

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie
Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Martin Burchardt
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema:

**Wirkung des HSP70-Inhibitors VER155008 auf
Prostatakarzinom-Zellen**

Inaugural-Dissertation
zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der
Universitätsmedizin

der
Universität Greifswald

2021

vorgelegt von:
Clara Elisabeth Langer
geboren am 19.05.1992
in Wiesbaden

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Ort, Raum:

Tag der Disputation:

Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

PD Dr. Dr. Matthias Stope

Prof. Dr. Zoran Culig

Greifswald/Frankfurt, Online Meeting

17.03.2022

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	V
II	Abbildungsverzeichnis	VI
III	Tabellenverzeichnis	VII
1	Einleitung	1
1.1	Die Prostata	1
1.2	Das Prostatakarzinom (PCa)	2
1.3	Therapie des Prostatakarzinoms	4
1.4	Hitzeschockproteine (HSPs).....	6
1.5	Androgenrezeptor (AR).....	10
1.6	VER155008 als HSP70-Inhibitor	11
2	Zielsetzung	13
3	Material und Methoden	14
3.1	Material	14
3.1.1	Geräte	14
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	15
3.1.3	Chemikalien und kommerzielle Lösungen	16
3.1.4	Puffer und Lösungen.....	17
3.1.5	Antikörper	18
3.1.6	Zelllinien.....	18
3.1.7	Zellkultur: Medien und Zusätze	18
3.2	Zellbiologische Methoden	19
3.2.1	Lagerung und Auftauen der Zellen	19

3.2.2	Kultivieren und Passagieren der Zellen	20
3.2.3	Aussaat und Behandlung der Zellen mit VER155008 bzw. der Kontrollgruppe	20
3.2.4	Ernte der Zellen und Zellzahlbestimmung mittels CASY TT Cell Counter.....	22
3.3	Proteinbiochemische Methoden	22
3.3.1	Protein-Isolierung mittels RIPA-Lyse	22
3.3.2	Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford	23
3.3.3	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	23
3.3.4	Western Blotting, Immunfärbung und Detektion	25
3.4	Statistische Auswertung	27
4	Ergebnisse	28
4.1	Bestimmung des halbmaximalen inhibitorischen Effektes (IC_{50}) von VER155008 auf PCa-Zellen	28
4.2	Proteinanalyse der Hitzeschockproteine (HSPs) in LNCaP- und PC-3-Zellen unter VER155008-Inkubation	29
4.3	Proteinanalyse des Androgenrezeptors (AR) in LNCaP-Zellen unter VER155008-Inkubation	37
5	Diskussion	38
6	Zusammenfassung	49
7	Anhang	50
	Abstract: Brännert D, <u>Langer C</u> , Zimmermann L, et al. J Cell Biochem 2019	51
8	Literaturverzeichnis	62

I Abkürzungsverzeichnis

5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
A.bidest	zweifach destilliertes Wasser
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Androgenrezeptor
ARE	Androgen response elements
ATP	Adenosintriphosphat
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
BSA	bovines Serumalbumin
CRPC	Kastrationsresistentes PCa
Cyp17A1	Cytochrom P450 17A1
DHT	Dihydrotestosteron
DISC	death-inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonuklotidsäure
DRU	Digital-rektale Untersuchung
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFR	growth factor receptor
GnRH	Gonadotropin-releasing Hormon
HOP	HSP70/HSP90-organising-protein
HSP	Hitzeschockprotein
IC ₅₀	mittlere Inhibitorische Konzentration
LH	Luteinisierendes Hormon
LNCaP	lymph node carcinoma of the prostate
mPCa	metastasiertes Prostatakarzinom
MW	Mittelwert
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCa	Prostatakarzinom
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RIPA	Radio-Immuno-Precipitation Assay
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNM	Tumor-Nodus-Lymphknoten
TRUS	transrektaler Ultraschall
VER	VER155008
WHO	World Health Organisation

II **Abbildungsverzeichnis**

<i>Abb. 1.1:</i> Angriffspunkte von Antiandrogenen	6
<i>Abb. 1.2:</i> Die Rolle von HSPs in der Funktion des ARs	10
<i>Abb. 1.3 A:</i> Die Bindung von ATP und VER an HSP70 bzw. HSP90	12
<i>Abb. 1.3 B:</i> Struktur von VER155008	12
<i>Abb. 4.1:</i> Wachstumskinetik von PC-3- und LNCaP-Zellen unter VER155008-Behandlung	29
<i>Abb. 4.2:</i> Western Blot Analysen von HSP27 in PC-3- und LNCaP-Zellen unter VER155008-Behandlung	30
<i>Abb. 4.3:</i> Western Blot Analysen von HSP40 in PC-3- und LNCaP-Zellen unter VER155008-Behandlung	31
<i>Abb. 4.4:</i> Western Blot Analysen von HSP60 in PC-3- und LNCaP-Zellen unter VER155008-Behandlung	32
<i>Abb. 4.5:</i> Western Blot Analysen von HOP in PC-3- und LNCaP-Zellen unter VER155008-Behandlung	33
<i>Abb. 4.6:</i> Western Blot Analysen von HSP70 in PC-3- und LNCaP-Zellen unter VER155008-Behandlung	34
<i>Abb. 4.7:</i> Western Blot Analysen von HSP90 α in PC-3- und LNCaP-Zellen unter VER155008-Behandlung	35
<i>Abb. 4.8:</i> Western Blot Analysen von HSP90 β in PC-3- und LNCaP-Zellen unter VER155008-Behandlung	36
<i>Abb. 4.9:</i> Western Blot Analysen des AR in LNCaP-Zellen unter VER155008-Behandlung	37
<i>Abb. 5.1:</i> HSP-Antwort bei zellulärem Stress	43

III Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1.1:</i> Stadieneinteilung des PCa anhand der TNM-Klassifikation nach IUCC mit 5-Jahresüberlebensraten (5-JÜR)	3
<i>Tab. 3.1:</i> Pipettierschema zur Proteinbestimmung nach Bradford-Eichreihe	23
<i>Tab. 3.2:</i> Pipettierschema der SDS-Gele	24
<i>Tab. 3.3:</i> Beladungsschema der Taschen für die SDS-PAGE	25
<i>Tab. 7.1:</i> Stadieneinteilung des PCa anhand der TNM-Klassifikation nach IUCC	50

1 Einleitung

1.1 Die Prostata

Die Prostata gehört zu den akzessorischen Geschlechtsdrüsen des Mannes und ist u.a. für die Produktion des sauren Prostatasekrets, ein Bestandteil des Ejakulats, verantwortlich. Sie liegt im kleinen Becken ventral des Rektums, kaudal der Harnblase und umgibt die Pars prostatica der Urethra, in welche die Ausführungsgänge der Prostatadrüsen münden. Das physiologische Prostatagewicht beträgt ca. 20-25g, sie besitzt eine kastanienähnliche Form und liegt mit ihrem kegelförmig zulaufenden Apex am Beckenboden auf. Die Prostata lässt sich klinisch nach McNeal¹ in fünf verschiedene Zonen einteilen:

- die periurethrale Mantelzone, welche die Harnröhre unmittelbar umgibt und in die die Ausführungsgänge der Prostata münden;
- die anteriore Zone, eine schmale, drüsenfreie Zone, die hauptsächlich aus Muskel- und Bindegewebe besteht und ventral der Harnröhre liegt;
- die Transitionszone, die seitlich der periurethralen Mantelzone liegt und von der die Benigne Prostatahyperplasie (BPH) in den meisten Fällen ausgeht;
- die zentrale Zone, welche sich im kranialen Anteil befindet und durch die die beiden Ductus ejaculatorii verlaufen und
- die periphere Zone, welche den Großteil des Organvolumens ausmacht und eine große zirkuläre Außenzone bildet, die der bindegewebigen Organkapsel direkt anliegt. Hier hat in 75% der Fälle das Prostatakarzinom (PCa) seinen Ursprung.

Ein physiologischer Tastbefund stellt sich bei der digito-rektalen Untersuchung prallelastisch mit tastbarem medianen Sulcus und gleichmäßigen Seitenlappen dar. Histologisch besteht die Prostata aus einem tubulo-alveolären Drüsenparenchym, welches in ein fibro-muskuläres Stroma eingebettet ist und den Großteil des Prostatagewebes ausmacht. Umgeben ist das Gewebe von der Capsula prostatica, einer derben, bindegewebigen Organkapsel.

Die Entwicklung, Differenzierung und Funktion der Prostata unterliegt der hormonellen Regulation durch Androgene, welche über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse gesteuert werden. Der Regelkreislauf beginnt im Hypothalamus, der über eine Ausschüttung von Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) die Adenohypophyse aktiviert, um Gonadotropine freizusetzen. Der Hypophysenvorderlappen sezerniert hierbei das

Luteinisierendes Hormon (LH) und das Follikelstimulierende Hormon (FSH). LH bewirkt in den Leydig-Zellen des Hodens die Testosteronbildung aus Cholesterin. Auch in den Zellen der Nebennierenrinde wird durch LH-Stimulation ein geringer Anteil des Testosterons produziert². In den verschiedenen Zielgeweben, wie beispielsweise der Prostata, der Samenblase oder der Muskulatur, kann Testosteron anschließend durch die 5 α -Reduktase in Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt werden. DHT besitzt im Vergleich zu Testosteron eine höhere Bindungsaffinität zum Zielmolekül, dem Androgenrezeptor (AR), und gilt deshalb als wirksamstes Androgen. Nach Ligandenaktivierung des AR durch Testosteron bzw. DHT dimerisiert dieser und transloziert unter Mithilfe von Hilfsmolekülen, wie HSP27, in den Nucleus, wo er als Transkriptionsfaktor AR-regulierte Gene aktiviert. In den Samenepithelzellen und Stromazellen der Prostata bewirkt die AR-Aktivierung eine Proliferation des Prostatagewebes, sowie unter anderem auch die Transkription des prostataspezifischen Antigens (PSA). Der PSA-Wert dient als Marker und Verlaufsparemeter von Erkrankungen der Prostata, wie dem PCa und der BPH, und findet außerdem Anwendung im PCa-Screening.

1.2 Das Prostatakarzinom (PCa)

Das PCa ist der häufigste maligne Tumor des Mannes und ist für rund 10% der tumorassozierten Todesfälle verantwortlich^{3,4}. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren³. Das PCa stellt eine heterogene Erkrankung dar. Es gibt langsam wachsende Tumoren, welche nicht zwangsläufig therapiert werden müssen, da sie nicht lebenslimitierend sind. Es zeigen sich jedoch auch aggressive Varianten mit stark infiltrierendem und metastasierendem Wachstum, die einer Therapie bedürfen.

Zur frühzeitigen Erkennung eines PCa wird im Alter von 45 bis 70 Jahren ein Screening angeboten, welches eine digital-rektale Untersuchung (DRU) und eine Bestimmung des PSA-Wertes beinhaltet³. Das PCa ist in den meisten Fällen in der peripheren Zone lokalisiert, welche bei einer DRU ertastet werden kann. Karzinomverdächtig sind derbe Areale bzw. eine insgesamt derb zu tastende und asymmetrische Prostata. Seltener, in nur 15% der Fälle ist ein PCa in der Transitionszone zu finden³. Ein Tumor der Innenzone stellt eine Rarität dar³. PSA-Werte bis 4,0ng/ml können als physiologisch angesehen werden, ab einem PSA von

10,0ng/ml besteht der dringende Verdacht eines PCa, wobei dazwischenliegende Werte altersadaptiert betrachtet werden müssen. Auch die Anstiegsgeschwindigkeit des PSA-Wertes (PSA-Velocity) ermöglicht im zeitlichen Verlauf eine Aussage über das Vorliegen eines PCa. Zur ergänzenden Diagnose kann mittels Transrektaler Sonografie (TRUS) ein pathologischer Tastbefund weiter abgeklärt werden. Zur Diagnosesicherung wird im Anschluss eine transrektale, sonografiegesteuerte Prostatastanzbiopsie durchgeführt, bei der 10–12 Gewebezylinder fächerförmig entnommen werden³. Das PCa ist in den meisten Fällen ein Adenokarzinom, welches seinen Ursprung im prostatistischen Drüsenparenchym findet⁴. Die Biopsate werden anhand ihrer histologischen Drüsenmorphologie beurteilt und nach dem Gleason-Grading histopathologisch eingeteilt⁵. Zur Berechnung des Gleason-Scores, eines starken prognostischen Parameters des PCa, werden zwei Gleason-Grade der Prostatastanzbiopsate addiert – dem am häufigsten vorkommenden und dem am schlechtesten differenzierten Grad („the most“ + „the worst“)³. Im Falle des PCa erlaubt die differenzierte Bewertung anhand des Gleason-Scores eine bessere Prognoseabschätzung im Vergleich zum WHO-Grading⁴. Ein Gleason-Score von ≥ 7 gilt hierbei als prognostisch ungünstig mit einem zu erwartenden malignem Verlauf⁶.

Zur Stadieneinteilung des PCa wird die TNM-Klassifikation der Internationalen Vereinigung gegen Krebs (IUCC) herangezogen⁴⁷, welche die Grundlage für klinische Studien und die Prostataleitlinien bildet³. Die Klassifikation berücksichtigt zum einen die Ausdehnung des Primärtumors (T1-4), das Vorhandensein und die Lokalisation von befallenen Lymphknoten (N0-3), sowie das Vorliegen von Fernmetastasen (M0-1). Das Fehlen von Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen wird mit N0 bzw. M0 vermerkt. Die Behandlungserfolge sind abhängig von den Tumorstadien. Beim lokal begrenzten PCa liegt die 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) unter stadiengerechter Behandlung bei 80-90%, wohingegen sie beim fortgeschrittenen PCa auf bis zu 30% absinkt⁴ (siehe Tab. 1.1).

Tabelle 1.1: Stadieneinteilung des PCa anhand der TNM-Klassifikation nach IUCC⁷ mit 5-Jahresüberlebensraten (5-JÜR)⁴. Vollständige Klassifikation siehe Tabelle 7.1 im Anhang.

Stadieneinteilung	TNM-Klassifikation	5-JÜR
lokal begrenztet PCa	T1-2 N0 M0	80-90%
lokal fortgeschrittenes PCa	T3-4 N0 M0	50%
fortgeschrittenes bzw. metastasiertes PCa	N1-3 und/oder M1, jedes T	30%

1.3 Therapie des Prostatakarzinoms

Das PCa zeigt vielfältige Behandlungsoptionen, die stadiengerecht und patientenabhängig, einzeln oder kombiniert empfohlen werden sollen³.

Beim nichtmetastasierten PCa stehen die radikale Prostatektomie mit ggf. einer Lymphadenektomie, eine perkutane Strahlentherapie, sowie eine Brachytherapie als kurativ intendierte Behandlungsoptionen zur Auswahl³. Bei älteren Patienten mit einer tumorunabhängigen Lebenserwartung von unter 10 Jahren soll jedoch auch über das Watchful Waiting, einer palliativen, nichtinterventionellen Therapie, beraten werden³. Auch die Active Surveillance, ein abwartendes Vorgehen mit aktiver Überwachung der Patienten und jederzeit möglicher Einleitung einer kurativ intendierten Behandlung, steht als Option beim low-risk nichtmetastasierten PCa (Gleason ≤ 6 , PSA ≤ 10 ng/ml, cT1 oder cT2a) zur Auswahl³.

Bei asymptomatischen Patienten nach stattgehabter kurativ intendierter Therapie sollte eine Bestimmung des PSA-Wertes zur Nachsorge eingesetzt werden³. Bei einem in mindestens zwei Messungen bestätigten erhöhten PSA-Wert von $>0,2$ ng/ml nach radikaler Prostatektomie bzw. ein PSA-Anstieg von $2,0$ ng/ml nach Strahlentherapie ist ein biochemisches Rezidiv anzunehmen³. Bei einem Rezidiv eines lokal begrenzten PCa ohne Lymphknoten- oder Knochenmetastasen kann bei einer vorangegangenen radikalen Prostatektomie eine Strahlentherapie, bzw. umgekehrt nach einer vorangegangenen Strahlentherapie eine Salvage-Prostatektomie durchgeführt werden^{3,4}.

Bei einem lymphknotenpositiven PCa stehen neben einer operativen und einer Strahlentherapie auch zusätzliche Hormontherapien als Behandlungsoptionen zur Auswahl³. Hierzu zählt eine bilaterale Orchiektomie, eine Hormonentzugstherapie mit GnRH-Analoga (z.B. Goserelin, Buserelin) oder GnRH-Blockern (z.B. Abarelix) oder eine Antiandrogentherapie (z.B. Bicalutamid, Flutamid) (*siehe Abb. 1.1*)³. Bereits 1941 zeigte Charles B. Huggins den Effekt einer Kastration bei metastasiertem PCa und postulierte eine Androgenabhängigkeit dieses Karzinoms⁸.

Für das metastasierte PCa (mPCa) gibt es lediglich Therapieoptionen mit palliativem Charakter, über die anhand von Patientenpräferenzen, Nebenwirkungen und Begleiterkrankungen entschieden werden soll³. Unterschieden wird hierbei in

hormonsensitive oder kastrationsresistente mPCa, bei denen ein androgenunabhängiges Tumorwachstum beobachtet wird. Patienten in gutem Allgemeinzustand sollen bei einem hormonsensitiven mPCa zusätzlich zu einer kombinierten Hormontherapie eine ergänzende Chemotherapie mit Docetaxel (kombinierte Hormon-Chemotherapie) oder eine ergänzende antihormonelle Therapie mit Abirateron (plus Prednison/Prednisolon) empfohlen werden³. Docetaxel ist ein Chemotherapeutikum aus der Gruppe der Taxane und bewirkt über eine Stabilisierung der Mikrotubuli eine Blockierung der Mitose⁹. Abirateron inhibiert irreversibel Cyp17A1, ein zentrales Enzym der Androgensynthese, und führt somit zu einem weiteren Absinken der Androgenkonzentration¹⁰. Eine hormonablative Therapie soll durch eine maximale Androgenblockade das Wachstum des PCa verzögern¹¹. Nach durchschnittlich 18 bis 33 Monaten bilden die Tumorzellen jedoch Resistenzmechanismen aus, es kommt zum Tumorprogress und es entwickelt sich ein hormonrefraktäres Karzinom (=kastrationsresistent)^{4,11}.

Bei Patienten mit kastrationsresistentem mPCa (CRPC = castration resistant prostate cancer) kann eine Umstellung der Behandlung erfolgen. Behandlungsoptionen stellen hierbei eine Chemotherapie mit Docetaxel oder eine Therapie mit hormonablativen Wirkstoffen wie Abirateron (in Kombination mit Prednisolon) oder Enzalutamid dar³. Enzalutamid hemmt die Bindung von DHT an den AR und dessen Translokation in den Zellkern¹². Zur Behandlung von Knochenmetastasen kommt zudem Radium-223 zum Einsatz¹³. Radium-223 lagert sich als Calciumanalogon in den Knochen ein und wirkt in den Knochenmetastasen lokal radiotherapeutisch¹³. Als Zweitlinientherapie nach einer Chemotherapie mit Docetaxel können Abirateron, Cabazitaxel oder Enzalutamid als Therapieoption angeboten werden. Cabazitaxel zählt wie Docetaxel ebenfalls zu den Taxanen und bewirkt über eine Blockierung des Spindelapparates einen Zellzyklusstopp¹². Trotz der Neuzulassungen der letzten Jahre ist es unerlässlich weitere mögliche Zielmoleküle zu erforschen, welche die androgenabhängigen Signalwege umgehen und somit einem weiteren Tumorprogress entgegenwirken können.

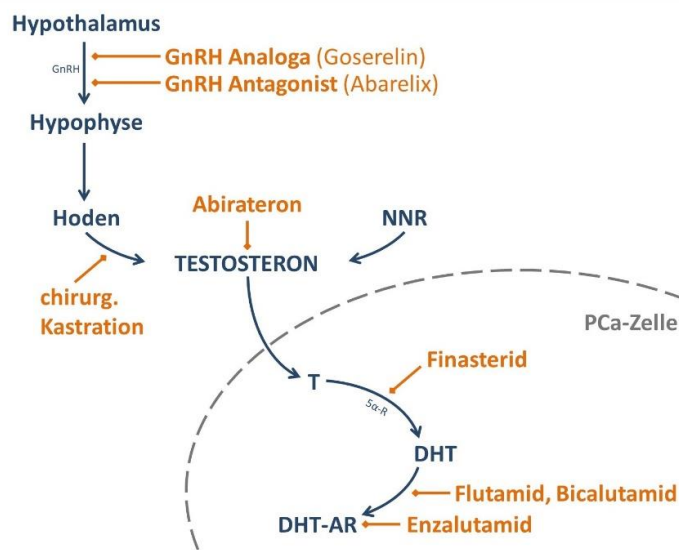


Abbildung 1.1: Angriffspunkte von Antiandrogenen³.

