* (2012).

16. V. Coppola, M. R. De, and D. Bonci, "MicroRNAs and prostate cancer," *Endocr. Relat Cancer* 17, F1-17 (2010).

17. G. A. Calin and C. M. Croce, "MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale," *Cancer Res.* 66, 7390-7394 (2006).

18. S. Diederichs and D. A. Haber, "Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression," *Cell* 131, 1097-1108 (2007).

19. J. S. Mattick and I. V. Makunin, "Small regulatory RNAs in mammals," *Hum Mol Genet.* 14 Spec No 1, R121-R132 (2005).

20. H. Tagawa, K. Karube, S. Tsuzuki, K. Ohshima, and M. Seto, "Synergistic action of the microRNA-17 polycistron and Myc in aggressive cancer development," *Cancer Sci.* 98, 1482-1490 (2007).

21. G. A. Calin, C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich, and C. M. Croce, "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia," *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A* 99, 15524-15529 (2002).

22. A. Grunweller and R. K. Hartmann, "RNA interference as a gene-specific approach for molecular medicine," *Curr. Med. Chem.* 12, 3143-3161 (2005).

23. O. Hassan, A. Ahmad, S. Sethi, and F. H. Sarkar, "Recent updates on the role of microRNAs in prostate cancer," *J Hematol. Oncol.* 5, 9 (2012).

24. M. Han, J. Toli, and M. Abdellatif, "MicroRNAs in the cardiovascular system," *Curr. Opin. Cardiol.* 26, 181-189 (2011).

25. V. Oliveira-Carvalho, M. M. Silva, G. V. Guimaraes, F. Bacal, and E. A. Bocchi, "MicroRNAs: new players in heart failure," *Mol. Biol. Rep.* (2012).

26. H. Zhu and G. C. Fan, "Role of microRNAs in the reperfused myocardium towards post-infarct remodelling," *Cardiovasc. Res.* 94, 284-292 (2012).

27. D. Zhong, G. Huang, Y. Zhang, Y. Zeng, Z. Xu, Y. Zhao, X. He, and F. He, "MicroRNA-1 and microRNA-206 suppress LXRalpha-induced lipogenesis in hepatocytes," *Cell Signal.* 25, 1429-1437 (2013).

28. D. Li, P. Yang, H. Li, P. Cheng, L. Zhang, D. Wei, X. Su, J. Peng, H. Gao, Y. Tan, Z. Zhao, Y. Li, Z. Qi, Y. Rui, and T. Zhang, "MicroRNA-1 inhibits proliferation of hepatocarcinoma cells by targeting endothelin-1," *Life Sci.* 91, 440-447 (2012).

29. M. Kowalewska, E. Bakula-Zalewska, M. Chechlinska, K. Goryca, A. Nasierowska-Guttmejer, A. Danska-Bidzinska, and M. Bidzinski, "microRNAs in uterine sarcomas and mixed epithelial-mesenchymal uterine tumors: a preliminary report," *Tumour. Biol.* (2013).

30. Y. Zhao, Y. Li, L. Wang, H. Yang, Q. Wang, H. Qi, S. Li, P. Zhou, P. Liang, Q. Wang, and X. Li, "microRNA response elements-regulated TRAIL expression shows specific survival-suppressing activity on bladder cancer," *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 32, 10 (2013).

31. K. Kawakami, H. Enokida, T. Chiyomaru, S. Tatarano, H. Yoshino, I. Kagara, T. Gotanda, T. Tachiwada, K. Nishiyama, N. Nohata, N. Seki, and M. Nakagawa, "The functional significance of miR-1 and miR-133a in renal cell carcinoma," *Eur. J. Cancer* 48, 827-836 (2012).

32. C. Migliore, V. Martin, V. P. Leoni, A. Restivo, L. Atzori, A. Petrelli, C. Isella, L. Zorcolo, I. Sarotto, G. Casula, P. M. Comoglio, A. Columbano, and S. Giordano, "MiR-1 downregulation cooperates with MACC1 in promoting MET overexpression in human colon cancer," *Clin. Cancer Res.* 18, 737-747 (2012).

33. V. Leone, D. D'Angelo, I. Rubio, P. M. de Freitas, A. Federico, M. Colamaio, P. Pallante, G. Medeiros-Neto, and A. Fusco, "MiR-1 is a tumor suppressor in thyroid carcinogenesis targeting CCND2, CXCR4, and SDF-1alpha," *J. Clin. Endocrinol. Metab* 96, E1388-E1398 (2011).

34. M. W. Nasser, J. Datta, G. Nuovo, H. Kutay, T. Motiwala, S. Majumder, B. Wang, S. Suster, S. T. Jacob, and K. Ghoshal, "Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1," *J. Biol. Chem.* 283, 33394-33405 (2008).