Das Wachstum der Prostatazellen wird über das Hormon Testosteron (T) angeregt, welches seinerseits über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse reguliert wird. Auf hypothalamischer Ebene agieren die Antiandrogene Goserelin und Abarelix. Durch eine chirurgische Kastration wird die Testosteronproduktion der Leydig-Zellen des Hodens unterbunden, lediglich die Nebenniere (NNR) produziert geringe Restmengen von Testosteron. Abirateron hemmt auf enzymatischer Ebene die

Testosteronproduktion. Finasterid hemmt die 5 α -Reduktase (5 α -R), die Testosteron in das wirksamere Dihydrotestosteron (DHT) umwandelt. Die AR-Antagonisten Flutamid und Bicalutamid blockieren die Bindung von DHT an den AR. Enzalutamid hemmt ebenfalls die Bindung von DHT an den AR, sowie dessen Translokation in den Zellkern.

1.4 Hitzeschockproteine (HSPs)

Hitzeschockproteine (HSPs) sind molekulare Chaperone die sowohl im physiologischen Zellhaushalt eine wichtige Rolle spielen als auch zum Überleben der Zelle in Stresssituationen beitragen. Sie assistieren Proteinen bei der korrekten Faltung und Assemblierung, helfen bei Stabilisierung, Transport und Abbau, regulieren Transkriptionsfaktoren und verhindern die Aggregation von Proteinen^{14,15}. In Stresssituationen (z.B. Hitze, pH-Änderungen, oxidativer Stress, Chemotherapie, Strahlung) werden einige HSPs vermehrt exprimiert um die Reparatur und korrekte Faltung von defekten Proteinen zu erleichtern und somit das Überleben der Zelle zu sichern¹⁵⁻¹⁷. Vor allem in Tumorzellen spielen die HSPs eine wichtige Rolle, da hier ein deutlich erhöhter Stoffwechsel stattfindet und vermehrt Proteine sowie zusätzlich mutierte Proteine exprimiert werden, welche einen hohen Bedarf an Chaperonen haben^{16,18}. Zusätzlich scheinen HSPs einen starken Einfluss in Tumorzellen zu haben, da sie mit ihrer antiapoptotischen Wirkung zahlreiche zytoprotektive Mechanismen mitregulieren, wodurch sie Einfluss auf Tumorzellproliferation, -differenzierung, Metastasierung und Invasion nehmen^{16,17,19}. Diese Annahme bestätigend zeigen mehrere Studien erhöhte HSP-Level in

Tumorgewebe vergleichend zu gesundem Gewebe, wie beispielsweise im PCa, Urothel-, Ovarial-, Brust-, und Kolonkarzinom²⁰⁻²². Zudem zeichnet es sich ab, dass spezifische HSPs als Biomarker geeignet sind um Aussagen bezüglich Aggressivität, Prognose oder dem Ansprechen auf Therapien bestimmter Tumorentitäten zu treffen¹⁷. Eine vermehrte HSP27-Expression wurde beispielsweise mit einer schlechten Prognose bei Prostata-, Ovarial-, Magen- und Leberkarzinom assoziiert, eine vermehrte HSP70-Expression mit einer schlechten Prognose bei Mamma-, Endometrium- und Uteruskarzinom¹⁷. Dies ist kongruent mit der bisherigen Assoziation von erhöhten HSP70-Levels mit einem schlechten Differenzierungsgrad, Lymphknotenmetastasen, vermehrter Zellproliferation und höherem klinischen Staging von Tumoren¹⁷.

Beim PCa nimmt HSP27 eine besondere Rolle ein, da es den Transport des Androgenrezeptors (AR) in den Nucleus ermöglicht und somit die zelluläre Antwort auf die Wachstumshormone Testosteron und DHT beeinflusst^{23,24} (*siehe Abb. 1.2*). Generell zeigt sich eine Korrelation der HSP27-Expressionslevel mit dem Gleason-Score des PCa²⁵. Eine deutliche Erhöhung der HSP27-Expression zeigt sich bei PCa-Zellen nach antiandrogener Therapie und Chemotherapie (u.a. mittels Docetaxel), wobei HSP27 als zytoprotektives Chaperon einen Resistenzmechanismus vermittelt^{26,27}. Die Zweitlinien-Therapeutika bei CRPC Abirateron, Cabazitaxel und Enzalutamid, welche erfolgreich nach einem Therapieversagen von Docetaxel eingesetzt werden, bedingen eine verminderte HSP27-Expression²⁸⁻³⁰. Somit ist der Ansatz naheliegend, Docetaxel mit einem HSP27-inhibierendem Therapeutikum zu kombinieren, um das CRPC erfolgreicher zu therapieren. Zusätzliche zytoprotektive Eigenschaften zeigt HSP27 indem es an verschiedenen Punkten die Apoptose blockiert, beispielsweise in der Inhibierten Reifung von Caspase-3 oder der Inhibierten Translokation von Bax in das Mitochondrium^{15,31,32}. Auch die Invasion von Tumorzellen in umliegendes Gewebe, sowie die Bildung von Metastasen ist assoziiert mit einer HSP27-Aktivität, welche sich durch Modulation des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix erklären lässt^{16,33}. Zusammenfassend scheinen erhöhte HSP27-Level mit der Entwicklung des kastrationsresistenten PCa assoziiert zu sein und bieten somit ein wichtiges Zielmolekül in der Therapie des CRPC³⁴.

HSP40 fungiert wie das HSP70/90-organising protein (HOP) als Co-Chaperon anderer HSPs. Der AR-Multi-Chaperonkomplex, welcher die Stabilität des Androgenrezeptors vermittelt,

wird aus HSP90 und HSP70 gemeinsam mit HSP40 und HOP gebildet³⁵ (siehe Abb. 1.2). HOP agiert hierbei als Bindeglied zwischen HSP70 und HSP90 und nimmt außerdem Einfluss auf die Funktion von HSP90, indem es die Dimerisierung des Hitzeschockproteins vermittelt¹⁶. HSP40 transferiert ungefaltete Proteine zu HSP70, stimuliert seine ATPase-Aktivität und nimmt somit Einfluss auf die Funktion von HSP70^{36,37}. Mit seinen über 40 Splicevarianten und Isoformen ist die Rolle von HSP40 in Tumorzellen noch nicht ausreichend charakterisiert.

Bei Patienten mit fortgeschrittenem PCa zeigt sich eine Korrelation der HSP60-Expression mit dem Tumorprogress, außerdem scheint HSP60 mit der androgenresistenz des Tumors, sowie einem verkürzten progressionsfreien Intervall assoziiert zu sein³⁸. HSP60 ist verantwortlich für den Transport und die Faltung mitochondrialer Proteine. Hier agiert es beispielsweise zytoprotektiv, indem es die Translokation von Bax in das Mitochondrium blockiert und somit die Apoptose verhindert³⁹. Allerdings scheint HSP60 neben den antiapoptotischen Eigenschaften auch proapoptotische Wirkungen zu haben⁴⁰.

Im Tumorgewebe herrscht oftmals ein Unterangebot an Nährstoffen, Hypoxie, sowie ein niedriger pH-Wert, was physiologischerweise zur Einleitung der Apoptose führen würde. Daher müssen Tumorzellen diesen zytotoxischen Stress überwinden, um weiterwachsen und proliferieren zu können. Diese Anpassung, den Zelltod unterdrücken zu können, scheint maßgeblich durch eine hohe Aktivität von HSP70 in Tumorzellen bedingt zu sein^{41,42}. Nicht nur die Chaperonfunktion spielt hierbei eine Rolle, sondern vor allem ein regulatorisches Eingreifen von HSP70 in Signalkaskaden der Zellen⁴¹. Hierbei greift HSP70 beispielsweise in den intrinsischen Weg der Apoptose ein, indem es die Aktivierung des proapoptotischen Proteins Bax hemmt und somit Cytochrom C nicht aus dem Mitochondrium translozieren kann⁴³. Auch im extrinsischen Weg blockiert HSP70 die Assemblierung des DISC (death-inducing signaling complex)⁴⁴. In beiden Signalkaskaden wird so die Aktivierung des Schlüsselproteins Caspase-3 verhindert, welches Zielproteine abbaut und den Zelltod einleitet⁴⁴. Somit kann eine hohe HSP70-Aktivität den Tumorzellen helfen, diese proteo- und zytotoxischen Noxen zu überwinden. Neben der Blockierung der Apoptose scheint HSP70 eine wichtige Funktion in der Unterdrückung der Seneszenz zu haben. Bei der Seneszenz befinden sich die Zellen in einem permanenten Zellzyklusarrest, sie können weder weiterwachsen noch proliferieren und können schließlich durch das Immunsystem des

Körpers eliminiert werden⁴¹. Seneszenz agiert als Schutzmechanismus um abnorme Zellen, die Onkogene produzieren oder ungepaarte DNA-Stränge besitzen, von der Weiterentwicklung abzuhalten und somit einer Entstehung von Tumoren entgegenzuwirken⁴⁵. Sherman et al. zeigten, dass ein Silencing des HSP70-Gens eine Seneszenz von Tumorzellen (unter anderem in der PCa-Zelllinie PC-3) induzieren konnte, sowohl p53-abhängig, als auch p53-unabhängig^{21,46}. Neben der Modulation zellulärer Signalkaskaden hat HSP70, wie auch HSP90, eine wichtige Chaperonfunktion, die vor allem in Tumorzellen entscheidend ist. Die Balance des Proteoms ist in Tumorzellen gestört, da vermehrt fehlgefaltete und mutierte Proteine in der Zelle aggregieren. Dieser proteotoxische Stress bedingt unter anderem eine erhöhte Abhängigkeit der Tumorzellen von HSPs⁴⁷. Die Chaperonfunktion wird in Tumorzellen meist von stressinduzierten Isoformen von HSP70 wie HSP70-1 übernommen. Doch auch in gesunden Zellen sind konstitutiv exprimierte Isoformen wie HSC70 (auch HSP70-8 genannt) für die Proteinhomöostase verantwortlich²¹.

In seiner Chaperonfunktion interagiert HSP90 mit vielfältigen Bindungspartnern, sogenannten client-proteins, wie beispielsweise Wachstumsfaktorrezeptoren (growth factor receptor, GFR), Zellzyklusregulatoren und Kinasen wie Akt und Her-2, die in der Entwicklung des CRPC eine Rolle spielen^{48,49}. Des Weiteren hat HSP90 antiapoptotischen Einfluss auf zytotoxische Signalkaskaden⁵⁰. Im PCa ist HSP90 ein wichtiger Bestandteil des AR-Multi-Chaperonkomplexes, der aus HSP70, HSP90, sowie den Co-Chaperonen HSP40 und HOP gebildet wird und für die Stabilität, Konformation und Lokalisation des Androgenrezeptors zuständig ist²³ (*siehe Abb. 1.2*). Auch HSP90 kann in weitere Isoformen differenziert werden. Hierbei stellt HSP90 α die induzierbare und HSP90 β die konsekutiv exprimierte Isoform dar, welche in den Proteinanalysen dieser Arbeit separat betrachtet werden.

1.5 Androgenrezeptor (AR)

Der Androgenrezeptor (AR) ist ein Steroidhormonrezeptor und gilt als wichtigster Proliferationsfaktor des PCa. Im inaktiven Zustand wird der AR im Multi-Chaperonkomplex durch interagierende HSPs vor dem proteolytischen Abbau geschützt⁴⁸ (siehe Abb. 1.2). Aktiviert wird der AR durch Bindung von Testosteron bzw. Dihydrotestosteron, transloziert mit Hilfe von HSP27 in den Zellkern und agiert dort als Transkriptionsfaktor an ARE (androgen response elements) für AR-regulierte Gene. Die AR-abhängigen Gene werden transkribiert und vermitteln einen wachstumsfördernden Effekt auf die PCa-Zellen.

Im initialen Krankheitsverlauf ist die Androgendeprivation eine effektive Therapie des PCa (siehe Kap. 1.3 und Abb. 1.1). Mit der Zeit entzieht sich das PCa jedoch diesem Mechanismus und wird resistent gegenüber dem Entzug der Androgene, ein CRPC entsteht. Wichtige Treiber dieser Resistenzmechanismen sind neben verschiedenen HSPs auch die Entwicklung von Mutationen und Splicevarianten des AR, sowie alternative androgenunabhängige Aktivierungen des AR²². Eine Splicevariante des AR, AR-V7, vermittelt beispielsweise die Therapieresistenz des AR-Antagonisten Enzalutamid sowie des Testosteronsynthese-Inhibitors Abirateron und bedingt so einen weiteren Tumorprogress des CRPC⁵¹. Dies zeigt, dass der AR auch im CRPC weiterhin eine treibende Funktion im Tumorgeschehen besitzt und somit einen Angriffspunkt in der Therapie darstellt.

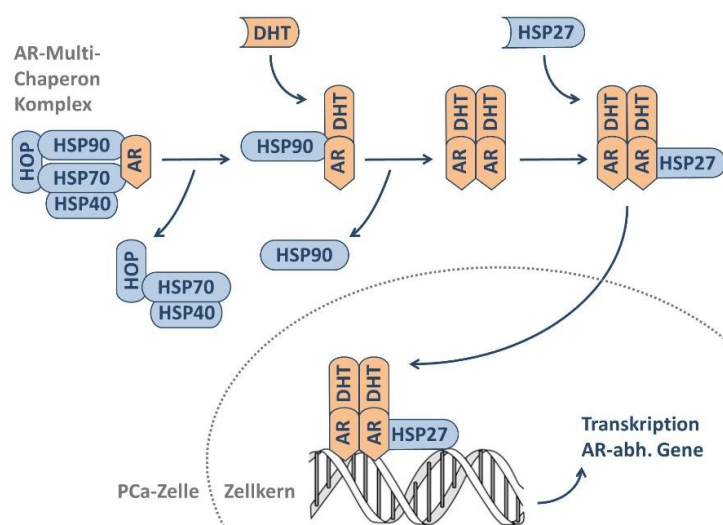


Abbildung 1.2: Die Rolle von HSPs in der Funktion des ARs.

Der Androgenrezeptor (AR) wird durch den Multi-Chaperon-Komplex aus interagierendem HSP90, HSP70 und den Co-Chaperonen HOP und HSP40 intrazellulär stabilisiert. Bei Bindung von Dihydrotestosteron (DHT) löst sich der AR aus dem Komplex, dimerisiert und transloziert mit Hilfe von HSP27 in den Zellkern. Hier kann der AR als Transkriptionsfaktor an ARE (androgen response elements) AR-regulierter Gene binden und deren Transkription initiieren. Modifiziert nach Azad et al.²³

1.6 VER155008 (VER) als HSP70-Inhibitor

VER155008 besitzt eine ATP-ähnliche Struktur und agiert als ‚small molecule inhibitor‘ indem es die ATPase-Aktivität von HSP70 kompetitiv inhibiert⁵². VER155008 bindet hoch spezifisch an die ATP-Bindungsdomäne von HSP70, wobei die Substratbindungsstelle unbeeinflusst bleibt^{52,53}. Es zeigt erst bei sehr hohen Konzentrationen unspezifische Bindungen zu HSP90, welches ebenfalls eine ATP-Bindungsdomäne besitzt, die sich jedoch in der Struktur deutlich unterscheidet (*siehe Abb. 1.3 A*).

Bisherige Studien untersuchten den Einfluss des HSP70-Inhibitors auf Kolon-⁵², Mamma-^{52,53}, Schilddrüsen-⁵⁴ und Lungen-⁵⁵ Karzinomzellen, sowie auf Tumorzellen des Melanoms⁵⁵, Glioms⁵⁶ und Multiplen Myeloms³⁶, wobei ein zytotoxischer Effekt gezeigt werden konnte. Der vielfältige Wirkmechanismus ist in vielen Tumoren jedoch noch ungeklärt. Kita et al. untersuchten kürzlich die Auswirkungen von HSP70-Inhibitoren (Quercetin und VER155008) auf die AR-Expression in LNCaP95-Zellen und konnten eine reduzierte AR-Expression, sowie eine reduzierte Zellproliferation nachweisen²². Bisher wurde jedoch noch keine IC₅₀ in der Behandlung von PCa-Zelllinien mit VER155008 bestimmt.

Bindungsanalysen zeigten die Inhibition sowohl bei der konstitutiv exprimierten Isoform HSC70, als auch bei der stressinduzierte Isoform HSP70-1 durch VER155008⁵³. Da beide Isoformen von HSP70 blockiert werden stellt sich nun die Frage, ob VER155008 nur auf Tumorzellen, oder auch auf gesundes Gewebe einen toxischen Effekt hat. Powers et al. konnten zeigen, dass ein Silencing beider HSP70-Isoformen in nichttumorösen Zelllinien im Vergleich zu Tumorzelllinien keine gleichwertige Wachstumsinhibition oder Induktion der Apoptose bewirkt⁵⁷. Somit könnte eine spezifische HSP70-Inhibition ein vielversprechender Mechanismus in der Tumorthherapie sein. VER155008 zeigt, wie zwei weiteren HSP70-Inhibitoren MKT-007 und PES-Cl, eine tumorzellselektive Zytotoxizität⁵⁵. Eine in-vivo Anwendung von VER155008 in Mäusen zeigte die Anreicherung des Wirkstoffes im Tumorgewebe im Vergleich zum Serum, jedoch waren die Wirkstoffkonzentrationen im Zielgewebe aufgrund einer hohen Clearance niedriger als die vorhergesagte pharmakologische Wirkdosis⁵². Tang et al. nutzten VER155008-Mizellen, um eine bessere Wirkstoffkonzentration in-vivo im Tumorgewebe zu erreichen⁵⁸. Zusammenfassend lässt der spezifische HSP70-Inhibitor VER155008 aufgrund der besonderen Abhängigkeit von HSP70

und dem Zusammenspiel der HSPs im PCa vielversprechende Ansätze auf zytotoxische Effekte in-vitro als auch eine mögliche Anwendung in-vivo zu liefern.

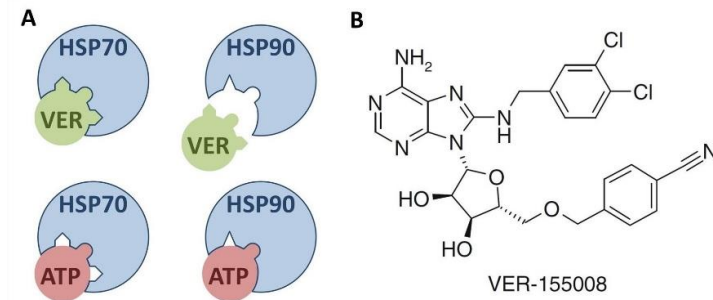


Abbildung 1.3 A: Die Bindung von ATP und VER an HSP70 bzw. HSP90. VER155008 (VER) bindet spezifisch an der ATP-Bindungsdomäne von HSP70. Die ATP-Bindungsdomänen von HSP70 und HSP90 unterscheiden sich strukturell. VER155008 kann nicht spezifisch an HSP90 binden. Schematische Darstellung, selbst konzipiert.

B: Struktur von VER155008⁵⁹.

2 Zielsetzung

Um neue Therapiemöglichkeiten bei kastrationsresistentem Prostatakarzinom (CRPC) zu untersuchen und mehr über die Reaktion der Hitzeschockproteine (HSP) in Tumorzellen zu erfahren, wird in dieser Arbeit der Effekt des HSP70-Inhibitors VER155008 auf Prostatakarzinom- (PCa-) Zellen analysiert. Hierbei soll der wachstumsinhibierende Effekt von VER155008, der bereits in anderen Tumorentitäten beschrieben wurde, im in-vitro Modell des PCa evaluiert werden. Zusätzlich werden die Effekte des HSP70-Inhibitors auf verschiedene interagierende HSPs und den für das PCa entscheidenden Androgenrezeptor (AR) untersucht, um mögliche Wirkmechanismen aufzuzeigen.

Als geeignete Zellkulturmodelle werden in dieser Arbeit die AR-positive LNCaP-Zelllinie sowie die AR-negative PC-3-Zelllinie etabliert. Sie stellen unterschiedliche Stadien der Entwicklung des CRPC dar und geben sowohl Aufschluss über eine AR-abhängige als auch AR-unabhängige Wirkung von VER155008 auf PCa-Zellen. Zur Analyse der VER155008-Wirkung soll die jeweilige Wirkstoffkonzentration mit einem halbmaximalen inhibitorischen Effekt (IC_{50}) in beiden Zelllinien ermittelt werden. Anschließend werden die Effekte der VER155008-Inkubation auf die Expression der HSPs in Proteinanalysen mittels Western-Blot bestimmt. Hierbei liegt der Fokus auf dem VER155008-Zielprotein HSP70, dem interagierenden Chaperon HSP90, sowie HSP40 und HOP, die im Multi-Chaperonkomplex interagieren. Zusätzlich werden die Effekte auf den im PCa wichtigen zytoprotektiven Faktor HSP27, dem Co-Chaperon HSP60 und dem AR, einem zentralen Proliferationsfaktor des PCa, analysiert.

Weitergehend untersucht das aus dieser Forschungsarbeit hervorgegangene Paper von D. Brännert, C. Langer, L. Zimmermann et al. zusätzlich die Auswirkung der VER155008-Behandlung auf den Zellzyklus bzw. Zellzyklusarrest von PCa-Zellen⁶⁰.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugsystem VACUSAFE	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Absaugsystem VACUSIP	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Autoklav VX150	Systec, Wetztenberg
Brutschrank function line	Heraeus Instruments, Hanau
CASY TT Cell Counter and Analyzer 150 µm	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
ChemiDoc XRS+ System	Bio-Rad Laboratories, München
Eismaschine	Manitowoc, Manitowoc (USA)
Elektrophoresesystem Mini-PROTEAN®	Bio-Rad Laboratories, München
Feinwaage ABS 120-4	Kern & Sohn, Balingen
Heizblock QBT1	CLF Laborgeräte, Emersacker
Heracell™ VIOS 160i CO2 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Rockford (USA)
Inkubator Nuaire™	US Autoflow NuAire, Plymouth, USA
Invertierer	VWR International, Darmstadt
Klimageräte (4°C, -20°C, -80°C, -140°C)	Liebherr, Biberach an der Riß
Kühl-/Gefrierkombi Mediline Lcexv 4010	Liebherr, Biberach an der Riß
Lichtmikroskop IT400+	VWR International, Darmstadt
Magnetrührer mit Heizplatte, IKA RCT classic	IKA® -Werke, Staufen
Mikrozentrifuge-Rotilabo	Carl Roth, Karlsruhe
Miniwippe-Schüttler MR1	BioSan, Riga, Lettland
Multipipette® Plus	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter™ FE20 FiveEasy	Mettler Toledo, Schwerzenbach
Pipettierhilfe	pipetus®, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipettierhilfe	peqMATE Peqlab, Erlangen
Plattenleser Infinite® M200 PRO NanoQuant	Tecan Group Ltd, Männedorf
PowerRack™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories, München
Rollenmischer RS-TR05	Phoenix Instrument, Garbsen
SDS-Page Zubehör Mini-PROTEAN® System	Bio-Rad Laboratories, München
Sterilbank HERA safe	Heraeus Instruments, Hanau
Sterilbank safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Rockford (USA)
Tecan readers with i-control microplate reader software / infinite M200 Pro	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Überkopfschüttler Multi Bio RS-24	BioSan, Riga, Lettland
Ultraschallgerät Transsonic 460/H	Elma, Singen
Vortex-Schüttler peqTWIST	VWR PeqLab, Erlangen
Vortex-Schüttler RS-VA10	Phoenix Instrument, Garbsen
Waage EMB 2000-2	Kern&Sohn, Balingen
Wasserbad W14	Granz Instruments, Cambridge, Großbritannien
Western Blot System Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell	Bio-Rad Laboratories, München
Wippschüttler UNITWIST-RT	Armin Baack, Schwerin

Zentrifuge Centrifuge 5417R
 Zentrifuge Centrifuge 5810
 Zentrifuge Micro 120

Eppendorf, Hamburg
 Eppendorf, Hamburg
 Hettich Lab Technology, Tuttlingen

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
15ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
50ml Falcon®	BD Biosciences, Heidelberg
CASY Röhrchen	Roche Innovatis, Reutlingen
Filterpapier	Whatman, Dassel
Filterspitzen SafeSeal Tips Professional	VWR, Leuven, Belgien
Gewebekulturflasche 75cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Glaspasteurpipette	VWR International, Darmstadt
Kapillarspitze MultiFlex Round Tip	BioScience, Salt Lake City, USA
Magermilchpulver	Sucofin®, Zeven
Mikrotiterplatte, 96-Well transparent	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Nitrilhandschuhe Micro-Touch® Nitra-Tex®	Ansell Healthcare, Brüssel, Belgien
Nitrozellulosemembran PROTEANTM 0,2µm	Whatman, Dassel
Parafilm	Bemis, Nennah (USA)
Pipettensatz 0,5-1000µl	Biohit, Proline, Göttingen
Pipettensatz 0,5-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 0,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 2ml, SafeSeal	Sarstedt, Nümbrecht
Schutzhandschuhe Sterling Nitrile KC300	Kimberly-Clark, Roswell, USA
Serologische Pipette 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatte CELL+ 6 Well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatte CELL+ 24 Well	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.3 Chemikalien und kommerzielle Lösungen

Chemikalie	Hersteller
1,4,-Dithiothreitol	Carl Roth, Karlsruhe
1-Bromo-3-Chloropropan	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Feinchemie K.-H. Kallies KG, Sebnitz
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt

Complete™ Mini, EDTA-frei	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie® Brilliant Blue G250	Fluka, Buchs (Schweiz)
D(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe
Desoxycholsäure Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol-2-phosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Konservierer für Wasserbäder	Carl Roth, Karlsruhe
Luminol Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
ortho-Phosphorsäure H ₃ PO ₄	Carl Roth, Karlsruhe
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau-S	Carl Roth, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Thioharnstoff	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Triton® X-100	Ferak, Berlin
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin, Sequencing Grade	Promega, Madison, USA
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth, Karlsruhe

kommerzielle Lösung

Hersteller

10x Roti-Block Konzentrat	Carl Roth, Karlsruhe
Page Ruler Restained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
SuperSignal® West Dura	Thermo Scientific, Rockford, USA

3.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Herstellung
10% SDS	10% w/v SDS-Pellets
10× Laufpufferstocklösung	192mM Glycin; 24,8 mMTris; pH 8,3
1× SDS-Laufpuffer	10% v/v 10×Laufpufferstocklösung; 0,1% v/v 10 %SDS
10x DPBS	1,37M NaCl; 26,8mM KCl; 101,1mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; 17,6mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
1x Roti-Block Lösung	10% v/v 10x Roti-Block Konzentrat
10× TBS	0,2M Tris; 1,5M NaCl; pH 7,6
1x TBS-T	10% v/v 10× TBS; 0,1% v/v Tween20
5× Proteinladepuffer	156mM Tris, pH 6,8; 25% v/v Glycerol; 5%v/v SDS; 12,5% v/v β-Meraptoethanol; 0,2% w/v Bromphenolblau
Ampicillin-Stocklösung	50mg Ampicillin in 1ml A.bidest
Antikörperlösung	5% w/v BSA; 10% v/v 10× TBS; 0,001% v/v Tween20; NaN ₃
Bradford-Reagenz	10% w/v Coomassie® Brilliant Blue G250; 5% v/v Ethanol; 8,5% v/v H ₃ PO ₄
BSA-Standard	100% w/v BSA in A.bidest
CASY Ton	154mM NaCl; 0,1mM EDTA in A.bidest
ECL-Lösung A	25% w/v Luminol Natriumsalz in 0,1M Tris, pH 8,6
ECL-Lösung B	110% w/v para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO
Elutionspuffer	200mM Glycin; 0,2% w/v SDS; 0,1% v/v Tween 20 in 100mM Tris-HCl; pH 6,8
Milchblock-Lösung	5ml 1x TBS-T, 5g Magermilchpulver
PBS mit CaCl ₂ und MgCl ₂	96,9mg CaCl ₂ ; 50mg MgCl ₂ in DPBS
Poly-L-Lysin Lösung	0,01% w/v Poly-L-Lysin in sterilem A.bidest
Ponceau-S Färbelösung	0,2% w/v Ponceau S; 3% v/v Trichloressigsäure
RIPA Gebrauchslösung	67% v/v RIPA-Stammlösung; 1mM SV; 20mM NaF; 20mM Glycerol-2-phosphat; 20% w/v Complete™ Mini EDTA-frei
RIPA Stammlösung	50mM Tris, pH 7,5; 5mM EDTA, pH 8,0; 150mM NaCl; 10mM K ₂ HPO ₄ ; 10% v/v Glycerol; 1% v/v Triton X-100; 0,05% v/v SDS
Sammelgelpuffer	0,5M Tris, pH 6,8
Sekundärantikörperlösung	10% v/v Rotiblock 10× Konzentrat in A.bidest
TE-Puffer	10mM Tris-HCl; 1mM EDTA
Transferpuffer	20% v/v Methanol; 10% v/v 10× Laufpufferstocklösung
Trenngelpuffer	1,5M Tris, pH 8,8

3.1.5 Antikörper

Primärantikörper	Gebrauchs- verdünnung	Hersteller
Anti-AR-XP™ rabbit	1:10 000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
Anti-GAPDH rabbit	1:10 000	Cell Signaling Technology, Inc.
Anti-HOP rabbit	1:1 000	Cell Signaling Technology, Inc.
Anti-HSP27 mouse	1:5 000	Cell Signaling Technology, Inc.
Anti-HSP40 rabbit	1:3 000	Cell Signaling Technology, Inc.
Anti-HSP60 rabbit	1:15 000	Cell Signaling Technology, Inc.
Anti-HSP70 rat	1:3 000	Cell Signaling Technology, Inc.
Anti-HSP90α rabbit	1:5 000	Cell Signaling Technology, Inc.
Anti-HSP90β rabbit	1:3 000	Cell Signaling Technology, Inc.

Sekundärantikörper	Gebrauchs- verdünnung	Hersteller
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	1:5 000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
Anti-mouse IgG, HRP-linked AB	1:5 000	Cell Signaling Technology, Inc.
Anti-rat IgG, HRP-linked AB	1:5 000	Cell Signaling Technology, Inc.

3.1.6 Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
LNCaP (Metastatic Lesion of Prostate Adenocarcinoma)	American Type Culture Collection, Manassas, USA
PC-3 (Prostate Adenocarcinoma)	American Type Culture Collection, Manassas, USA

3.1.7 Zellkultur: Medien und Zusätze

Produkt	Hersteller / Herstellung
10× Trypsin-EDTA 0,5/0,2% in DPBS	PAN Biotech, Aidenbach
2x Trypsin/EDTA DPBS	20% v/v 10×Trypsin/EDTA in DPBS PAN Biotech, Aidenbach
Einfriermedium	70% v/v RPMI 1640 mit Phenolrot; 20% v/v FCS; 10% v/v DMSO
Fetales Rinderserum (FBS)	PAN Biotech, Aidenbach
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach; 10000U/ml Penicillin; 10mg/ml Streptomycin
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim

Pyruvat	PAN Biotech, Aidenbach
RPMI 1640 mit Phenolrot	PAN Biotech, Aidenbach
VER155008	Tocris, Bristol, Großbritannien
Vollmedium (RPMI+++)	1% Penicillin/Streptomycin; 1% Pyruvat; 10 %FCS (hitzeinaktiviert) in RPMI 1640 mit Phenolrot

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Lagerung und Auftauen der Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Prostatakarzinomzellen PC-3 und LNCaP wurden zur dauerhaften Lagerung bei -140°C kryokonserviert. Hierbei wurden jeweils 3×10^6 Zellen einer niedrigen Passage in Isopropanol gelagert und diese für die im Folgenden beschriebenen Experimente aufgetaut.

Zur Konservierung wurden die Zellen mittels Trypsinbehandlung aus den Zellkulturgefäßen gelöst, in Vollmedium resuspendiert und anschließend bei 1000U/min für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Zellpellet in 3ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels CASY TT Cell Counter bestimmt (*siehe 3.2.4*), jeweils 3×10^6 Zellen in die mit Isopropanol gefüllten Kryo-Röhrchen gegeben und zur dauerhaften Lagerung bei -140°C eingefroren.

Zum Auftauen wurden die Zellen schonend bei 37°C erwärmt, anschließend in 3ml Vollmedium resuspendiert und erneut bei 1000 U/min für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Zellpellet in 3ml Vollmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit weiteren 17ml Vollmedium in eine T75-Zellkulturflasche gegeben und diese im Brutschrank bei 37°C , 5% CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit gelagert. Täglich wurde die Konfluenz der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert und bei einer ca. 80%-igen Konfluenz mit frischem Zellkulturmedium passagiert (*siehe 3.2.2*). Sowohl bei PC-3- als auch bei LNCaP-Zellen wurden für die Experimente ausschließlich Zellen der Passagen 8 bis 30 verwendet.

3.2.2 Kultivieren und Passagieren der Zellen

Das Passagieren der Zellen erfolgte ca. zweimal wöchentlich, nachdem die Konfluenz der Zellen in der T75-Zellkulturflasche lichtmikroskopisch beurteilt wurde. Hierfür wurde unter der Sterilbank das Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und der Flaschenboden anschließend mit 10ml DPBS gewaschen, um nicht anhaftende Zellen zu entfernen. Zum Lösen der anhaftenden Zellen wurde 1ml 2xTrypsin hinzugegeben, 3min bei 37°C inkubiert und die nun gelösten Zellen in ein Falcon überführt. Anschließend wurde die T75-Zellkulturflasche mit Medium gespült, um verbleibende Zellreste ebenfalls ins Falcon zu überführen. An dieser Stelle konnte die Zellzahl der Zellsuspension in Zellen/ml mittels CASY TT Cell Counter bestimmt werden (*siehe 3.2.4*).

Bei PC-3-Zellen wurde die Zellsuspension im Falcon durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vereinzelt, um optimale Wachstumsverhältnisse in der neuen Zellkulturflasche zu ermöglichen. PC-3-Zellen wurden im Verhältnis 1:3 bis 1:10 umgesetzt, hierbei wurden aus dem Falcon mit 3ml bzw. 10ml Zellsuspension in Medium jeweils 1ml in eine neue T75-Zellkulturflasche gegeben, in der 19ml Wachstumsmedium bereits vorgelegt wurden.

Bei LNCaP-Zellen wurde die Zellsuspension im Falcon bei 1000 U/min für 5min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in neuem Medium resuspendiert um die Zellverbände zu vereinzeln. Hierbei wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 bis 1:6 umgesetzt, d.h. das Zellpellet wurde in 3ml bzw. 6ml Medium resuspendiert und von der Zellsuspension jeweils 1ml in eine neue T75-Zellkulturflasche gegeben, in der 19ml Wachstumsmedium bereits vorgelegt wurden.

3.2.3. Aussaat und Behandlung der Zellen mit VER155008 bzw. der Kontrollgruppe

Die verschiedenen Versuchsansätze erforderten ein Wachstum der Zellen in unterschiedlichen Zellkulturgefäßen. Für die Wachstumskinetiken der PCa-Zellen wurden 24-Well-Platten verwendet, wohingegen die Kultivierung der Zellen für die Proteinanalysen in 6-Well-Platten mit größerem Volumen durchgeführt wurde. Die ausgesäten Zellzahlen wurden ausgewählt, sodass bei einem sigmoidalen Wachstum über den geplanten Versuchszeitraum keine Wachstumsinhibition durch zu hohe Konfluenz bzw. Nährstoffmangel zu erwarten war.

Vor dem Aussäen wurden die Zellkulturplatten mit Poly-L-Lysin Lösung beschichtet und getrocknet. Für die durchgeführten Wachstumskinetiken wurden in die 24-Well-Platten jeweils 10.000 Zellen/Well der PC-3-Zelllinie und je 20.000 Zellen/Well der LNCaP-Zelllinie ausgesät. Für die Proteinanalysen wurden in die 6-Well-Platten mit jeweils 150.000 Zellen/Well von PC-3 bzw. 450.000 Zellen/Well LNCaP ausgesät. Nach dem Aussäen wurden die Zellkulturplatten für 24h in den Brutschrank gegeben, sodass die Zellen am beschichteten Plattenboden anwachsen konnten.

Am Tag nach dem Aussäen erfolgte die Behandlung der nun angewachsenen Zellen in den Wells der Zellkulturplatten. Für die Wirkstoffgruppe wurde das Wachstumsmedium mit VER155008, gelöst in DMSO, versetzt; das Wachstumsmedium der Kontrollgruppe lediglich mit DMSO. Hierbei wurde darauf geachtet, dass jeweils die gleichen Volumina von DMSO bzw. VER155008 gelöst in DMSO zum Wachstumsmedium hinzugefügt wurden, um einen möglichen zytotoxischen Effekt von DMSO herauszufiltern. Der Wirkstoff wurde zu Versuchsbeginn aus den jeweils angefertigten Stammlösungen mit Wachstumsmedium auf die berechnete Arbeitskonzentration im Verhältnis 1:1000 verdünnt, beim Kontrollansatz wurde jeweils die äquivalente Menge DMSO zum Vollmedium hinzugefügt. Für die Ansätze der Wirkstoffgruppe der PC-3-Zellen wurde hierfür eine 3mM VER155008-Gebrauchslösung hergestellt und diese im Verhältnis von 1:1000 mit dem frischen Wachstumsmedium versetzt (1µl VER155008-Gebrauchslösung in 1ml Wachstumsmedium). Die Wirkstoffkonzentration für PC-3-Zellen betrug im Medium somit 3µM VER155008. Das Wachstumsmedium der Wirkstoffgruppe der LNCaP-Zellen wurde mittels einer 10mM VER155008-Gebrauchslösung hergestellt, welches ebenfalls im Verhältnis 1:1000 mit dem frischen Wachstumsmedium versetzt wurde. Die Wirkstoffkonzentration für LNCaP-Zellen betrug im Medium somit 10µM VER155008.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die IC_{50} von VER155008 bei PC-3- und LNCaP-Zellen bestimmt und anschließend die ermittelten Werte (3µM bei PC-3 und 10µM bei LNCaP, (siehe 4.1)) für die Proteinanalysen beider Zelllinien verwendet.

Bei der Behandlung der Zellen wurde das Wachstumsmedium vom Vortag unter der Sterilbank vorsichtig von den angewachsenen Zellen abgesaugt und das frisch angesetzte Medium mit enthaltenem VER155008 bzw. DMSO in jeweils gleichen Volumina in die Wells gegeben.

3.2.4. Ernte der Zellen und Zellzahlbestimmung mittels CASY TT Cell Counter

Die Ernte erfolgte nach Wirkstoffbehandlung alle 24h, bei den Wachstumskinetiken sechs Tage lang und bei den Ansätzen für die Proteinanalyse drei Tage lang. Für die Ernte wurde unter der Sterilbank das Medium abgesaugt, jeweils 500µl 2x Trypsin in die Wells gegeben und für 3min bei 37°C inkubiert. Die nun gelösten Zellen wurden in ein Eppendorf-Tube überführt und die restlichen Zellen in zwei Waschschritten mittels 500µl PBS und fünfmaligem Resuspendieren aus den Wells gelöst und ebenfalls hinzugegeben. Bei der Ernte der 24-Well-Platten wurde eine Zellzählung für die Wachstumskinetik angeschlossen, bei der Ernte der 6-Well-Platten wurden die Proben zur Proteinanalyse weiter aufgearbeitet (*siehe 3.3*).

Die Zellzahl der Zellsuspension wurde mit Hilfe des CASY TT Cell Counter (kurz: CASY) bestimmt. Zur Zellzählung der Wachstumskinetikansätze wurden aus der frisch geernteten 1,5ml-Zellsuspension 100µl entnommen, in das CASY-Cup mit 10ml CASY-Ton gegeben und 10-mal resuspendiert. Der CASY-Cup mit der verdünnten Zellsuspension wurde dreimal invertiert und anschließend direkt in den CASY Cell Counter eingespeist, um die Zellzählung vorzunehmen. Hierfür wurde das Gerät auf die jeweiligen Zelllinien geeicht und eine dreifache Messung der Zellzahl durchgeführt, wonach der Mittelwert bestimmt wurde. Das Ergebnis des CASY Cell Counters gibt die Zellzahl/ml der verdünnten Zellsuspension im CASY-Cup an und wurde entsprechend des vorherigen Suspensionsverhältnisses mit dem entsprechenden Faktor multipliziert, um die Zellzahl im Falcon zu berechnen.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Protein-Isolierung mittels RIPA-Lyse

Die Isolierung des Gesamtproteins der PCa-Zellen erfolgte mittels RIPA-Lysepuffer. Hierzu wurde die frisch geerntete Zellsuspension (*siehe 3.2.4*) bei 5000U/min für 5min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 30-50µl RIPA-Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch 20 Ultraschallstöße bei 0,5Cycle und einer Amplitude von 50% aufgeschlossen und das entstandene Zelllysate bei -20°C eingefroren und zur späteren Analyse aufbewahrt.

3.3.2 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Um in den Western Blots eine Vergleichbarkeit der Proteinmengen zu gewährleisten wurde die Proteinkonzentration der Proben nach Bradford bestimmt. Grundlage der Proteinbestimmung nach Bradford ist die Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 an Aminosäurereste der Proteine, welche dadurch eine Änderung des Absorptionsmaximums von 470nm auf 595nm bewirkt. Als Referenz wurde eine Verdünnungsreihe eines definierten Proteinstandards (BSA) angefertigt (*siehe Tab. 3.1*) und daraus eine Eichreihe erstellt. Zur Konzentrationsbestimmung der Proben wurden im doppelten Ansatz jeweils 18µl A.bidest und 2µl des Zelllysats (*aus 3.3.1*) mit 300µl Bradford-Reagenz zusammen gegeben. Die Eichreihe sowie die Proben wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert, die nach Zugabe der Bradford-Reagenz für 15min im Dunkeln inkubiert wurde. Anschließend wurde mittels Tecan Reader die Extinktion der Protein-Bradford-Reagenz-Mischungen bei 595nm und einer Referenzwellenlänge von 360nm gemessen. Die erfolgten Doppelbestimmungen der Eichreihe und der Proben wurden mittels geeigneter Software (i-control microplate reader) in ein Verhältnis gesetzt und anschließend die Proteinkonzentration der Zelllysate anhand der Eichkurve bestimmt.