35. N. Nohata, Y. Sone, T. Hanazawa, M. Fuse, N. Kikkawa, H. Yoshino, T. Chiyomaru, K. Kawakami, H. Enokida, M. Nakagawa, M. Shozu, Y. Okamoto, and N. Seki, "miR-1 as a tumor suppressive microRNA

targeting TAGLN2 in head and neck squamous cell carcinoma," *Oncotarget.* 2, 29-42 (2011).

36. N. Nohata, T. Hanazawa, N. Kikkawa, D. Sakurai, K. Sasaki, T. Chiyomaru, K. Kawakami, H. Yoshino, H. Enokida, M. Nakagawa, Y. Okamoto, and N. Seki, "Identification of novel molecular targets regulated by tumor suppressive miR-1/miR-133a in maxillary sinus squamous cell carcinoma," *Int. J. Oncol.* 39, 1099-1107 (2011).

37. N. Nohata, T. Hanazawa, H. Enokida, and N. Seki, "microRNA-1/133a and microRNA-206/133b clusters: dysregulation and functional roles in human cancers," *Oncotarget.* 3, 9-21 (2012).

38. R. S. Hudson, M. Yi, D. Esposito, S. K. Watkins, A. A. Hurwitz, H. G. Yfantis, D. H. Lee, J. F. Borin, M. J. Naslund, R. B. Alexander, T. H. Dorsey, R. M. Stephens, C. M. Croce, and S. Ambs, "MicroRNA-1 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in human prostate cancer," *Nucleic Acids Res.* 40, 3689-3703 (2012).

39. S. Kojima, T. Chiyomaru, K. Kawakami, H. Yoshino, H. Enokida, N. Nohata, M. Fuse, T. Ichikawa, Y. Naya, M. Nakagawa, and N. Seki, "Tumour suppressors miR-1 and miR-133a target the oncogenic function of purine nucleoside phosphorylase (PNP) in prostate cancer," *Br. J Cancer* 106, 405-413 (2012).

40. S. Ambs, R. L. Prueitt, M. Yi, R. S. Hudson, T. M. Howe, F. Petrocca, T. A. Wallace, C. G. Liu, S. Volinia, G. A. Calin, H. G. Yfantis, R. M. Stephens, and C. M. Croce, "Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer," *Cancer Res.* 68, 6162-6170 (2008).

41. Y. N. Liu, J. J. Yin, W. Abou-Kheir, P. G. Hynes, O. M. Casey, L. Fang, M. Yi, R. M. Stephens, V. Seng, H. Sheppard-Tillman, P. Martin, and K. Kelly, "MiR-1 and miR-200 inhibit EMT via Slug-dependent and tumorigenesis via Slug-independent mechanisms," *Oncogene* (2012).

42. M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976).

43. L. Whitesell and S. L. Lindquist, "HSP90 and the chaperoning of cancer," *Nat. Rev. Cancer* 5, 761-772 (2005).

44. S. Lu, Z. Tan, M. Wortman, S. Lu, and Z. Dong, "Regulation of heat shock protein 70-1 expression by androgen receptor and its signaling in human prostate cancer cells," *Int. J. Oncol.* 36, 459-467 (2010).

45. M. B. Stope, T. Schubert, D. Staar, C. Ronnau, A. Streitborger, N. Kroeger, C. Kubisch, U. Zimmermann, R. Walther, and M. Burchardt, "Effect of the heat shock protein HSP27 on androgen receptor

expression and function in prostate cancer cells," *World J Urol* 30, 327-331 (2012).

46. C. Xu, Y. Lu, Z. Pan, W. Chu, X. Luo, H. Lin, J. Xiao, H. Shan, Z. Wang, and B. Yang, "The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes," *J. Cell Sci.* 120, 3045-3052 (2007).

47. X. Yuan, C. Cai, S. Chen, S. Chen, Z. Yu, and S. P. Balk, "Androgen receptor functions in castration-resistant prostate cancer and mechanisms of resistance to new agents targeting the androgen axis," *Oncogene* (2013).

48. M. Kashat, L. Azzouz, S. H. Sarkar, D. Kong, Y. Li, and F. H. Sarkar, "Inactivation of AR and Notch-1 signaling by miR-34a attenuates prostate cancer aggressiveness," *Am. J Transl. Res.* 4, 432-442 (2012).

49. P. Ostling, S. K. Leivonen, A. Aakula, P. Kohonen, R. Makela, Z. Hagman, A. Edsjo, S. Kangaspeska, H. Edgren, D. Nicorici, A. Bjartell, Y. Ceder, M. Perala, and O. Kallioniemi, "Systematic analysis of microRNAs targeting the androgen receptor in prostate cancer cells," *Cancer Res.* 71, 1956-1967 (2011).

50. P. C. Lin, Y. L. Chiu, S. Banerjee, K. Park, J. M. Mosquera, E. Giannopoulou, P. Alves, A. K. Tewari, M. B. Gerstein, H. Beltran, A. M. Melnick, O. Elemento, F. Demichelis, and M. A. Rubin, "Epigenetic repression of miR-31 disrupts androgen receptor homeostasis and contributes to prostate cancer progression," *Cancer Res.* (2012).