Tabelle 3.1: Pipettierschema zur Proteinbestimmung nach Bradford-Eichreihe

Eichreihe	BSA [µg]	BSA (0,2µg/µl) in H ₂ O gelöst [µl]	A. bidest [µl]	Bradford Reagenz [µl]
1	Leerwert	0	20	300
2	0,4	2	18	300
3	0,8	4	16	300
4	1,2	6	14	300
5	1,6	8	12	300
6	2,0	10	10	300
7	2,4	12	8	300
8	2,8	14	6	300
9	3,6	18	2	300

3.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wird verwendet, um Proteingemische anhand ihres Molekulargewichts aufzutrennen, um somit einzelne Proteine besser analysieren zu können. Die Auftrennung der Proteine erfolgt hierbei ausschließlich anhand der Proteingröße. Kleinere Proteine

können dem Stromgradienten folgend schneller durch die porenartige Struktur des Gels wandern und befinden sich am Ende der Auftrennung näher an der Anode als größere Proteine. Das negativ geladene Sodiumdodecylsulfat besitzt eine stark denaturierende Wirkung, bindet an die Proteine und maskiert damit die Eigenladung der einzelnen Aminosäurereste, sodass diese keinen Einfluss auf die Laufeigenschaften im Gel haben.

Zur Herstellung der Polyacrylamid-Gele, welche aus einem unten liegenden 10%-igen Trenngel und einem oberen 5%-igen Sammelgel bestehen, wurde eine Apparatur des Bio-Rad Gel System verwendet. Das großporige Sammelgel ermöglicht den Proteinen einen schnellen Durchtritt zu Beginn der Elektrophorese. Die Proteine sammeln sich am Übertritt zum feinporigen Trenngel, bevor sie durch eine Erhöhung der angelegten Spannung weiter wandern können. Hiermit wird eine zeitgleiche Auftrennung des Proteingemisches im Trenngel gewährleistet. Zuerst wurden zwei Glasplatten in die Apparatur eingespannt, das Trenngel laut Pipettierschema hergestellt (*siehe Tab. 3.2*) und zwischen die Glasplatten gegeben. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel laut Pipettierschema hergestellt (*siehe Tab. 3.2*), über dem Trenngel verteilt und mittels eines Kamms zehn Taschen für die späteren Proben eingefügt. Nach Verfestigung des Gels durch erneute Polymerisation wurden sie direkt verwendet oder eingewickelt in feuchtem Zellstoff bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 3.2: Pipettierschema der SDS-Gele

	5 % Sammelgel	10 % Trenngel
A. bidest	2.1 ml	2.4 ml
Sammelgelpuffer	0.375 ml	-
Trenngelpuffer	-	1.5 ml
30 % Acrylamid	0.5 ml	2.0 ml
10 % SDS	30 µl	60 µl
10 % APS	30 µl	60 µl
TEMED	3 µl	6 µl

Für die Gelelektrophorese wurde das Bio-Rad Mini PROTEAN® System mit 1x SDS Laufpuffer verwendet, wobei maximal vier Gele gleichzeitig laufen konnten. Zur Vorbereitung der Proben wurden Zelllysate (*aus 3.3.1*), A.bidest und 5x Ladepuffer in definierten Verhältnissen zusammengegeben, um die gewünschte Proteinkonzentration in der Probe zu erreichen.

Hierbei betrug das Volumen der einzelnen Proben jeweils 20µl wobei im Zellysat jeweils bis zu 500µg Protein enthalten waren. Anschließend wurden die Proben für 5min bei 95°C denaturiert, zentrifugiert und auf Eis gestellt, bevor sie dann in die Gelkammern appliziert wurden (*siehe Tab. 3.3*). Als Marker (M) diente der Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, wovon 4µl mit 16µl 1xLP in die Tasche gegeben wurden. Freie Taschen wurden mit 20µl 1x Ladepuffer (LP) befüllt, um ein gleichmäßiges Wandern der Ionen im Gel gewährleisten zu können. Nach Befüllen der Taschen wurde für 15min zu Beginn eine Spannung von 80V angelegt, damit sich die Proteine im Sammelgel gleichmäßig aufkonzentrieren konnten. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine im Trenngel bei 130V für ca. 100 min.

Tabelle 3.3: Beladungsschema der Taschen für die SDS-PAGE

Abkürzungen: 1x Ladepuffer (LP), Marker (M), Kontrolle (CON), VER155008 (VER)

Tasche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Inhalt	LP	M	CON 24h	VER 24h	CON 48h	VER 48h	CON 72h	VER 72h	LP	LP

3.3.4 Western Blotting, Immunfärbung und Detektion

Um die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteingemische einer weiteren Analyse zugänglich zu machen, wurden sie durch das Western Blotting Verfahren auf eine adsorbierende Membran übertragen. Hierfür wurde eine Nitrozellulosemembran verwendet, welche Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen bindet und sie für Protein- und Immunfärbungen gut verfügbar macht. Als Blotsystem diente der Semi-Dry-Blot, bei dem die Nitrozellulosemembran mit dem darauf liegenden Polyacrylamid-Gel von jeweils vier Lagen Filterpapier umschlossen wurden, welche in Transferpuffer getränkt waren. Geblottet wurde im Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell für eine Stunde mit einer Stromstärke von 0,06A pro Membran. Im Anschluss folgte zur Überprüfung des Proteintransfers eine Darstellung der Proteinbanden mittels Ponceau-S-Färbelösung. Die Membranen wurden anschließend mittels 1x TBS-T wieder entfärbt und für 1-3 Stunden auf dem 4°C-Invertierer blockiert. Durch den Block wurden die freien Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran besetzt. Nach erfolgtem Block wurden die Membranen einmalig mit 1x TBS-T gewaschen und anschließend über Nacht mit den primären Antikörpern, gelöst in AK-Lösung in entsprechender Verdünnung im 4°C-Invertierer inkubiert.

Die Immunfärbung mittels primärer und sekundärer Antikörper dient der Detektion und Darstellung spezifischer Proteine. Der primäre Antikörper (bspw. Anti-HSP70) bindet hierbei durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion an ein spezifisches Protein (bspw. HSP70) auf der Nitrozellulosemembran. Der enzymgekoppelte sekundäre Antikörper (bspw. anti-rat) bindet wiederum am primären Antikörper und kann durch eine biochemische Reaktion der Detektionslösung nachgewiesen werden. Nach erfolgter Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Membranen am nächsten Tag dreimal für 5min mit 1x TBS-T gewaschen, um überschüssigen Antikörper abzunehmen. Anschließend wurden die Membranen für 1 Stunde mit dem sekundären Antikörper, gelöst in 1x Roti-Block im Verhältnis 1:5000 (1µl AK in 5ml 1x Roti-Block) auf dem 4°C-Invertierer inkubiert. Anschließend erfolgte erneut ein dreimaliger Waschschrift mit 1x TBS-T für jeweils 5min.

Als Detektionslösung wurde SuperSignal® West Dura Lösung verwendet, welche in gleichen Teilen (je 100–300µl von Solution A & B) für 3-5min über die Membran gegeben wurde. Die Detektion erfolgte mittels Densitometrie im ChemiDoc XRS+ mit einer Expositionszeit zwischen 10sec und 1h, abhängig vom detektierten Protein. Die detektierten Signale wurden mittels Image Lab™ Software Version 3.0 quantifiziert. Nach abgeschlossener Detektion wurden die Membranen einmalig in 1x TBS-T gewaschen und erneut im 1x Roti-Block für 1 Stunde auf dem 4°C-Invertierer invertiert. Nach erfolgter Blockierung und einem erneuten Waschschrift mit 1x TBS-T wurden die Membranen über Nacht mit dem neuen primären Antikörper inkubiert. Nach maximal drei Detektions-Wiederholungen wurden die Membranen zuletzt mittels anti-GAPDH-AK auf das Housekeeping-Protein GAPDH detektiert. GAPDH diente in diesen Versuchen als Referenz und Ladungskontrolle der Western Blots. Aus Zellkulturansätzen von PC-3- und LNCaP-Zellen wurden Proteinanalysen von HSP27, HSP40, HSP60, HOP, HSP70, HSP90α, HSP90β und AR durchgeführt.

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit Microsoft® Excel 2010. Alle Experimente wurden mit dem ungepaarten Student's t-Test ausgewertet und statistische Signifikanz mit $p \leq 0,05$ (*) $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) angenommen.

Die Abbildungen der Daten stellen repräsentative Ergebnisse oder Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung, angegeben in $MW \pm SD$ dar. Wenn in der Abbildungsunterschrift nicht anders beschrieben stellen die Ergebnisse die Auswertung von mindestens fünf unabhängigen Versuchen dar ($n=5$). Die Abbildungen wurden mittels Microsoft® Excel 2010 und Microsoft® PowerPoint 2010 erstellt.

Bei den Western Blots diente zur Quantifizierung der Signale GAPDH als Ladekontrolle. Die jeweiligen untersuchten Proteinsignale wurden auf die GAPDH-Ladekontrolle als Referenzprotein normiert.

4. Ergebnisse

4.1 Bestimmung des halbmaximalen inhibitorischen Effekts (IC_{50}) von VER155008 auf PCa-Zellen

Die Behandlung der PCa-Zellen der PC-3- und LNCaP-Zellkulturen mittels VER155008 zeigte einen konzentrationsabhängigen, wachstumsinhibierenden Effekt. Zur Bestimmung der IC_{50} wurden bei PC-3-Zellen Konzentrationen zwischen 0,1–30 μ M VER155008 und bei LNCaP-Zellen Wirkstoffkonzentrationen von 1–50 μ M getestet. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) beschreibt den halbmaximalen Effekt eines Wirkstoffes in vitro und gibt somit Auskunft über dessen Wirkstärke. Die IC_{50} wurde mittels Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelt, bei denen das Zellwachstum der VER155008-Wirkstoffgruppe mit der DMSO-Kontrollgruppe in Wachstumskinetik-Kurven verglichen wurde.

Für die PC-3-Zelllinie konnte eine IC_{50} von 3 μ M VER155008 ermittelt werden, welche im Vergleich zu Konzentrationen von 1 μ M und 15 μ M ein näherungsweise 50%iges Wachstum der PC-3-Zellen unter reiner DMSO-Behandlung bewirkte (*siehe Abb. 4.1 A*). Nach 72h Inkubationszeit mit VER155008 zeigt sich hierbei eine durchschnittliche Zellzahl von $0,4 \times 10^5$ Zellen, wobei die Kontrollgruppe bei $0,8 \times 10^5$ Zellen lag. Die Zellzahlentwicklung der Kontrollgruppe, die lediglich mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt wurde, zeigte ein annähernd exponentielles Wachstum. Die Auswirkung des Wachstums durch VER155008 im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe zeigte zu allen gemessenen Zeitpunkten eine statistisch signifikante Inhibition ($p \leq 0,001$).

Im LNCaP-Zellkulturmodell wurde mittels Proliferationsassay eine IC_{50} von 10 μ M VER155008 ermittelt, welche im Vergleich zu Wirkstoffkonzentrationen von 5 μ M und 20 μ M ein halbmaximales Wachstum der Zellen unter reiner DMSO-Behandlung zeigte. Nach 72h Inkubationszeit mit VER155008 gelöst in DMSO bzw. reinem DMSO-Lösungsmittel lag die Zellzahl bei $0,6 \times 10^5$ bzw. $0,4 \times 10^5$ respektive, wobei erneut ein statistisch signifikanter Unterschied ($p \leq 0,001$) ermittelt wurde (*siehe Abb. 4.1 B*). Auch bei LNCaP-Zellen zeigt die Kontrollgruppe unter DMSO-Behandlung ein exponentielles Wachstum.

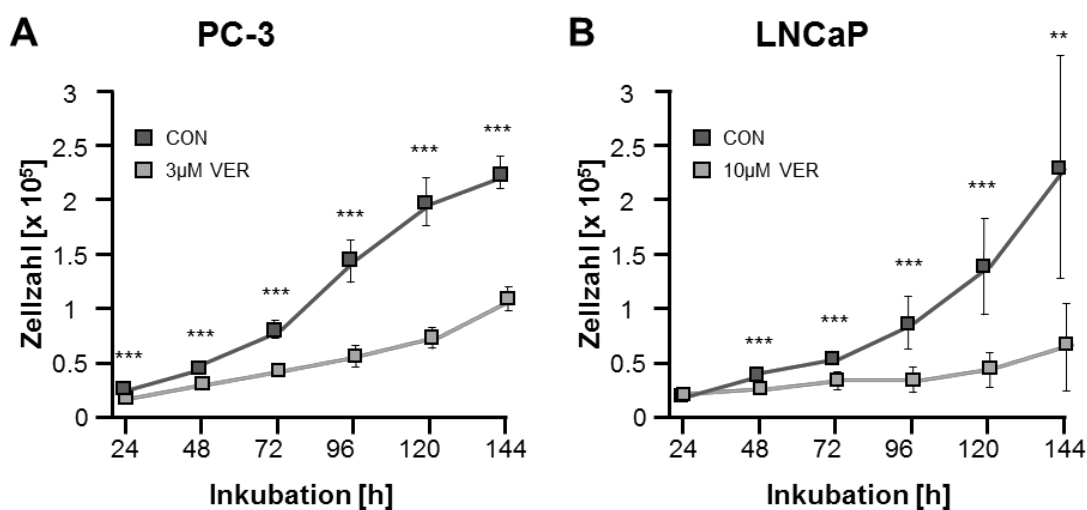


Abbildung 4.1: Wachstumskinetik von PC-3- und LNCaP-Zellen unter VER155008-Behandlung. Inhibition von PC-3- (**A**) und LNCaP-Zellen (**B**) in Anwesenheit von 3µM (PC-3) und 10µM (LNCaP) VER155008, gelöst in DMSO. Die Kontrollgruppe wurde ausschließlich mit DMSO behandelt. Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum von 144h bestimmt und alle 24h gemessen. Die Ergebnisse stammen aus mind. 5 unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert \pm SD der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test ausgewertet und statistische Signifikanz mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) angenommen.

4.2 Proteinanalyse der Hitzeschockproteine (HSPs) in LNCaP- und PC-3-Zellen unter VER155008-Inkubation

Hitzeschockprotein HSP27

Unter VER155008-Behandlung zeigte sich in beiden Zelllinien eine signifikante Suppression der Expression des zytoprotektiven HSP27. PC-3-Zellen zeigten zu allen Zeitpunkten eine hoch signifikante Abnahme um ca. ein Drittel der relativen HSP27-Expression unter Wirkstoffbehandlung im Vergleich zum Kontrollansatz (24h: $0,26 \pm 0,29$ $p=0,0004$; 48h: $0,41 \pm 0,33$ $p=0,0000$; 72h: $0,32 \pm 0,26$ $p=0,0000$) (siehe Abb. 4.2 A+B). Ein ähnliches und statistisch signifikantes Bild zeigte sich im Ansatz der LNCaP-Zellen bis zu einem Zeitpunkt von 48h mit einer Suppression von HSP27. Nach 72-stündiger Behandlung mit VER155008 stieg die relative Expression von HSP27 leicht an, was jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (24h: $0,46 \pm 0,28$ $p=0,0000$; 48h: $0,61 \pm 0,28$ $p=0,0006$; 72h: $1,32 \pm 0,62$ $p=0,1141$) (siehe Abb. 4.2 C+D).

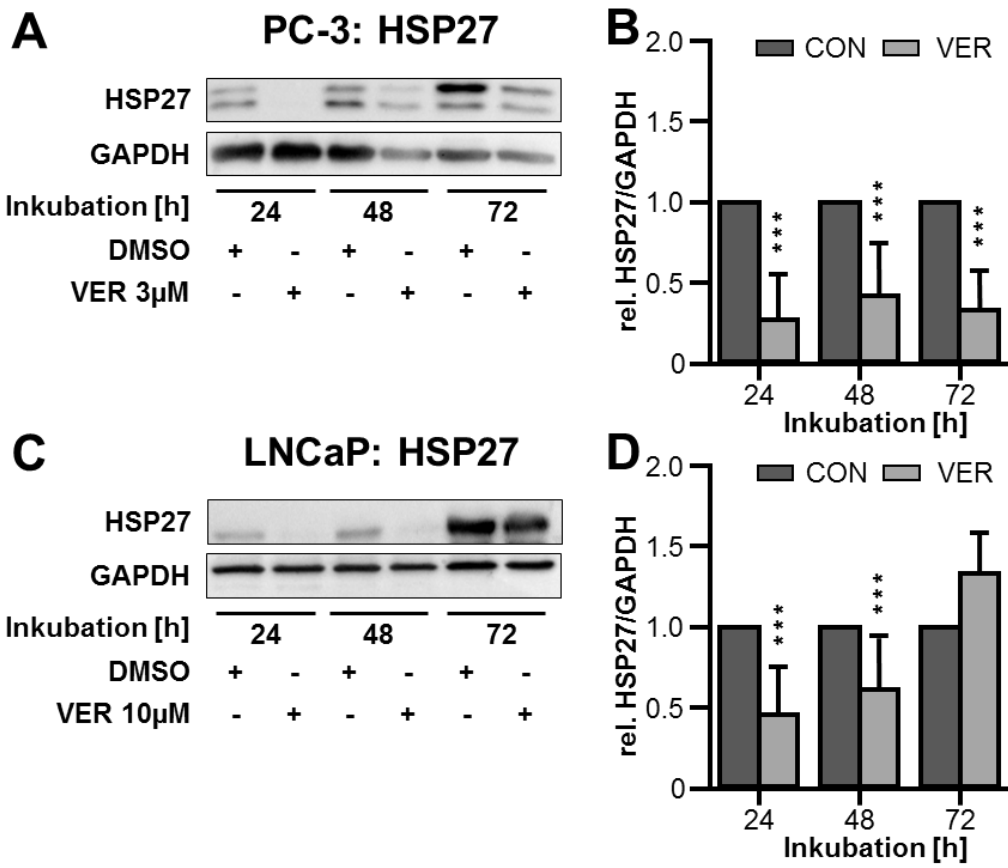


Abbildung 4.2: Western Blot Analysen von HSP27 in PC-3- und LNCaP-Zellen unter VER155008-Behandlung.

PC-3- (A+B) und LNCaP-Zellen (C+D) inkubiert mit 3µM (PC-3) und 10µM (LNCaP) VER155008, gelöst in DMSO über einen Zeitraum von 72h. Die Kontrollgruppe (CON) wurde ausschließlich mit DMSO behandelt. Western Blot Analyse (A+C) und Quantifizierung (B+D) von mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD der relativen Expression von **HSP27**, normiert auf die DMSO-Kontrolle (CON)=1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test ausgewertet und statistische Signifikanz mit $p \leq 0,05$ (*) $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) angenommen.

Hitzeschockprotein HSP40

Die HSP40-Proteinanalyse zeigte sowohl bei PC-3- als auch bei LNCaP-Zellen keine signifikant geänderte HSP40-Expression bei Behandlung mit VER155008 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (siehe Abb. 4.3 A+B). Bei PC-3-Zellen wurden über einem Zeitraum von 72h eine relative HSP40-Expression von $0,88 \pm 0,32$ bis $1,10 \pm 0,47$ festgestellt. Im LNCaP-Ansatz schwankte die relative HSP40-Expression ähnlich zwischen $0,80 \pm 0,46$ und $1,12 \pm 0,59$ (siehe Abb. 4.3 C+D).

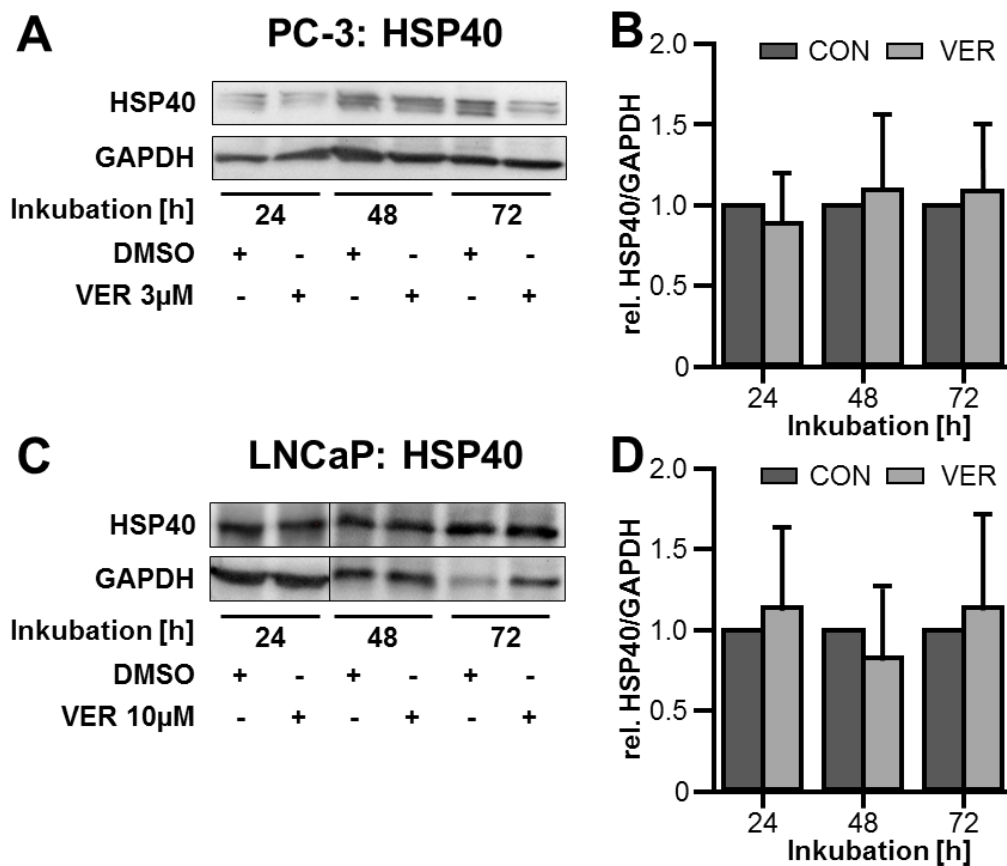


Abbildung 4.3: Western Blot Analysen von HSP40 in PC-3- und LNCaP-Zellen unter VER155008-Behandlung.

PC-3- (A+B) und LNCaP-Zellen (C+D) inkubiert mit 3µM (PC-3) und 10µM (LNCaP) VER155008, gelöst in DMSO über einen Zeitraum von 72h. Die Kontrollgruppe (CON) wurde ausschließlich mit DMSO behandelt. Western Blot Analyse (A+C) und Quantifizierung (B+D) von mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD der relativen Expression von HSP40, normiert auf die DMSO-Kontrolle (CON)=1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test ausgewertet und statistische Signifikanz mit $p \leq 0,05$ (*) $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) angenommen.

Hitzeschockprotein HSP60

Eine Behandlung mit VER155008 bewirkte in beiden Tumorzelllinien keine signifikante Änderung der relativen HSP60 Expression innerhalb von 72h. In PC-3-Zellen schwankte die HSP60 Expression von $0,73 \pm 0,40$ bis $1,24 \pm 0,78$ im Vergleich zum Kontrollansatz (siehe Abb. 4.4 A+B). Die Ansätze der LNCaP-Zellen zeigten ein vergleichbares Bild mit HSP60-Expressionswerten von $0,72 \pm 0,48$ bis $1,29 \pm 0,57$ innerhalb des Inkubationszeitraumes von 72h (siehe Abb. 4.4 C+D).

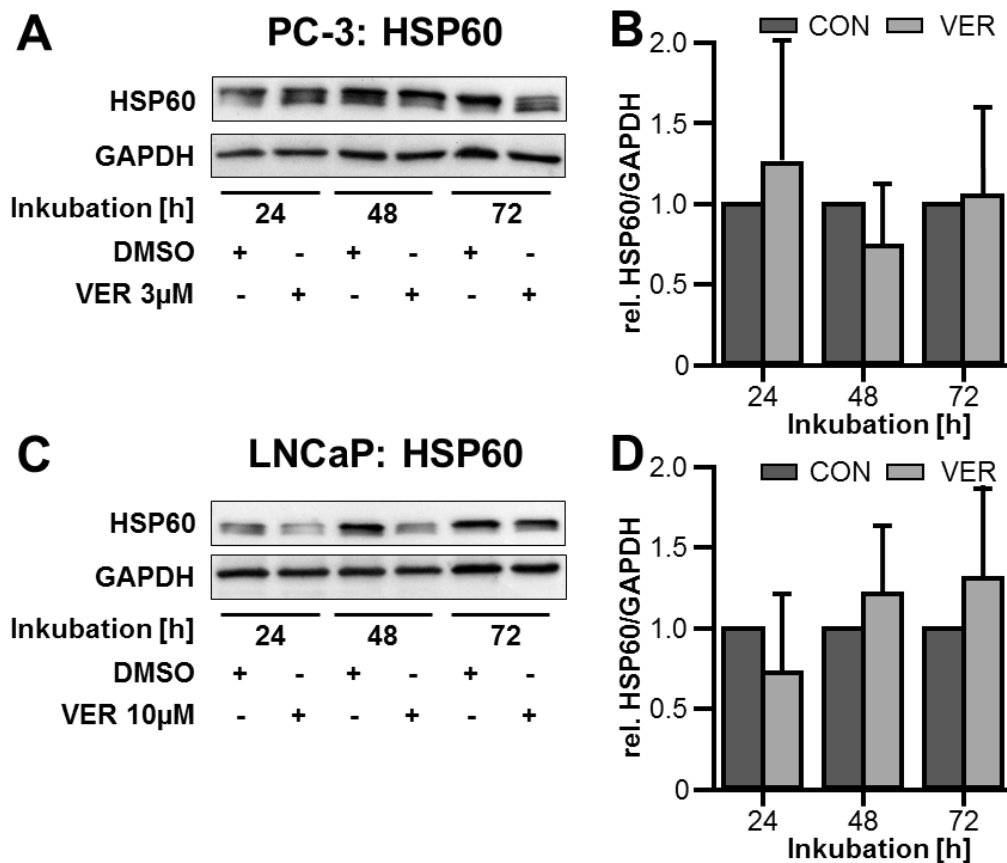


Abbildung 4.4: Western Blot Analysen von HSP60 in PC-3- und LNCaP-Zellen unter VER155008-Behandlung.

PC-3- (A+B) und LNCaP-Zellen (C+D) inkubiert mit 3 μ M (PC-3) und 10 μ M (LNCaP) VER155008, gelöst in DMSO über einen Zeitraum von 72h. Die Kontrollgruppe (CON) wurde ausschließlich mit DMSO behandelt. Western Blot Analyse (A+C) und Quantifizierung (B+D) von mindestens sechs unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD der relativen Expression von **HSP60**, normiert auf die DMSO-Kontrolle (CON)=1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test ausgewertet und statistische Signifikanz mit $p \leq 0,05$ (*) $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) angenommen.

HSP70/HSP90-organising-protein (HOP)

Die Proteinanalyse zeigte sowohl bei PC-3- als auch bei LNCaP-Zellen eine signifikante Suppression der HOP-Expression unter VER155008-Behandlung. In PC-3-Zellen sank die relative HOP-Expression nach Wirkstoffbehandlung zu allen Zeitpunkten gleichbleibend (24h: $0,81 \pm 0,24$ $p=0,0382$; 48h: $0,81 \pm 0,21$ $p=0,0113$; 72h: $0,88 \pm 0,39$ $p=0,5241$) (siehe Abb. 4.5 A+B). Die relative HOP-Expression in LNCaP-Zellen zeigte hingegen innerhalb von 72h einen aufsteigenden Verlauf mit einer beginnenden Suppression und einer finalen Induktion bei signifikanten Unterschieden zur Kontrollgruppe (CON) zu allen Zeitpunkten (24h: $0,64 \pm 0,33$ $p=0,0149$; 48h: $0,79 \pm 0,16$ $p=0,0035$; 72h: $1,29 \pm 0,27$ $p=0,0231$) (siehe Abb. 4.5 C+D).

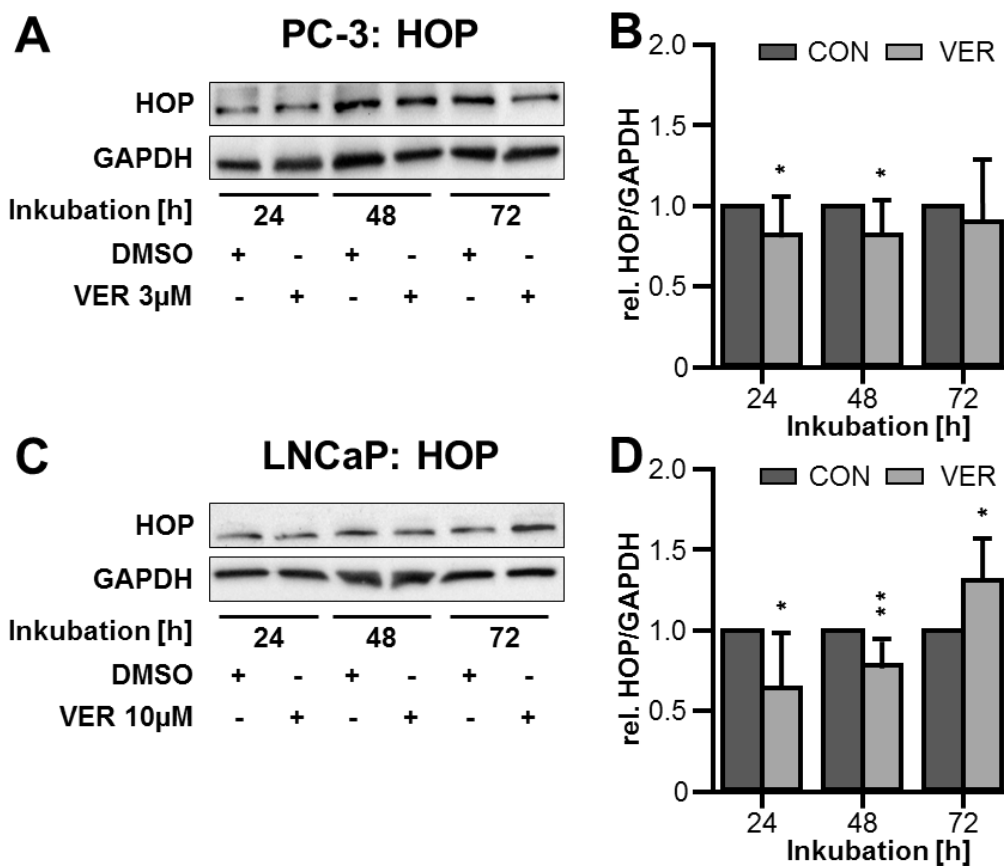


Abbildung 4.5: Western Blot Analysen von HOP in PC-3- und LNCaP-Zellen unter VER155008-Behandlung.

PC-3- (A+B) und LNCaP-Zellen (C+D) inkubiert mit 3 μ M (PC-3) und 10 μ M (LNCaP) VER155008, gelöst in DMSO über einen Zeitraum von 72h. Die Kontrollgruppe (CON) wurde ausschließlich mit DMSO behandelt. Western Blot Analyse (A+C) und Quantifizierung (B+D) von mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD der relativen Expression von **HOP**, normiert auf die DMSO-Kontrolle (CON)=1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test ausgewertet und statistische Signifikanz mit $p \leq 0,05$ (*) $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) angenommen.

Hitzeschockprotein HSP70

Eine Behandlung mit dem HSP70-Inhibitor VER155008 hatte auf die Expression von HSP70 in beiden untersuchten PCa-Zelllinien wenig Einfluss. In PC-3-Zellen konnte innerhalb von 72h keine signifikante Änderung des HSP70 festgestellt werden (24h: $0,87 \pm 0,21$ $p=0,0915$; 48h: $1,04 \pm 0,47$ $p=0,8036$; 72h: $1,04 \pm 0,34$ $p=0,7575$) (siehe Abb. 4.6 A+B). In LNCaP-Zellen stieg die Expression langsam an, woraufhin bei 72h eine signifikante Induktion der HSP70 Expression gemessen wurde (24h: $0,98 \pm 0,20$ $p=0,7438$; 48h: $1,06 \pm 0,18$ $p=0,3551$; 72h: $1,27 \pm 0,31$ $p=0,0209$) (siehe Abb. 4.6 A+B).

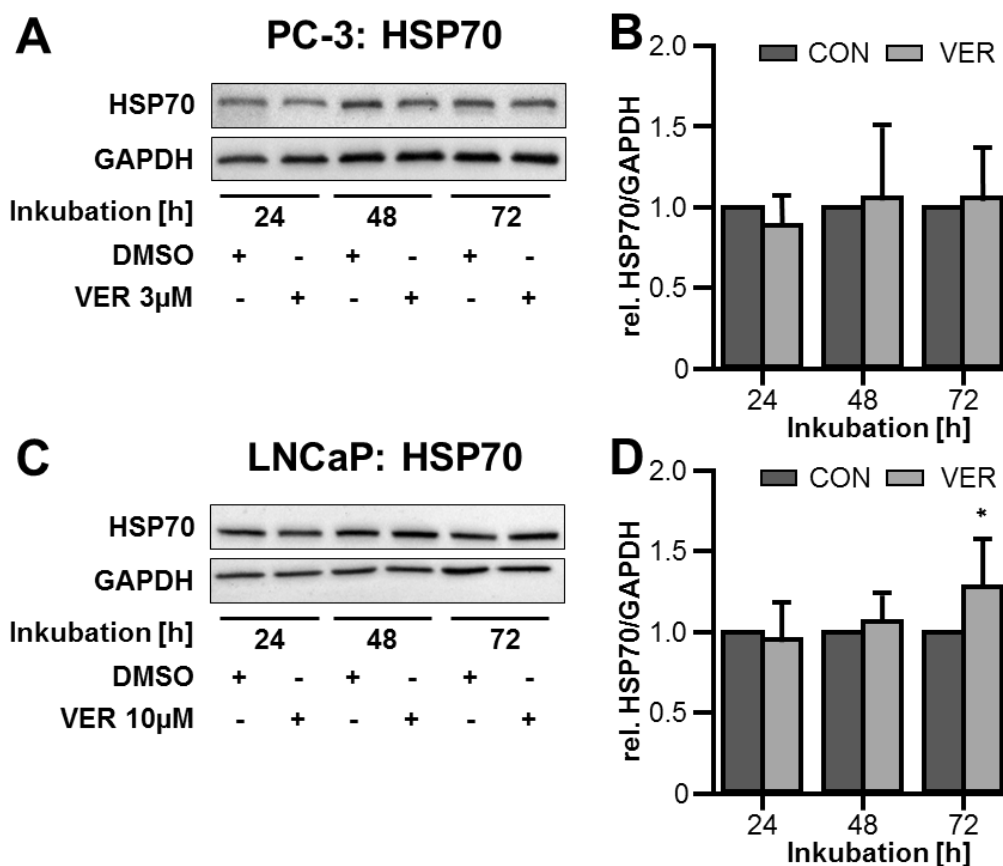


Abbildung 4.6: Western Blot Analysen von HSP70 in PC-3- und LNCaP-Zellen unter VER155008-Behandlung.

PC-3- (A+B) und LNCaP-Zellen (C+D) inkubiert mit 3µM (PC-3) und 10µM (LNCaP) VER155008, gelöst in DMSO über einen Zeitraum von 72h. Die Kontrollgruppe (CON) wurde ausschließlich mit DMSO behandelt. Western Blot Analyse (A+C) und Quantifizierung (B+D) von mindestens acht unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD der relativen Expression von HSP70, normiert auf die DMSO-Kontrolle (CON)=1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test ausgewertet und statistische Signifikanz mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) angenommen.

Hitzeschockprotein HSP90 α

Die HSP90 α -Proteinanalyse zeigte bei PC-3- und LNCaP-Zellen unterschiedliche Tendenzen, die jedoch keine statistische Signifikanz aufzeigten. In PC-3-Zellen bewirkte die VER155008-Behandlung eine leichte Suppression der HSP90 α Expression innerhalb von 72h (24h: 0,91 \pm 0,46 p=0,5427; 48h: 0,82 \pm 0,43 p=0,2347; 72h: 0,77 \pm 0,39 p=0,0639) (siehe Abb. 4.7 A+B). In LNCaP-Zellen wurde zunächst zu Beginn bei 24h die Expression von HSP90 α leicht supprimiert, woraufhin sie bei 48h und 72h anstieg und eine Induktion erkennen ließ (24h: 0,75 \pm 0,52 p=0,2544; 48h: 1,15 \pm 0,53 p=0,03964 72h: 1,36 \pm 0,61 p=0,0751) (Abb. 4.7 C+D).

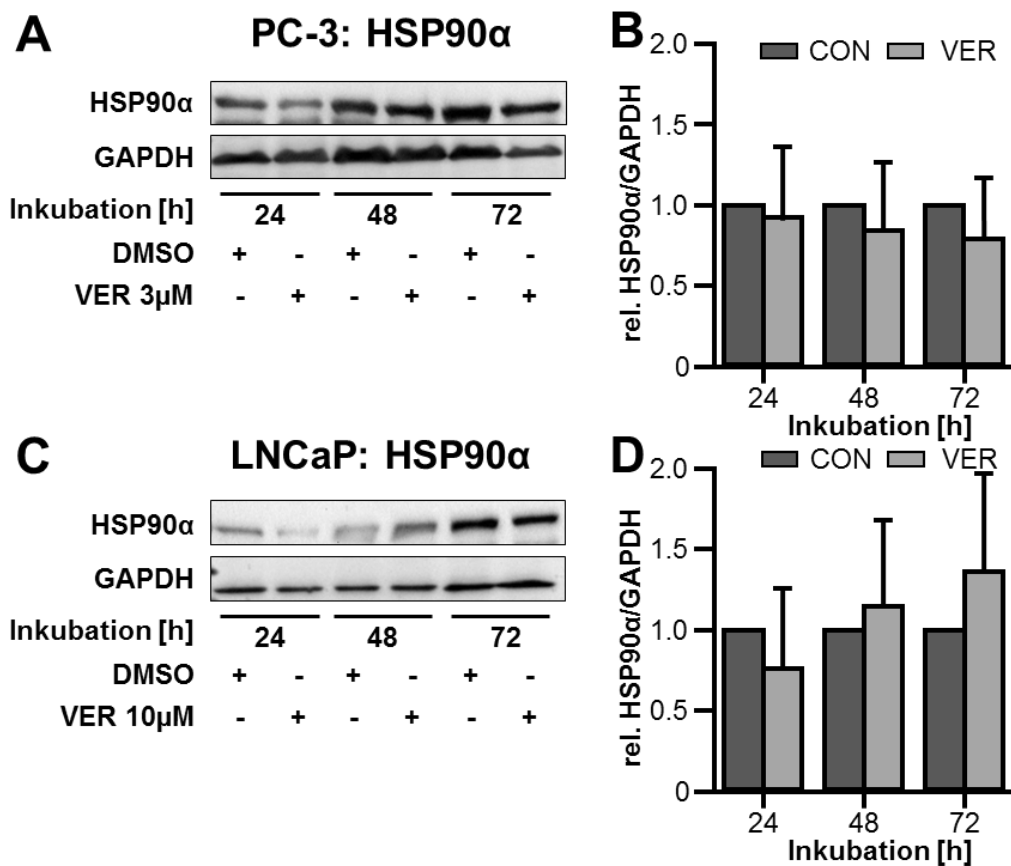


Abbildung 4.7: Western Blot Analysen von HSP90 α in PC-3- und LNCaP-Zellen unter VER155008-Behandlung.

PC-3- (A+B) und LNCaP-Zellen (C+D) inkubiert mit 3 μ M (PC-3) und 10 μ M (LNCaP) VER155008, gelöst in DMSO über einen Zeitraum von 72h. Die Kontrollgruppe (CON) wurde ausschließlich mit DMSO behandelt. Western Blot Analyse (A+C) und Quantifizierung (B+D) von mindestens acht unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD der relativen Expression von HSP90 α , normiert auf die DMSO-Kontrolle (CON)=1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test ausgewertet und statistische Signifikanz mit p \leq 0,05 (*) p \leq 0,01 (**) und p \leq 0,001 (***) angenommen.

Hitzeschockprotein HSP90 β

Die Behandlung mit VER155008 scheint bei LNCaP- und PC-3-Zellen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Expression von HSP90 β zu haben. PC-3-Zellen zeigten bei Wirkstoffbehandlung sinkende HSP90 β -Level. Nach 48h sank die Suppression von HSP90 β auf statistisch signifikant veränderte Werte ab und blieb auch bei 72h signifikant erniedrigt (24h: $0,81 \pm 0,49$ $p=0,3154$; 48h: $0,54 \pm 0,45$ $p=0,0045$; 72h: $0,62 \pm 0,40$ $p=0,0034$) (siehe Abb. 4.8 A+B). Der LNCaP-Ansatz zeigte direkt zu Beginn bei 24h und 48h eine signifikante Suppression der HSP90 β -Expression, die jedoch nach 72h statistisch signifikant anstieg und eine HSP90 β Induktion erkennen ließ (24h: $0,53 \pm 0,37$ $p=0,0028$; 48h: $0,55 \pm 0,30$ $p=0,0002$; 72h: $1,52 \pm 0,73$ $p=0,0281$) (siehe Abb. 4.8 C+D). Die Tendenzen der jeweiligen Zelllinien waren bei den Proteinanalysen der Komplexpartner HSP90 α und HSP90 β ähnlich.