51. N. Nadiminty, R. Tummala, W. Lou, Y. Zhu, J. Zhang, X. Chen, R. W. eVere White, H. J. Kung, C. P. Evans, and A. C. Gao, "MicroRNA let-7c suppresses androgen receptor expression and activity via regulation of Myc expression in prostate cancer cells," *J Biol. Chem.* 287, 1527-1537 (2012).

52. K. Sikand, J. E. Slaibi, R. Singh, S. D. Slane, and G. C. Shukla, "miR 488* inhibits androgen receptor expression in prostate carcinoma cells," *Int. J Cancer* 129, 810-819 (2011).

53. T. Lu, L. G. Burdelya, S. M. Swiatkowski, A. D. Boiko, P. H. Howe, G. R. Stark, and A. V. Gudkov, "Secreted transforming growth factor beta2 activates NF-kappaB, blocks apoptosis, and is essential for the survival of some tumor cells," *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A* 101, 7112-7117 (2004).

54. P. A. Cornford, A. R. Dodson, K. F. Parsons, A. D. Desmond, A. Woolfenden, M. Fordham, J. P. Neoptolemos, Y. Ke, and C. S. Foster, "Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer," *Cancer Res.* 60, 7099-7105 (2000).

8. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µ	Mikro-
A	Ampere
A. bidest	*Aqua bidestillata,* doppelt destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
ad	bis zu
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	*enhanced chemiluminescence,* verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	*fetal calf serum,* Fetales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HSP	Hitzeschockprotein
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LNCaP	*lymph node carcinoma of the prostate,* PCa-Zelllinie isoliert aus Lymphknotenmetastasen
M	molar

Abkürzung	Bedeutung
m	Milli-
min	Minute(n)
miR	mikroRNA
miRNA	mikroRNA
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	*messenger ribonucleic acid,* Boten-Ribonukleinsäure
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	*phosphate buffered saline,* Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC-3	Androgen-unabhängige PCa-Zelllinie
PCa	*Prostate carcinoma*, Prostatakarzinom
PCR	*polymerase chain reaction,* Polymerasekettenreaktion
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RNA	*ribonucleic acid,* Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RPMI-Medium	*Roswell-Park-Memorial-Institute*-Medium
rt	*real time*
RT	Reverse Transkription
SDS	*sodium dodecyl sulfate,* Natriumdodecylsulfat
sh	*small hairpin* kleine Haarnadelschleife
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat
TBS	*tris buffered saline,* Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	TBS mit 0,1 % Tween® 20
TEMED	N,N,N’,N’-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U/µl	*units per µl*, Einheiten pro µl
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	*weight per volume,* Masse pro Volumen

9. Danksagung

Ich möchte dem Arbeitsgruppen-Leiter Dr. Matthias Stope meinen Dank aussprechen für die hervorragende, kompetente, freundschaftliche und äußerst humorvolle Betreuung. Die inspirierende und freiheitliche lockere Atmosphäre im Labor wurde maßgeblich durch sein frohes Wesen mitgeprägt. Des Weiteren gilt mein Dank und Respekt meinen Kommilitonen und Mitstreitern Lisa Rauschenberger, Melanie Preuß, Martin Weiss und Andreas Streitbörger. Die Zusammenarbeit mit ihnen war mir eine große Freude und ich habe ihre Anwesenheit während der Monate im Labor immer sehr genossen. Sie haben einen großen Teil dazu beigetragen, dass die Zeit im Labor zu den schönsten Erfahrungen meines Lebens gehört. Weiterer Dank gebührt Stefanie Peters, die einen Teil meiner Experimente weiterführte, als ich dies zeitlich nicht mehr schaffen konnte. Sie war immer eine kompetente und charmante Ansprechpartnerin. Auch Anne Brandenburg möchte ich für all die Erklärungsarbeit bezüglich der im Labor angewandten Methoden und der Benutzung der technischen Geräte danken. Tina Schubert danke ich ebenso für die Erklärung und für das Lehren einiger Methoden, sowie für die geleistete Vorarbeit zu meinem Thema. Prof. Dr. Martin Burchardt gilt mein Dank zum einen dafür, in einem so gut ausgerüsteten Labor sehr freiheitlich und gut versorgt gearbeitet haben zu dürfen, zum anderen dafür, dass er sich häufig, trotz sehr vollem Terminkalender, Zeit genommen hat, um sich interessiert unsere Fortschritte im Labor präsentieren zu lassen. Und ich danke meinen Eltern für den Glauben an mich und die Unterstützung, die sie mir seit jeher haben angedeihen lassen. Abschließend möchte ich meiner Partnerin und Freundin Anika Sahr danken, die meine Arbeit mit ihrem gesunden Sachverstand und liebevollen Ansporn um einiges bereichert hat. Es war mir Ehre mit jedem genannten gearbeitet haben zu dürfen.