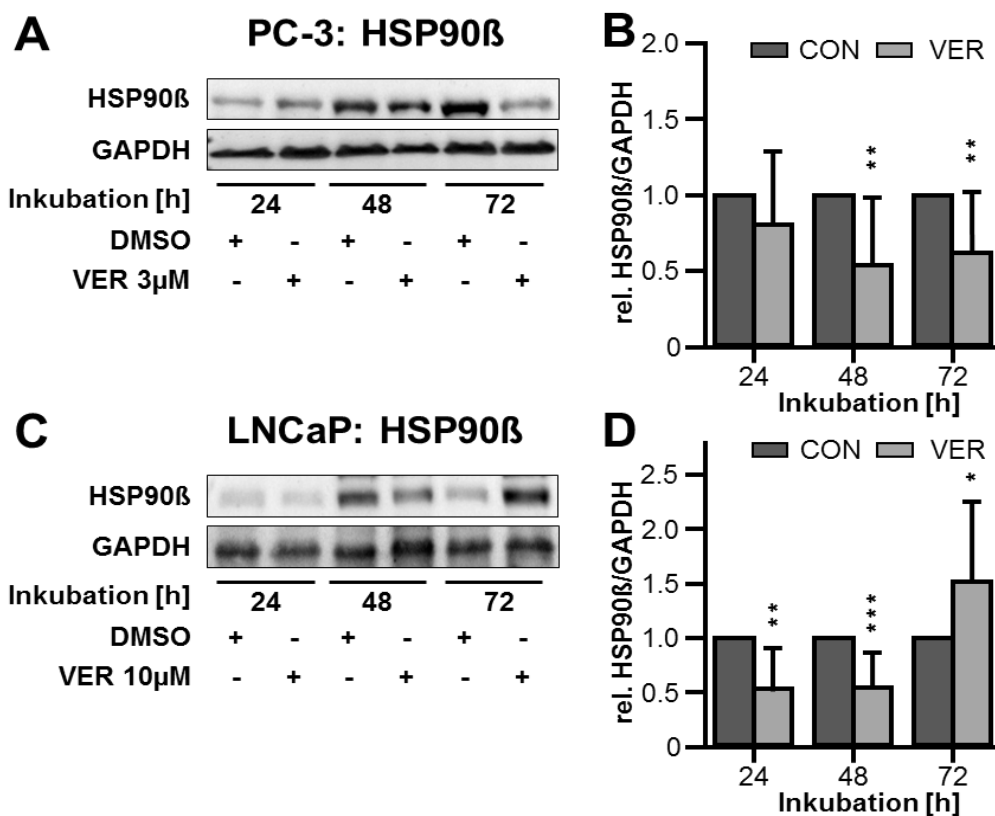


Abbildung 4.8: Western Blot Analysen von HSP90 β in PC-3- und LNCaP-Zellen unter VER155008-Behandlung.

PC-3- (A+B) und LNCaP-Zellen (C+D) inkubiert mit 3 μ M (PC-3) und 10 μ M (LNCaP) VER155008, gelöst in DMSO über einen Zeitraum von 72h. Die Kontrollgruppe (CON) wurde ausschließlich mit DMSO behandelt. Western Blot Analyse (A+C) und Quantifizierung (B+D) von mindestens sieben unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD der relativen Expression von **HSP90 β** , normiert auf die DMSO-Kontrolle (CON)=1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test ausgewertet und statistische Signifikanz mit $p \leq 0,05$ (*) $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) angenommen.

4.3 Proteinanalyse des Androgenrezeptors AR in LNCaP-Zellen unter VER155008-Inkubation

Androgenrezeptor AR

Der AR spielt sowohl im gesunden Prostatagewebe als auch im PCa eine wichtige Rolle in der Proliferation des Gewebes, die unter anderem durch DHT und Testosteron aktiviert wird. Eine Behandlung mit VER155008 bewirkte bei AR-positiven LNCaP-Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten eine Suppression der AR-Expression. Bei 48h, sowie bei 72h Inkubationszeit zeigte die Suppression des Androgenrezeptors statistisch signifikante Werte mit einer Reduktion um ca. ein Drittel im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe (24h: $0,77 \pm 0,51$ $p=0,4058$; 48h: $0,64 \pm 0,34$ $p=0,0104$; 72h: $0,66 \pm 0,24$ $p=0,0007$) (siehe Abb. 4.9 A+B). Eine Proteinanalyse des AR bei AR-negativen PC-3-Zellen zeigte erwartungsgemäß keinen Nachweis des Steroidhormonrezeptors.

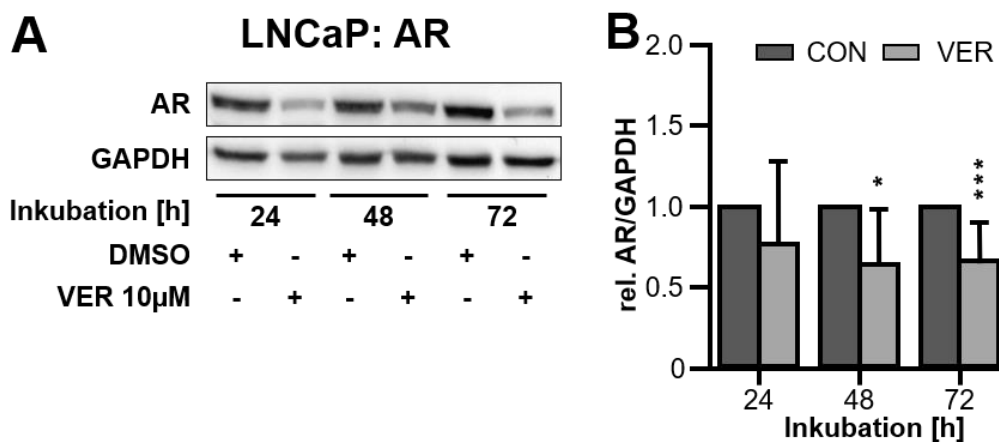


Abbildung 4.9: Western Blot Analysen des AR in LNCaP-Zellen unter VER155008-Behandlung. LNCaP-Zellen (A+B) inkubiert mit 10 μ M VER155008, gelöst in DMSO über einen Zeitraum von 72h. Die Kontrollgruppe (CON) wurde ausschließlich mit DMSO behandelt. Western Blot Analyse (A) und Quantifizierung (B) von mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD der relativen Expression von AR, normiert auf die DMSO-Kontrolle (CON)=1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test ausgewertet und statistische Signifikanz mit $p \leq 0,05$ (*) $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) angenommen.

5 Diskussion

Durch die Entwicklung neuer Wirkstoffe für die Therapie des CRPC und des metastasierten CRPC konnte die durchschnittliche Überlebenszeit der betroffenen Patienten bereits verlängert werden, jedoch zeigte sich auch hier ein weiterer Progress im zeitlichen Verlauf der Therapie. Zugelassene Wirkstoffe zielen auf das weitere Absinken des Hormonlevels bzw. die Hemmung der AR-Aktivierung und damit auf androgenrezeptorabhängige Signalwege ab (bspw. Abirateron, Enzalutamid). Auf der Suche nach neuen Zielstrukturen der antiproliferativen Therapie scheinen Hitzeschockproteine eine wichtige Rolle zu spielen^{15,16,18}. HSPs liegen in einer Vielzahl von Tumorentitäten signifikant vermehrt vor¹⁵. Speziell HSP70 und HSP90 zeigen im PCa onkogene Effekte wie Apoptoseinhibition, Zellzyklusmodulation, AR-Transkription und Proteinstabilität^{41,61-63}. Knock-Out-Mäuse zeigten, dass HSP70 entbehrlich für normales Gewebe ist⁴¹ und ein Silencing von HSP70 einen zytotoxischen Effekt auf Krebszellen, aber nicht auf normale Zellen hat⁵⁵. Somit könnte eine Modulation der HSP70-Funktion die Vitalität von Tumorgewebe beeinträchtigen und gesundes Gewebe gleichzeitig unbeeinflusst lassen⁵⁵. Ein Erklärungsansatz für die verstärkte Abhängigkeit der Tumorzellen von HSPs liegt in einer gestörten Homöostase des Proteoms der entarteten Zellen^{41,47}. In Tumorzellen herrscht ein erhöhter proteotoxischer Stress durch eine gesteigerte Menge an ungefalteten, toxischen Proteinen, die in der Zelle aggregieren. Dadurch steigt der Bedarf an Chaperonen, somit auch an HSPs, welche die korrekte Proteinfaltung und die proteasomale Degradation von aggregierten Proteinen fördern⁴⁷. Gesunde Zellen sind einem solchen intrinsischen Stress normalerweise nicht ausgesetzt, weshalb sie weniger abhängig von HSPs sind als entartete Zellen^{41,47}. Eine pharmakokinetische in-vivo Studie an Mäusen zeigte, dass bei intravenöser Applikation die Halbwertszeit von VER155008 im Tumorgewebe höher lag als im Plasma, was auf eine weitere spezifische Wirkung bzw. eine Akkumulation im Tumorgewebe hinweist⁵². Zusammenfassend lässt die Inhibition von HSP70 durch VER155008 somit auf eine vielversprechende Strategie der Tumorthherapie hoffen.

Herauszufinden ist, inwieweit VER155008 als ATP-Analogon eine Selektivität für HSP70 unter den Isoformen des Hitzeschockproteins, sowie unter vielen anderen ATP-interagierenden Proteinen besitzt. Die Phosphatgruppen des ATP-Moleküls stellen die wichtigsten Bindungsstrukturen dar, um mit einer Vielzahl ATP-abhängiger Proteine wie Kinasen und

ATPasen zu kommunizieren^{64,65}. Innerhalb der ATPase-Familien, zu denen unter anderem HSP70 und HSP90 gehören, sowie selbst unter den Isoformen der jeweiligen Proteine zeigen die ATP-Bindungsdomänen strukturelle Variabilität^{52,65-67}. Die Betrachtung verschiedener HSP70-Isoformen zeigt Homologien der ATP-Bindungsdomänen von 70% (HSC70 verglichen mit GRP78) bzw. 89% (HSP70 verglichen mit HSC70)⁶⁸. Diese feinstrukturellen Unterschiede der ATP-Bindungsdomänen können für die Entwicklung spezifisch wirksamer Therapeutika genutzt werden^{65,68,69}. Die Struktur des HSP70-Inhibitors VER155008 enthält keine Phosphatgruppen und ähnelt ATP nur in der Ribose und in der Base (*siehe Abb. 1.3 B*). VER155008 lässt dadurch keine ubiquitären unspezifischen Bindungen mit anderen ATP-abhängigen Molekülen vermuten.

Bindungsanalysen zeigten, dass VER155008 hoch spezifisch an die ATP-Bindungsstelle von HSP70 bindet und es dabei die Substratbindungsstelle unbeeinflusst lässt^{52,53}. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass VER155008 mit geringer Affinität an HSC70 und noch weniger an GRP78 bindet⁵². Einer gleichzeitigen Inhibition von HSP70 und HSC70 werden synergistische Effekte in der Beeinträchtigung der HSP90-Chaperonfunktion und der Degradation der HSP90-Zielproteine zugeschrieben^{55,57,70}. Auch GRP78 spielt eine prominente Rolle in der Tumorgenese des PCa, wo es ebenfalls überexprimiert wird⁷¹. GRP78 gilt als Hauptkomponente der Chaperonfunktion im Endoplasmatischen Retikulum (ER), indem es eine korrekte Proteinfaltung und die Degradation fehlgefalteter Proteine vermittelt und als Regulator der ER-abhängigen Stressantwort agiert^{68,72}. Eine Interaktion von HSP90 β und VER155008 wurde erst bei sehr hohen Wirkstoffkonzentrationen beobachtet, welche in behandelten Zellen in dieser Arbeit weit unterschritten wurden⁵² (*siehe Abb. 1.3 A*). Somit kann postuliert werden, dass eine direkte Interaktion von VER155008 mit HSP90 durch unspezifische Bindungen einen vernachlässigbaren Einfluss in diesem Versuchsaufbau hat.

Trotz moderner Strukturuntersuchungen können Bindungsanalysen jedoch nicht in vollem Ausmaß den tatsächlichen Effekt der Interaktion von Molekülen vorhersagen. Oftmals liegen die in-vitro Effekte eines spezifischen Inhibitors höher als in Bindungsanalysen vorhergesagt werden kann. Auch die tatsächliche Inhibition der ATPase-Aktivität von HSP70 durch VER155008 liegt über 100-fach höher als die in Bindungsanalysen gemessene Affinität⁵².

Durch diese eingeschränkte Vorhersagekraft ist eine in-vitro Charakterisierung eines Wirkstoffes somit unabdingbar.

In Wachstumskinetiken zeigte sich ein konzentrationsabhängiger wachstumsinhibierender Effekt des Wirkstoffes VER155008 auf die Prostatakarzinomzellen PC-3 und LNCaP (*siehe Abb. 4.1*). Zunächst wurde die IC₅₀ von VER155008 bei der Behandlung von PC-3- und LNCaP-Zelllinien ermittelt. Orientierend an publizierten Untersuchungen zu VER155008 in Mamma- und Kolonkarzinom-Zelllinien wurden Wirkstoffkonzentrationen von 0,1µM bis 50µM getestet^{52,73}. Für AR-negative PC-3-Zellen ergab sich eine IC₅₀ von 3µM VER155008, bei den hormonsensitiven LNCaP-Zellen lag die IC₅₀ mit 10µM etwas höher. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Wachstumsinhibierung auch unabhängig des ARs vermittelt werden muss, da die Proliferation sowohl von hormonsensitiven LNCaP-Zellen als auch von AR-negativen und hormonresistenten PC-3-Zellen supprimiert wird. Beide Zelllinien ließen in der Wirkstoffgruppe ein statistisch signifikant vermindertes Wachstum erkennen, während die Kontrollgruppe ein exponentielles Wachstum zeigte. Anschließend durchgeführte Experimente von Luise Zimmermann bestätigten die ermittelten IC₅₀ von PC-3 (3µM) und LNCaP (10µM)⁷⁴. Die aktuelle Literatur beschreibt IC₅₀ Konzentrationen von 5,3-14,4µM bei Mamma- und Kolonkarzinomzellen, welche somit näherungsweise übereinstimmen^{52,73}. LNCaP95-Zellen wurden in einer Veröffentlichung vom September 2017 mit 10µM bzw. 25µM VER155008 behandelt, hierbei jedoch keine IC₅₀ bestimmt²².

Zielmolekül von VER155008 ist das Hitzeschockprotein 70. HSP70 ist an der Aufrechterhaltung des Multi-Chaperonkomplexes um den AR beteiligt. VER155008, als ATP-Abkömmling, konkurriert um die ATP-Bindungsstelle am HSP70-Molekül. Nach erfolgreicher Substratfaltung durch HSP70 wird das Faltprodukt durch ATP-Hydrolyse und unter Mithilfe von HSP40, HSP-BP1, Bag1 und weiteren Co-Chaperonen freigesetzt^{18,75}. Bei einer Inhibition von HSP70 durch VER155008 kann daher das Substrat nicht erfolgreich freigesetzt werden und Interaktionen mit weiteren sog. ‚client proteins‘ sind eingeschränkt. Eine Blockierung der ATP-Bindung durch VER155008 vermittelt eine Inhibition des HSP70-Moleküls auf Proteinebene und nicht auf transkriptioneller Ebene. Wie zu erwarten, zeigte eine Behandlung von PC-3- und LNCaP-Zellen mit dem Wirkstoff folglich keine veränderte Expression von HSP70 im Vergleich zur Kontrollgruppe (*siehe Abb. 4.6*). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass VER155008 das im Zytosol vorkommende HSP70 direkt moduliert und

nicht in die Expression des Zielmoleküls eingreift. Lediglich in LNCaP-Zellen zeigte sich bei einem Inkubationszeitraum von 72h eine 1,2-fache Induktion der HSP70-Expression. Zu erklären wäre diese leichte Induktion zum Ende der beobachteten Inkubation mit einem Gegenregulationsmechanismus der Zelle, welcher versucht die blockierte HSP70-Funktion durch eine gesteigerte Expression von HSP70 auszugleichen.

HSPs liegen in einer Vielzahl von Tumorentitäten signifikant erhöht vor¹⁵. Auch HSP70 ist in diversen epithelialen Tumoren überexprimiert, wie beispielsweise im PCa^{76,77}, im Mamma-Ca⁷⁸ und im Colon-Ca⁷⁹. HSP70 unterliegt, wie auch verschiedene andere HSPs, der transkriptionellen Kontrolle durch HSF-1, dem heat shock transcription factor-1¹⁶. HSF-1 kann an die 5'-Promotorregion der HSP-Gene binden und so eine Transkription der Proteine vermitteln^{80,81}. Die Aktivierung des HSF-1 wird durch verschiedene Mechanismen reguliert. Auch HSPs selbst können die Aktivität von HSF-1 beeinflussen¹⁶. Hierbei liegen HSP70 und HSP90 in einem inaktiven Komplex mit HSF-1 im Zytosol vor. Bei zellulärem Stress dissoziieren die HSPs von HSF-1, welcher daraufhin in den Zellkern transloziert und dort als Transkriptionsfaktor die Hitzeschock-Antwort induziert. Diverse HSPs, wie HSP27, HSP70 und HSP90, werden vermehrt transkribiert und können so zum zellulären Schutz durch ihre Chaperonfunktion beitragen³⁶ (siehe Abb. 5.1).

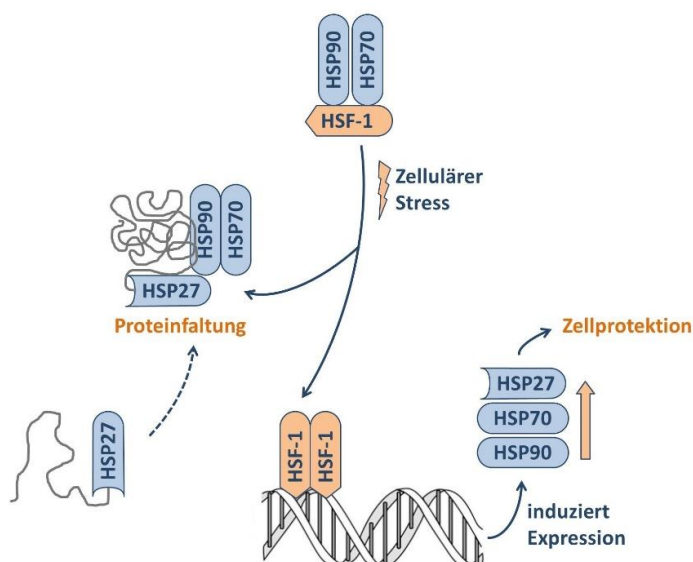


Abbildung 5.1: HSP-Antwort bei zellulärem Stress. Zellulärer Stress löst die Dissoziation des HSP70/HSP90/HSF-1-Komplexes aus. HSF-1 transloziert in den Zellkern, wo es die Hitzeschock-Antwort induziert. Diverse HSPs werden vermehrt exprimiert und können so zur Zellprotektion beitragen. HSP27 verhindert u.a. die Aggregation fehlgefalteter Proteine in der Zelle und vermittelt die Komplexbildung mit HSP70 und HSP90, welche unter Mithilfe von Co-Chaperonen zur korrekten Proteinfaltung beitragen. Modifiziert nach McConnell et al.³⁶

HSP70 fungiert nicht nur als Chaperon für fehlgefaltete Proteine, sondern kann auch regulierend in zelluläre Signalwege eingreifen, wie beispielsweise zur Inhibition der Apoptose und der onkogeninduzierten Seneszenz in Tumorzellen⁴¹. HSP70 übt hierbei seine antiapoptotische Funktion in verschiedenen Signalkaskaden aus¹⁵. Im intrinsischen Weg kann HSP70 über eine indirekte Blockierung der Bax-Aktivierung die Ausschüttung von proapoptotischen Signalmolekülen, wie Cytochrom C, aus dem Mitochondrium unterdrücken und somit eine stressinduzierte Apoptose verhindern⁴³. Auch im extrinsischen Weg kann HSP70 die Apoptose unterdrücken, indem es die Assemblierung des DISC (death-inducing signaling complex) blockiert und somit die apoptoseeinleitende Caspase-3-Aktivierung ausbleibt⁴⁴. Eine Inhibition der HSP70-Aktivität lässt eine vielschichtige Unterdrückung diverser zellulärer Rettungsfunktionen schlussfolgern, die zu einer verminderten Vitalität von Tumorzellen führt.

Die Arbeitsgruppe um M.Chatterjee konnten in Zellzyklusanalysen einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase bei der Behandlung von LNCaP-Zellen mit VER155008 feststellen, nicht jedoch veränderte Zellzyklen bei PC-3-Zellen⁶⁰. Interessant ist nun, ob neben einem möglichen Zellzyklusarrest auch eine Induktion der Apoptose bei Behandlung mit VER155008 festzustellen ist. Die Fragmentierung der DNA im Zellkern stellt hierbei einen wichtigen und kennzeichnenden Schritt der Apoptose dar. Der TUNEL-Assay weist diese DNA-Fragmentierung der Zellen nach und stellt somit eine Methode zum Nachweis der Induktion von Apoptose dar⁸². Unsere Arbeitsgruppe konnte in TUNEL-Assays eine signifikante Apoptoseinduktion nach 24, 48 und 72h bei der Behandlung von LNCaP-Zellen mit VER155008 nachweisen, nicht jedoch bei PC-3-Zellen^{60,74}. Eine weitere Methode stellt der Nachweis von aktiven Caspasen dar, welche nur in apoptotischen Zellen zu finden sind⁸². Im Caspase-Assay zeigte sich eine signifikante Caspase-3/7-Spaltung in den gleichen Zeitintervallen bei LNCaP-Zellen und zusätzlich nach 72 Stunden in PC-3-Zellen⁶⁰. Hieraus lässt sich eine antiapoptotische Funktion von HSP70 in caspaseabhängigen Apoptosesignalwegen ableiten. AR-positive LNCaP-Zellen scheinen eine höhere Sensitivität der HSP70-Inhibition durch VER155008 zu haben als AR-negative PC-3-Zellen. Eine dritte angewandte Methode ist die Annexin V/PI-Färbung, welche eine Apoptoseinduktion auch unabhängig der Caspase-Aktivierung nachweisen kann. Analysen der Zellviabilität mittels Annexin V/PI-Färbung zeigten eine 10%-ige Apoptose-Induktion in PC-3-Zellen bei einer Behandlung von VER155008 mit einer Wirkstoffkonzentration von 3µM (IC₅₀) bzw. 10µM⁶⁰.

In LNCaP-Zellen konnte bei einer Wirkstoffkonzentration von 10µM (IC₅₀) eine deutlichere Reduktion der Viabilität um 40% gezeigt werden. Die Apoptose, die durch die Annexin V/PI-Färbung ermittelt wurde, scheint aufgrund des geringen Apoptosenachweises im Caspase-Assay in PC-3-Zellen somit vornehmlich caspaseunabhängig induziert zu sein. Eine Erklärung der unterschiedlichen Ausprägung der Apoptoseinduktion unter VER155008-Behandlung könnte in der Rolle des Tumorsuppressors p53 liegen. p53 ist in PC-3-Zellen aufgrund einer Mutation funktionslos. In LNCaP-Zellen ist p53 hingegen funktionstüchtig und kann in den Zellen seine proapoptotische Funktion ausführen. Entsprechend der Erkenntnisse zeigten beide PCa-Zelllinien eine dosisabhängige Reduktion des zellulären Metabolismus, welche bei LNCaP-Zellen stärker ausgeprägt war⁶⁰. Dies lässt erneut auf eine höhere Sensitivität der AR-positiven LNCaP-Zellen gegenüber einer VER155008-Behandlung im Vergleich zu AR-negativen PC-3-Zellen schließen.

HSP40, auch bekannt als DNAJ, gilt als Co-Chaperon von HSP70. Hierbei transferiert es ungefaltete Proteine zu HSP70, stimuliert seine intrinsische ATP-ase Aktivität und reguliert somit unter anderem die HSP70-Funktion^{36,37}. Es sind über 41 Splicevarianten und Isoformen von HSP40 bekannt, deren Rolle in Tumorzellen bisher jedoch nicht ausreichend charakterisiert ist³⁶. Eine Behandlung der PCa-Zellen PC-3 und LNCaP mit VER155008 ließ in dieser Arbeit keine statistisch signifikanten Auswirkungen auf die Expression von HSP40 erkennen (*siehe Abb. 4.3*). Ein weiteres HSP das in dieser Arbeit untersucht wurde ist der Apoptosefaktor HSP60. Im Vergleich zu gesundem Prostatagewebe konnten bisher in tumorösen Gewebe erhöhte Level von HSP60 festgestellt werden³⁸. Patienten mit fortgeschrittenem PCa zeigten eine signifikante Korrelation zwischen der HSP60-Expression und dem Tumorprogress¹⁵. In der Literatur wird HSP60 als Apoptosefaktor diskutiert, wobei nicht abschließend geklärt ist, ob er pro-^{39,40} oder antiapoptotische⁸³⁻⁸⁵ Eigenschaften besitzt. Auch in dieser Arbeit konnte keine Regulation der HSP60-Expression in PCa-Zellen durch eine Behandlung mit VER155008 festgestellt werden (*siehe Abb. 4.4*).

Das letzte Co-Chaperon des AR-Multi-Chaperonkomplexes ist das HSP70/90-organising protein HOP. Es gilt als direkter Aktivator des HSP90-Dimers und nimmt somit indirekt Einfluss auf apoptotische Signalwege. Eine verminderte HOP-Funktion hat eine verminderte HSP90-Funktion zur Folge. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit VER155008 von PCa-Zellen eine Suppression der zellulären HOP-Levels zur Folge hat (*siehe*

Abb. 4.5). In PC-3- und LNCaP-Zellen konnte eine statistisch signifikante Reduktion von HOP in den ersten 48 Stunden gezeigt werden. Nach 72h steigt die HOP-Expression erneut an, ähnlich dem Verlauf bei HSP90 β , wofür sich keine eindeutige Erklärung finden lässt.

Als wichtiger Bindungspartner des AR im Multichaperonkomplex gilt HSP90, es ist für den Turnover und die Funktionalität des Rezeptors zuständig. HSP90 kann weiter differenziert werden in eine konsekutiv exprimierte HSP90 β -Isoform und eine induzierbare HSP90 α -Isoform⁸⁶, welche in dieser Arbeit ebenfalls separat analysiert wurden. HSP90 α zeigte unter VER155008-Einfluss in keiner der beiden PCa-Zelllinien eine statistisch signifikante Änderung der Expression (siehe Abb. 4.7). HSP90 β hingegen wurde in PC-3-Zellen sukzessive supprimiert, bis auf statistisch signifikante Werte von ca. 50% im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abb. 4.8). Auch in LNCaP-Zellen zeigt sich in den ersten 48h der Inkubation eine statistisch signifikante Suppression um ca. die Hälfte. Nach 72h wurde eine Induktion von HSP90 β in LNCaP-Zellen festgestellt, wobei die Standardabweichung sehr hoch ist, was ein Artefakt nicht ausschließen lässt. Zusammenfassend ist jedoch der klare Trend zu erkennen, dass die HSP70-Inhibition durch VER155008 zu einer verminderten Expression von HSP90 β in beiden PCa-Zelllinien führt, nicht jedoch zu einer veränderten Expression von HSP90 α . HSP90 ist nicht nur für die Stabilität, Konformation und zelluläre Lokalisation des AR zuständig, auch andere sog. HSP90-Zielproteine wie die bekannten Kinasen CDK4, C-RAF, AKT und Her-2 zählen zu den Interaktionspartnern dieses Chaperons^{52,55,87}. Auch Survivin gehört zu den Bindungspartnern von HSP90, es ist im PCa häufig überexprimiert und fungiert als ein proapoptotischer Faktor in Proliferations- und Apoptosesignalwegen⁸⁸. Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine Inhibition von HSP90 die ubiquitinabhängige proteasomale Degradation der HSP90-Zielproteine zur Folge hat⁸⁹. Eine Schwächung von HSP90 führt somit über weitere Bindungspartner zur Beeinträchtigung einer Vielzahl von Signalwegen, die für das Überleben der Zelle essenziell sind. Die HSP90 β -Isoform ist speziell im PCa noch nicht ausführlich charakterisiert worden, jedoch zeigt sich in anderen Entitäten eine Beteiligung an Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. Eine Suppression von HSP90 β in PCa-Zellen zeigt durch diese Interaktionen eine weitere Erklärung des verminderten Zellwachstums beider PCa-Zelllinien unter VER155008-Behandlung auf.

Der Androgenrezeptor (AR) gilt als wichtigster Proliferationsfaktor des PCa. Er wird u.a. durch Dihydrotestosteron und Testosteron an der Plasmamembran aktiviert, transloziert

unter Bindung an HSP27 in den Zellkern und agiert dort als Transkriptionsfaktor für AR-regulierte Gene, beispielsweise das PSA. Seine Stabilität und Funktionalität innerhalb der Zelle wird durch einen Multi-Chaperonkomplex gewährleistet, der aus interagierenden Hitzeschockproteinen gebildet wird. Die Störung des Multi-Chaperonkomplexes hat einen verminderten Schutz und erhöhten Abbau des AR zur Folge. Der Multi-Chaperonkomplex wird aus den in dieser Arbeit charakterisierten Hitzeschockproteinen HSP70, HSP90 α/β , HSP40, HSP60 und HOP gebildet. Hierbei interagieren HSP70 und HSP90 α/β direkt mit dem AR, HSP40, HSP60 und HOP dienen als Co-Chaperone.

In der Zelllinie LNCaP95, welche einen Abkömmling von LNCaP darstellt, wurde die Regulation der AR-Expression durch HSP70 beschrieben²². Zwei verschiedene AR-Varianten, AR-FL (full length) und AR-V7, eine Splice-Variante welche v.a. in enzalutamidresistenten CRPC-Zellen zu finden ist, wurden hierbei untersucht. Die Transkription dieser AR-Varianten wird durch das phosphorylierte Y-box binding protein 1 (YB-1) vermittelt, welches wiederum durch HSP70 aktiviert wird. Dadurch kann HSP70 indirekt Einfluss auf die Transkription des AR nehmen. Außerdem wurde gezeigt, dass die Inhibition von HSP70 durch VER155008 eine verminderte AR-Expression in LNCaP95-Zellen bewirkt. Auch in nativen LNCaP-Zellen wird YB-1 als Transkriptionsfaktor von AR-FL beschrieben⁹⁰. Die in dieser Arbeit durchgeführten Proteinanalysen von AR in LNCaP-Zellen unter VER155008-Behandlung zeigen eine statistisch signifikante Reduktion des AR-Proteins um 40% im Vergleich zur Kontrolle (*siehe Abb. 4.9*). Diese Ergebnisse stützen die These, dass auch in der PCa-Zelllinie LNCaP eine Regulation der AR-Transkription durch HSP70 erfolgt und eine Inhibierung von HSP70 eine verminderte AR-Transkription zur Folge hat. Diese Signalkaskade liefert eine Erklärung zur wachstumshemmenden Wirkweise von VER155008 in hormonsensitiven PCa-Zellen. Bei Western Blot-Analysen von hormonresistenten, AR-negativen PC-3-Zellen konnte erwartungsgemäß kein AR nachgewiesen werden. Da die VER155008-Behandlung auch einen wachstumshemmenden Effekt auf PC-3-Zellen hat, muss VER155008 demnach auch AR-unabhängige Wirkweisen auf die Zellproliferation von PCa-Zellen haben.

VER155008 inhibiert nicht nur die Aktivität von HSP70 sondern zeigte auch Auswirkungen auf die Expression anderer Hitzeschockproteine. HSPs liegen in einer Vielzahl von Tumorentitäten signifikant erhöht vor, womöglich aufgrund ihrer unabdingbaren Chaperon-Funktion und einer stressabhängigen transkriptionellen Regulation¹⁵⁴¹. Hierbei unterliegen

sie der Kontrolle durch HSF-1, welche die stressinduzierte vermehrte Expression von HSPs, u.a. HSP27, vermitteln kann³⁶ (*siehe Abb. 5.1*).

HSP27, im humanem PCa häufig überexprimiert, gilt als zytoprotektiver Faktor der Tumorzellen^{15,91}. Es wirkt antiapoptotisch, unter anderem durch Inhibierung der caspaseabhängigen Apoptose und verhindert die Aggregation fehlgefalteter Proteine die sich in der Zelle ansammeln^{15,36}. Hohe HSP27-Level sind mit einer schlechten Prognose assoziiert und gelten als negativer prädiktiver Marker für das PCa¹⁵. Gesteigerte HSP27-Expressionslevel korrelieren mit einem höheren Gleason-Score, einem prognostischen Parameter, der auf einer histologischen Beurteilung der Prostatadrüsenmorphologie beruht²⁵. Auch ein erhöhter Metastasierungsgrad geht mit hohen HSP27-Level einher³³. PCa-Zellen, die mit VER155008 behandelt wurden, zeigten eine statistisch signifikante Suppression der HSP27-Expression (*siehe Abb. 4.2*). In PC-3-Zellen nahm die HSP27-Expression um etwa 70% im Vergleich zur Kontrollgruppe ab, LNCaP-Zellen zeigten dagegen eine etwas geringere Abnahme der Expression um 40-60%, welche nach 72h statistisch nicht signifikant wieder anstieg. In beiden untersuchten PCa-Zelllinien ist eine unterschiedliche Basalexpression von HSP27 beschrieben, welche bei LNCaP deutlich höher liegt als bei PC-3³⁴. Eine beginnende Suppression von HSP27 über Proteininteraktionen durch VER155008, die jedoch aufgrund der hohen Basalexpressionslevel keine langfristige Auswirkung hat, könnte den steigenden Wert bei 72h erklären. Zusammenfassend ist jedoch ein inhibierender Effekt auf die HSP27-Expression beider PCa-Zelllinien durch Behandlung mit VER155008 zu erkennen. Die Supprimierung von HSP27 geht folglich mit einer verminderten Zytoprotektion einher, welche unter anderem den wachstumsinhibierenden Effekt des Therapeutikums erklärt. Auch eine verminderte Motilität der Tumorzellen wird in diesem Zusammenhang vermutet. Der generelle Trend einer HSP27-Suppression durch VER155008-Behandlung zeigt sich jedoch auch in Behandlungen mit den bereits zugelassenen Therapeutika Abirateron, Cabazitaxel und Enzalutamid²⁸⁻³⁰. Bei einer Behandlung von PCa-Zellen mit Docetaxel wurden bereits erhöhte HSP27-Level beschrieben, die als ein induzierter Resistenzmechanismus interpretiert wurden²⁶. Abirateron und Enzalutamid sind bereits in der Sekundärtherapie bei CRPC nach Docetaxel-Behandlung zugelassen. Eine weitergehende molekularbiologische Charakterisierung konnte neben einer Hemmung der Androgensynthese bzw. der AR-Aktivierung eine zusätzliche HSP27-supprimierende Wirkung aufdecken. Einen weiteren Therapieansatz, bei dem HSP27 auf

transkriptioneller Ebene hoch spezifisch reguliert wird, bietet das HSP27 antisense-Oligonukleotid OGX-427. OGX-427 wird in Kombination mit Prednison nach Androgendeprivationstherapie mittels Abirateron bei CRPC in einer klinischen Studie der Phase II (clinicaltrials.gov; NCT01120470) untersucht, Ergebnisse ausstehend. Somit liegt die Vermutung nahe, dass auch VER155008 mit seiner HSP27-supprimierenden Wirkung ein potenzielles neues Therapeutikum dieses fortgeschrittenen PCa-Stadiums darstellen könnte.

Die bisher diskutierten Ansätze zur Therapie des CRPC fokussieren sich auf die Inhibierung einzelner HSPs. Dabei ist bekannt, dass ein Therapieansatz, der gegen mehrere HSPs gleichzeitig gerichtet ist, das Risiko von chemotherapeutischen Resistenzentwicklungen reduziert³⁶. Somit ist es naheliegend passende Aktionspartner zu identifizieren, auf die eine Kombinationstherapie sinnvoll gerichtet werden kann. Die Proteinfaltung durch HSP90 kann als finaler Schritt des ‚protein folding pathway‘/ Proteinfaltungskaskade gesehen werden, nachdem weitere HSPs aktiviert wurden, um die fehlgefalteten Proteine aufzunehmen und zu transferieren. Hierbei zeigt sich, dass die HSP90-Chaperonfunktion in Tumorgewebe maßgeblich von HSP70 anhängig ist⁵⁷. Bisher wurde HSP90 in klinischen Studien erfolgreich als therapeutisches Zielmolekül identifiziert. Allerdings wurde im Therapieverlauf mit 17-AAG eine reaktiv gesteigerte Hitzeschockantwort und eine stark erhöhte HSP70-Expression beobachtet⁹². Die HSP70-Induktion führte hierbei zu einer Umgehung der Apoptoseinleitung der Tumorzellen, was einen weiteren Tumorprogress durch die chemotherapeutische Resistenzentwicklung zur Folge hatte⁹³. Eine zusätzliche Inhibition der HSP70-Funktion könnte somit die bisherigen Limitationen der HSP90-blockierenden Therapie überbrücken und einen neuen Ansatz zur Weiterentwicklung der CRPC-Therapie darstellen. Durch die kombinierte Inhibition und das mehrstufige Eingreifen in Signalkaskaden könnten sich einzelne therapeutische Effekte verstärken und synergistische Effekte erzielt werden, sowie einer schnellen Chemoresistenz entgegen gesteuert werden. Der Effekt eines solchen dualen Therapieansatzes wird bereits in verschiedenen Tumorentitäten untersucht.

Eine in-vitro Studie untersuchte den kombinatorischen Effekt von VER155008 und dem HSP90-Inhibitor NVP-AUY992 im Multiplen Myelom⁹⁴. Die Kombinationstherapie zeigte eine Zellviabilität von 25% im Vergleich zu 70% bzw. 75% bei alleiniger NVP-AUY992- bzw. VER155008-Behandlung⁹⁴. Hierbei wurde der HSP90-Inhibitor NVP-AUY992 in Konzentrationen unterhalb der zuvor ermittelten IC₅₀ verwendet. Die Kombination beider

Therapeutika zeigte synergistische Effekte, die eine Verstärkung der Wirkung der einzelnen HSP-Inhibitoren bewirkte. Eine weitere in-vitro Studie zum Kolonkarzinom zeigte ähnliche Ergebnisse⁵². Hierbei wurde eine kombinierte Therapie von VER155008 mit dem HSP90-Inhibitor VER82160 gewählt. Unter einer Kombinationstherapie zeigten die Zellen ein um 80% reduziertes Überleben im Vergleich zu 20% bei HSP90-Inhibition allein. Des Weiteren konnte unter kombinierter HSP70-HSP90-Inhibition eine gesteigerte Caspase3/7-Aktivität gemessen werden, die als Indiz für apoptotischer Vorgänge dient⁵². Die bisherigen Erkenntnisse lassen auf vielversprechend vielseitige Einsatzgebiete von VER15508 in der PCa-Tumorthherapie und vor allem in kombinierten Therapieansätzen hoffen.

6 Zusammenfassung

VER155008 konkurriert als ATP-Analogon um die Bindung an HSP70 und agiert hierbei als spezifischer Inhibitor dieses Hitzeschockproteins. Bisherige Studien konnten einen zytotoxischen Effekt von VER155008 auf verschiedene Tumorentitäten zeigen, die vielfältigen Wirkmechanismen bleiben bisher allerdings noch weitgehend ungeklärt. Hitzeschockproteine (HSPs) sind molekulare Chaperone, sie vermitteln korrekte Faltung, Stabilisierung, Transport und Abbau von Proteinen, regulieren Transkriptionsfaktoren und können auf Zellsignalkaskaden Einfluss nehmen. Diverse Tumorentitäten, wie auch das Prostatakarzinom (PCa) zeigen eine gesteigerte HSP-Expression. HSPs tragen durch antiapoptotische Effekte zur Proliferation, Invasion und Metastasierung des Tumors bei und können Resistenzmechanismen gegenüber Therapeutika im PCa vermitteln.

Diese Arbeit konnte zunächst einen wachstumshemmenden, konzentrationsabhängigen Effekt des HSP70-Inhibitors VER155008 auf die PCa-Zelllinien PC-3 und LNCaP nachweisen. Geeignete Wirkstoffkonzentrationen, um einen halbmaximalen inhibitorischen Effekt (IC_{50}) zu erzielen wurden in PC-3-Zellen bei $3\mu\text{M}$ und LNCaP-Zellen bei $10\mu\text{M}$ VER155008 ermittelt. Anschließende Proteinanalysen zeigten eine Modulation der Expression verschiedener HSPs, sowie des Androgenrezeptors (AR), einem zentralen Proliferationsfaktor des PCa, als Reaktion auf die HSP70-Inhibition. Untersucht wurde die Expression von HSP27, HSP70, HSP90 α/β , sowie der Co-Chaperone HSP40, HSP60 und HOP und des AR. Die Expression von HSP90 β , dem Bindungspartner des AR im AR-Multi-Chaperonkomplex, sowie HOP, seinem Co-Chaperon, wurde in beiden PCa-Zelllinien um bis zu 50% signifikant supprimiert. Zusätzlich zeigt sich eine um bis zu 70% supprimierte Expression von HSP27 nach VER155008-Behandlung beider PCa-Zelllinien im Vergleich zur Kontrolle. HSP27 ist ein wichtiges zytoprotektives Chaperon, dessen vermehrte Expression mit Therapieresistenzen gegenüber Docetaxel, sowie einer schlechten Prognose des PCa assoziiert wird. Es vermittelt die Translokation des AR in den Zellkern und reguliert dadurch die proliferative Wirkung der AR-Aktivierung. Die HSP70-Inhibierung zeigte zusätzlich eine signifikante Reduktion des AR um 40% in LNCaP-Zellen.

VER155008 zeigt sich als effektiver Wachstumsinhibitor des Prostatakarzinoms, der sowohl in der hormonsensitiven LNCaP-, als auch in der kastrationsresistenten PC-3-Zelllinie antiproliferative Wirkung zeigt, die unter anderem durch eine Modulation der Expression von Hitzeschockproteinen und des Androgenrezeptors vermittelt wird.

7 Anhang

Tabelle 7.1: Stadieneinteilung des PCa anhand der TNM-Klassifikation nach IUCC⁷

Tumorstadium nach TMN	Pathologie
T1	nicht tastbarer Tumor
T1a	PCa in <5% d. Resektionsspähne nach TURP
T1b	PCa in >5% d. Resektionsspähne nach TURP
T1c	Pca in Stanzbiopsie bei nicht tastbarem Tumor
T2	tastbarer Tumor, auf Prostata beschränkt
T2a	Befall von <50% eines Seitenlappens
T2b	Befall von >50% eines Seitenlappens
T2c	in beiden Seitenlappen vorkommend
T3	Tumor durchbricht Prostatakapsel
T3a	Durchbruch durch Prostatakapsel oder mikroskopische Infiltration des Harnblasenhalses
T3b	Samenblaseninfiltration
T4	Infiltration von Nachbarorganen: Harnblase, Rektum, Schließmuskel, Beckenwand
N	Lymphknotenbefall
N0	kein Lymphknotenbefall
N1	regionärer Lymphknotenbefall
M	Vorliegen von Metastasen
M1a	extraregionäre Lymphknoten-Metastasen
M1b	Knochenmetastasen
M1c	weitere Fernmetastasen



RESEARCH ARTICLE

The heat shock protein 70 inhibitor VER155008 suppresses the expression of HSP27, HOP and HSP90 β and the androgen receptor, induces apoptosis, and attenuates prostate cancer cell growth

Daniela Brännert¹ | Clara Langer² | Luise Zimmermann² | Ralf C. Bargou¹ | Martin Burchardt² | Manik Chatterjee¹ | Matthias B. Stope²

¹Comprehensive Cancer Center Mainfranken, Translational Oncology, University Hospital of Würzburg, Würzburg, Germany

²Department of Urology, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany

Correspondence

Daniela Brännert, PhD, Comprehensive Cancer Center Mainfranken, Translational Oncology, University Hospital of Würzburg, Versbacher Straße 5, Building E4 Room 4.07, 97078 Würzburg, Germany.
Email: Bruennert_D@ukw.de

Funding information

Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grant/Award Number: KFO216

Abstract

Heat shock proteins (HSPs) are molecular chaperones that play a pivotal role in correct folding, stabilization and intracellular transport of many client proteins including those involved in oncogenesis. HSP70, which is frequently overexpressed in prostate cancer (PCa), has been shown to critically contribute to tumor cell survival, and might therefore represent a potential therapeutic target. We treated both the androgen receptor (AR)-positive LNCaP and the AR-negative PC-3 cell lines with the pharmacologic HSP70 inhibitor VER155008. Although we observed antiproliferative effects and induction of apoptosis upon HSP70 inhibition, the apoptotic effect was more pronounced in AR-positive LNCaP cells. In addition, VER155008 treatment induced G1 cell cycle arrest in LNCaP cells and decreased AR expression. Further analysis of the HSP system by Western blot analysis revealed that expression of HSP27, HOP and HSP90 β was significantly inhibited by VER155008 treatment, whereas the HSP40, HSP60, and HSP90 α expression remained unchanged. Taken together, VER155008 might serve as a novel therapeutic option in PCa patients independent of the AR expression status.

KEYWORDS

antiproliferative, heat shock proteins, HSP70 inhibition, prostate cancer, VER155008

1 | INTRODUCTION

Despite progress in the diagnosis and treatment of prostate cancer (PCa), the most frequent malignancy and leading cause of oncological mortality for men in developed countries, the morbidity remains high. Thereby, the key risk factors for PCa occurrence and progression include genetic factors, increasing age and nutrition.¹ As PCa

growth and progression depends on androgen hormones like dihydrotestosterone, androgen deprivation therapy (ADT) is a primarily potent treatment in patients with advanced disease.² However, ADT resistance occurs in a large number of patients within 2 to 3 years, is known as incurable metastatic castration-resistant PCa (mCRPC), and is associated with a poor prognosis.³ Further targeting of the androgen receptor (AR) axis using novel therapeutics like abiraterone acetate and enzalutamide enhances survival for a limited time but also leads to resistance⁴ emerging from the development of new substances.

Daniela Brännert, Clara Langer, and Luise Zimmermann contributed equally.

8 Literaturverzeichnis

1. McNeal JE. The prostate and prostatic urethra: a morphologic synthesis. *J Urol.* 1972;107(6):1008-1016.
2. Manski D. *Urologielehrbuch.de: Ausgabe 2020.* 15. Auflage. Stadtbergen: Dirk Manski; 2020.
3. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms: Kurzversion 6.0,. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/prostatakarzinom/>. Accessed April 11, 2021.
4. Ackermann H. *AllEx - Alles fürs Examen: Das Kompendium für die 2. ÄP.* [S. 656-658]. 2. überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2014. <http://dx.doi.org/10.1055/b-003-125875>.
5. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol.* 1992;23(3):273-279.
6. Green GA, Hanlon AL, Al-Saleem T, Hanks GE. A Gleason score of 7 predicts a worse outcome for prostate carcinoma patients treated with radiotherapy. *Cancer.* 1998;83(5):971-976.
7. Wittekind C, Sobin LH, Klimpfinger M. *TNM-Atlas.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2005.
8. Charles Huggins and Clarence V. Hodges. Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *American Association for Cancer Research*:pp. 293-297.
9. NIH U.S. National Library of Medicine. ChemIDplus: Docetaxel. <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/114977-28-5>. Accessed January 7, 2021.
10. O'Donnell A, Judson I, Dowsett M, et al. Hormonal impact of the 17alpha-hydroxylase/C(17,20)-lyase inhibitor abiraterone acetate (CB7630) in patients with prostate cancer. *Br J Cancer.* 2004;90(12):2317-2325. doi:10.1038/sj.bjc.6601879.
11. Hellerstedt BA, Pienta KJ. The current state of hormonal therapy for prostate cancer. *CA Cancer J Clin.* 2002;52(3):154-179. doi:10.3322/canjclin.52.3.154.
12. Bahl A, Masson S, Birtle A, Chowdhury S, Bono J de. Second-line treatment options in metastatic castration-resistant prostate cancer: A comparison of key trials with recently approved agents. *Cancer Treat Rev.* 2014;40(1):170-177. doi:10.1016/j.ctrv.2013.06.008.

13. Enders P, Fiebrandt H-J, Doehn C, Hakenberg O, Höcht S, Weißbach L. Leitlinienprogramm Onkologie - Prostatakrebs II, lokal fortgeschrittenes und metastasiertes Prostatakarzinom: Ein evidenzbasierter Patientenratgeber zur S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. *Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF*. [Herausgeber: Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Stiftung Deutsche Krebshilfe]. 2015:Artikel-Nr. 184 0065. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-022OLp3_S3_Prostatakarzinom_2018-04.pdf. Accessed November 2, 2019.
14. Albany C, Hahn NM. Heat shock and other apoptosis-related proteins as therapeutic targets in prostate cancer. *Asian J Androl*. 2014;16(3):359-363. doi:10.4103/1008-682X.126400.
15. Lianos GD, Alexiou GA, Mangano A, et al. The role of heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett*. 2015;360(2):114-118. doi:10.1016/j.canlet.2015.02.026.
16. Ciocca DR, Arrigo AP, Calderwood SK. Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch Toxicol*. 2013;87(1):19-48. doi:10.1007/s00204-012-0918-z.
17. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*. 2005;10(2):86-103. doi:10.1379/csc-99r.1.
18. Calderwood SK, Gong J. Heat Shock Proteins Promote Cancer: It's a Protection Racket. *Trends Biochem Sci*. 2016;41(4):311-323. doi:10.1016/j.tibs.2016.01.003.
19. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*. 2009;14(1):105-111. doi:10.1007/s12192-008-0068-7.
20. Calderwood SK. Heat shock proteins in breast cancer progression--a suitable case for treatment? *Int J Hyperthermia*. 2010;26(7):681-685. doi:10.3109/02656736.2010.490254.
21. Murphy ME. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*. 2013;34(6):1181-1188. doi:10.1093/carcin/bgt111.

22. Kita K, Shiota M, Tanaka M, et al. Heat shock protein 70 inhibitors suppress androgen receptor expression in LNCaP95 prostate cancer cells. *Cancer Sci.* 2017;108(9):1820-1827. doi:10.1111/cas.13318.
23. Azad AA, Zoubeidi A, Gleave ME, Chi KN. Targeting heat shock proteins in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2015;26-36. doi:10.1038/nrurol.2014.320.
24. Zoubeidi A, Zardan A, Beraldi E, et al. Cooperative interactions between androgen receptor (AR) and heat-shock protein 27 facilitate AR transcriptional activity. *Cancer Res.* 2007;67(21):10455-10465. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2057.
25. Lee SW, Cho JM, Cho HJ, Kang JY, Kim EK, Yoo TK. Expression levels of heat shock protein 27 and cellular FLICE-like inhibitory protein in prostate cancer correlate with Gleason score sum and pathologic stage. *Korean J Urol.* 2015;56(7):505-514. doi:10.4111/kju.2015.56.7.505.
26. Stope MB, Weiss M, Preuss M, et al. Immediate and transient phosphorylation of the heat shock protein 27 initiates chemoresistance in prostate cancer cells. *Oncol Rep.* 2014;32(6):2380-2386. doi:10.3892/or.2014.3492.
27. Andrieu C, Taieb D, Baylot V, et al. Heat shock protein 27 confers resistance to androgen ablation and chemotherapy in prostate cancer cells through eIF4E. *Oncogene.* 2010;1883-1896. doi:10.1038/onc.2009.479.
28. Abazid A. *Enzalutamid-abhängige Modulation der Hitzeschockprotein- und Steroidrezeptorexpression in Prostatakarzinomzellen.* Greifswald: Universität Greifswald; 2017.
29. Rottach. *Zelluläre und molekulare Effekte von Cabazitaxel auf Prostatakarzinomzellen.* Greifswald: Universität Greifswald; 2015.
30. Weiss M, Ahrend H, Grossebrummel H, et al. Cytochrome P450 17A1 Inhibitor Abiraterone Acetate Counteracts the Heat Shock Protein 27's Cell Survival Properties in Prostate Cancer Cells. *Urol Int.* 2016;97(1):112-117. doi:10.1159/000445251.
31. Mao Y-W, Liu J-P, Xiang H, Li DW-C. Human alphaA- and alphaB-crystallins bind to Bax and Bcl-X(S) to sequester their translocation during staurosporine-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2004;11(5):512-526. doi:10.1038/sj.cdd.4401384.

32. Kamradt MC, Lu M, Werner ME, et al. The small heat shock protein alpha B-crystallin is a novel inhibitor of TRAIL-induced apoptosis that suppresses the activation of caspase-3. *J Biol Chem*. 2005;11059-11066. doi:10.1074/jbc.M413382200.
33. Voll EA, Ogden IM, Pavese JM, et al. Heat shock protein 27 regulates human prostate cancer cell motility and metastatic progression. *Oncotarget*. 2014;5(9):2648-2663. doi:10.18632/oncotarget.1917.
34. Stope MB, Schubert T, Staar D, et al. Effect of the heat shock protein HSP27 on androgen receptor expression and function in prostate cancer cells. *World J Urol*. 2012;30(3):327-331. doi:10.1007/s00345-012-0843-z.
35. Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003;228(2):111-133. doi:10.1177/153537020322800201.
36. McConnell JR, McAlpine SR. Heat shock proteins 27, 40, and 70 as combinational and dual therapeutic cancer targets. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(7):1923-1928. doi:10.1016/j.bmcl.2013.02.014.
37. Fan C-Y, Lee S, Cyr DM. Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones*. 2003;8(4):309-316.
38. Castilla C, Congregado B, Conde JM, et al. Immunohistochemical expression of Hsp60 correlates with tumor progression and hormone resistance in prostate cancer. *Urology*. 2010;76(4):1017.e1-6. doi:10.1016/j.urology.2010.05.045.
39. Xanthoudakis S, Roy S, Rasper D, et al. Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *EMBO J*. 1999;18(8):2049-2056. doi:10.1093/emboj/18.8.2049.
40. Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J*. 1999;18(8):2040-2048. doi:10.1093/emboj/18.8.2040.
41. Sherman MY, Gabai VL. Hsp70 in cancer: back to the future. *Oncogene*. 2015;34(32):4153-4161. doi:10.1038/onc.2014.349.
42. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1997;17(9):5317-5327. doi:10.1128/mcb.17.9.5317.

43. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CPZ, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem*. 2005;280(46):38729-38739. doi:10.1074/jbc.M509497200.
44. Guo F, Sigua C, Bali P, et al. Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood*. 2005;105(3):1246-1255. doi:10.1182/blood-2004-05-2041.
45. Braig M, Schmitt CA. Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer Res*. 2006;66(6):2881-2884. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4006.
46. Gabai VL, Yaglom JA, Waldman T, Sherman MY. Heat shock protein Hsp72 controls oncogene-induced senescence pathways in cancer cells. *Mol Cell Biol*. 2009;559-569. doi:10.1128/MCB.01041-08.
47. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*. 2009;136(5):823-837. doi:10.1016/j.cell.2009.02.024.
48. Ischia J, Saad F, Gleave M. The promise of heat shock protein inhibitors in the treatment of castration resistant prostate cancer. *Curr Opin Urol*. 2013;23(3):194-200. doi:10.1097/MOU.0b013e32835e9f1a.
49. Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(10):761-772. doi:10.1038/nrc1716.
50. Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, et al. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J*. 2000;19(16):4310-4322. doi:10.1093/emboj/19.16.4310.
51. Chandrasekar T, Yang JC, Gao AC, Evans CP. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Transl Androl Urol*. 2015;4(3):365-380. doi:10.3978/j.issn.2223-4683.2015.05.02.
52. Massey AJ, Williamson DS, Browne H, et al. A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;66(3):535-545. doi:10.1007/s00280-009-1194-3.
53. Schlecht R, Scholz SR, Dahmen H, et al. Functional analysis of Hsp70 inhibitors. *PLoS ONE*. 2013;8(11):e78443. doi:10.1371/journal.pone.0078443.

54. Kim SH, Kang JG, Kim CS, et al. The hsp70 inhibitor VER155008 induces paraptosis requiring de novo protein synthesis in anaplastic thyroid carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;454(1):36-41. doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.060.
55. Budina-Kolomets A, Balaburski GM, Bondar A, Beeharry N, Yen T, Murphy ME. Comparison of the activity of three different HSP70 inhibitors on apoptosis, cell cycle arrest, autophagy inhibition, and HSP90 inhibition. *Cancer Biol Ther*. 2014;15(2):194-199. doi:10.4161/cbt.26720.
56. Shervington L, Patil H, Shervington A. Could the Anti-Chaperone VER155008 Replace Temozolomide for Glioma Treatment. *J Cancer*. 2015;6(8):786-794. doi:10.7150/jca.12251.
57. Powers MV, Clarke PA, Workman P. Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis. *Cancer Cell*. 2008;14(3):250-262. doi:10.1016/j.ccr.2008.08.002.
58. Tang X, Tan L, Shi K, et al. Gold nanorods together with HSP inhibitor-VER-155008 micelles for colon cancer mild-temperature photothermal therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2018;8(4):587-601. doi:10.1016/j.apsb.2018.05.011.
59. SelleckChem. Product Information VER155008. <https://www.selleckchem.com/products/ver155008.html>. Accessed April 11, 2021.
60. Brünnert D, Langer C, Zimmermann L, et al. The heat shock protein 70 inhibitor VER155008 suppresses the expression of HSP27, HOP and HSP90 β and the androgen receptor, induces apoptosis, and attenuates prostate cancer cell growth. *J Cell Biochem*. 2020;121(1):407-417. doi:10.1002/jcb.29195.
61. Gibbons NB, Watson RW, Coffey RN, Brady HP, Fitzpatrick JM. Heat-shock proteins inhibit induction of prostate cancer cell apoptosis. *Prostate*. 2000;45(1):58-65.
62. Centenera MM, Gillis JL, Hanson AR, et al. Evidence for efficacy of new Hsp90 inhibitors revealed by ex vivo culture of human prostate tumors. *Clin Cancer Res*. 2012;18(13):3562-3570. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0782.
63. He S, Zhang C, Shafi AA, et al. Potent activity of the Hsp90 inhibitor ganetespib in prostate cancer cells irrespective of androgen receptor status or variant receptor expression. *Int J Oncol*. 2013;42(1):35-43. doi:10.3892/ijo.2012.1698.
64. Vetter IR, Wittinghofer A. Nucleoside triphosphate-binding proteins: different scaffolds to achieve phosphoryl transfer. *Q Rev Biophys*. 1999;32(1):1-56.

65. Chène P. ATPases as drug targets: learning from their structure. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(9):665-673. doi:10.1038/nrd894.
66. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1982;1(8):945-951.
67. Moodie SL, Thornton JM. A study into the effects of protein binding on nucleotide conformation. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(6):1369-1380.
68. Macias AT, Williamson DS, Allen N, et al. Adenosine-derived inhibitors of 78 kDa glucose regulated protein (Grp78) ATPase: insights into isoform selectivity. *J Med Chem.* 2011;54(12):4034-4041. doi:10.1021/jm101625x.
69. Massey AJ. ATPases as drug targets: insights from heat shock proteins 70 and 90. *J Med Chem.* 2010;53(20):7280-7286. doi:10.1021/jm100342z.
70. Wang H, Song Y, Hao D, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction combined with dual targeting of HSP72 and HSC70 inhibits HSP90 function and induces extensive tumor-specific apoptosis. *Int J Oncol.* 2014;45(1):157-164. doi:10.3892/ijo.2014.2388.
71. Viswanath ANI, Lim JW, Seo SH, Lee JY, Lim SM, Pae AN. GRP78-targeted in-silico virtual screening of novel anticancer agents. *Chem Biol Drug Des.* 2018. doi:10.1111/cbdd.13322.
72. Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods.* 2005;35(4):373-381. doi:10.1016/j.ymeth.2004.10.010.
73. Wen W, Liu W, Shao Y, Chen L. VER-155008, a small molecule inhibitor of HSP70 with potent anti-cancer activity on lung cancer cell lines. *Exp Biol Med (Maywood).* 2014;239(5):638-645. doi:10.1177/1535370214527899.
74. Zimmermann L. *Antiproliferative und apoptotische Wirkung des Hitzeschockprotein 70 Inhibitors VER155008 auf Prostatakarzinomzellen.* Greifswald: Universität Greifswald; 2017.
75. Dittmar KD, Banach M, Galigniana MD, Pratt WB. The role of DnaJ-like proteins in glucocorticoid receptor.hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90.p60.hsp70 foldosome complex. *J Biol Chem.* 1998;273(13):7358-7366.

76. Tang D, Khaleque MA, Jones EL, et al. Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma in vitro and in tumors in vivo. *Cell Stress Chaperones*. 2005;10(1):46-58.
77. Alaiya AA, Oppermann M, Langridge J, et al. Identification of proteins in human prostate tumor material by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58(2):307-311.
78. Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ, McGuire WL. Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85(7):570-574.
79. Hwang TS, Han HS, Choi HK, et al. Differential, stage-dependent expression of Hsp70, Hsp110 and Bcl-2 in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003;18(6):690-700.
80. Calderwood SK, Xie Y, Wang X, et al. Signal Transduction Pathways Leading to Heat Shock Transcription. *Sign Transduct Insights*. 2010;2:13-24. doi:10.4137/STI.S3994.
81. Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11:441-469. doi:10.1146/annurev.cb.11.110195.002301.
82. Kabakov AE, Gabai VL. Cell Death and Survival Assays. *Methods Mol Biol*. 2018;1709:107-127. doi:10.1007/978-1-4939-7477-1_9.
83. Shan Y-X, Liu T-J, Su H-F, Samsamshariat A, Mestril R, Wang PH. Hsp10 and Hsp60 modulate Bcl-2 family and mitochondria apoptosis signaling induced by doxorubicin in cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35(9):1135-1143.
84. Ghosh JC, Siegelin MD, Dohi T, Altieri DC. Heat shock protein 60 regulation of the mitochondrial permeability transition pore in tumor cells. *Cancer Res*. 2010;70(22):8988-8993. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2225.
85. Ghosh JC, Dohi T, Kang BH, Altieri DC. Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *J Biol Chem*. 2008;283(8):5188-5194. doi:10.1074/jbc.M705904200.
86. Ozgur A, Tutar Y. Heat Shock Protein 90 Inhibitors in Oncology. *CP*. 2014;11(1):2-16. doi:10.2174/1570164611666140415224635.
87. Powers MV, Workman P. Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13 Suppl 1:S125-35. doi:10.1677/erc.1.01324.
88. Fortugno P, Beltrami E, Plescia J, et al. Regulation of survivin function by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(24):13791-13796. doi:10.1073/pnas.2434345100.

89. Mimnaugh EG, Xu W, Vos M, et al. Simultaneous inhibition of hsp 90 and the proteasome promotes protein ubiquitination, causes endoplasmic reticulum-derived cytosolic vacuolization, and enhances antitumor activity. *Mol Cancer Ther.* 2004;3(5):551-566.
90. Shiota M, Fujimoto N, Imada K, et al. Potential Role for YB-1 in Castration-Resistant Prostate Cancer and Resistance to Enzalutamide Through the Androgen Receptor V7. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(7). doi:10.1093/jnci/djw005.
91. Rocchi P, So A, Kojima S, et al. Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 2004;64(18):6595-6602. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3998.
92. Grem JL, Morrison G, Guo X-D, et al. Phase I and pharmacologic study of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin in adult patients with solid tumors. *J Clin Oncol.* 2005;23(9):1885-1893. doi:10.1200/JCO.2005.12.085.
93. Guo F, Rocha K, Bali P, et al. Abrogation of heat shock protein 70 induction as a strategy to increase antileukemia activity of heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-demethoxy geldanamycin. *Cancer Res.* 2005;65(22):10536-10544. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1799.
94. Chatterjee M, Andrulis M, Stühmer T, et al. The PI3K/Akt signaling pathway regulates the expression of Hsp70, which critically contributes to Hsp90-chaperone function and tumor cell survival in multiple myeloma. *Haematologica.* 2013;98(7):1132-1141. doi:10.3324/haematol.2012.066175.