

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

Thema: Regulation und Funktionalität des Hitzeschockproteins HSP60 in
Prostatakarzinomzellen

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2013

vorgelegt von:
Andreas Streitbürger
geb. am: 02.02.1979
in: Coesfeld

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reiner Biffar

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Burchardt

2. Gutachter: PD Dr. Frank v. Dorp

(3. Gutachter:)

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum L02.22 der Klinik und Poliklinik für
Chirurgie, Sauerbruchstr., 17475 Greifswald

Tag der Disputation: 26.08.2014

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	5
1.1 Funktion der Prostata.....	5
1.2 Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms.....	5
1.2.1 Konventionelle antihormonelle Therapie	7
1.2.2 Chemotherapie.....	7
1.2.3 PCa-Therapeutika der neuen Generation.....	8
1.3 Therapieresistenzen.....	9
1.4 Hitzeschockproteine und Chemoresistenzen.....	10
1.5 Zielsetzung.....	10
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Geräte.....	11
2.2 Verbrauchsmaterial.....	11
2.3 Chemikalien	12
2.4 Puffer und Lösungen.....	13
2.5 Kommerzielle Lösungen.....	17
2.6 Kits.....	18
2.7 Enzyme	18
2.8 Antikörper.....	18
2.9 Primer	19
2.10 Vektoren.....	20
2.11 Antibiotika	20
2.12 Zelllinien.....	20
2.13 Medien und Zusätze für Zellkultur	20
2.14 Zellbiologische Methoden	21
2.15 Molekularbiologische Methoden.....	22
3 Ergebnisse.....	33
3.1 Analyse potentieller Bindungspartner von HSP60	33

3.1.1 Klonierung eines bakteriellen Expressionsvektors zur Synthese von GST-HSP60-Fusionsproteinen	33
3.1.2 Identifizierung potentieller HSP60-Bindungspartner mittels Pull-Down Assay.....	35
3.1.3 Evaluierung ausgewählter potentieller Bindungspartner von HSP60.....	38
3.2 Modulation der HSP60-Expression in PCa-Zellen.....	39
3.2.1 Klonierung von HSP60-Expressionsvektoren.....	39
3.2.2 Überexpression von HSP60 in transfizierten PCa-Zellen	40
3.2.3 Klonierung eines HSP60-Knock-Down-Vektors.....	41
3.2.4 Knock-Down von HSP60 in transfizierten PCa-Zellen	43
3.3 Regulation der HSP60-Expression durch den AR-Liganden Dihydrotestosteron (DHT)	44
3.4 Regulation der HSP60-Expression durch den Tumorsuppressor mikroRNA-1 (miR-1)	45
4 Diskussion	46
5 Zusammenfassung	50
6 Literaturverzeichnis	51
7 Abkürzungsverzeichnis.....	55
8 Eidesstattliche Erklärung	57
9 Lebenslauf	58
10 Danksagung	59
11 Anhang	60

1 Einleitung

1.1 Funktion der Prostata

Die Prostata ist eine exokrine Drüse, die zu den vier akzessorischen Geschlechtsdrüsen des Mannes gehört. Sie liegt mit ihrer Basis der Harnblase an und bildet einen Teil der Harnröhre, in die sie mit ihrem Apex übergeht. Im prostatistischen Teil der Harnröhre münden im Samenhügel die gemeinsamen Ausführungsgänge der Samenblasen und des Samenleiters. Unmittelbar benachbart liegen die beiden Samenblase und der Enddarm [1, 2]. Zur Funktion der Prostata gehört die Produktion und Exkretion eines sauren Sekretes welches Spermin, zahlreiche Enzyme und das prostataspezifische Antigen (PSA) enthält. Das Ejakulat des Mannes besteht zu ca. 30% aus den Sekreten der Prostata. Durch das biogene Amin Spermin kommt es zu einer Mobilitätssteigerung der Spermien, die Serinprotease PSA verflüssigt das Ejakulat durch die Spaltung bestimmter Eiweiße und der nur leicht saure pH-Wert erhöht durch Neutralisation des stärker sauren Milieus in der Vagina die Überlebenschance der Spermien [3]. Die Kontrolle von Wachstum und Funktion der Prostata geschieht über das in den Hoden in den Leydigischen Zwischenzellen produzierte Hormon Testosteron und seine durch 5alpha-Reduktase umgewandelte und aktivere Form Dihydrotestosteron [4, 5]. Die Ausschüttung von Testosteron wiederum wird induziert durch das in der Hypophyse produzierte lutenisierende Hormon (LH), dessen Synthese wiederum durch das Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) aus dem Hypothalamus induziert wird. Zusätzlich besteht durch das Vorhandensein von Testosteron ein negativer Rückkopplungsmechanismus auf die Ausschüttung der zuvor genannten Hormone. Die Prostata unterliegt in Ihrer Funktion somit einem Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden Regelkreislauf.

1.2 Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom (PCa) ist die häufigste Krebserkrankung und die dritthäufigste krebsabhängige Todesursache des Mannes in der westlichen Welt [6]. Eine Verdachtsdiagnose ergibt sich aus einem auffälligen digital rektalem Tastbefund und/oder Erhöhung der Konzentration des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) im Blut [7]. Die Diagnosesicherung erfolgt durch Ultraschall-gestützte Biopsien aus der Prostata sowie der feingeweblichen Aufarbeitungen der entnommenen Proben.

Dabei wird das Karzinom anhand seiner mikroskopisch sichtbaren Zellveränderungen in einen Score (Gleason-Score) eingeordnet, welcher im Endeffekt in Zusammenhang mit dem PSA-Wert maßgebend für Beginn und Art einer Therapie ist [8, 9]. Es ist jedoch bekannt, dass sowohl die Bestimmung des PSA-Wertes als auch die Einteilung in den Gleason-Score ungenau sind und somit keine sicheren Aussagen über die Aggressivität des PCa ermöglichen [7, 10, 11]. Daher ist anzunehmen, dass viele Männer bezüglich des PCa behandelt werden, bei denen die Erkrankung vermutlich nie zu gesundheitlichen Problemen geführt hätte [12, 13]. Es ist allerdings aktuell noch nicht möglich die problematischen und im Endeffekt tödlichen Krankheitsverläufe von den unkomplizierten Verläufen zu trennen. Ist die Diagnose jedoch gestellt stehen verschiedene Therapieverfahren zur Verfügung [9]. Es besteht zu einem die Möglichkeit nichts zu tun und nur beim Auftreten von Symptomen zu handeln (watchful waiting) [14] bzw. eine regelmäßige Überwachung des Krebsstadiums durch Kontrolle des PSA-Wertes und Re-Biopsien (active surveillance) [15] durchführen zu lassen und ggfs. eine Therapie einzuleiten. Ferner lässt sich in der heutigen Zeit mittels operativen und radiologischen Verfahren kurativ therapieren. Dies trifft jedoch nur zu wenn das Karzinom in einem frühen nicht metastasiertem und lokal begrenztem Stadium entdeckt wird [16]. Ist bereits eine Metastasierung oder ein organüberschreitendes Wachstum eingetroffen stehen verschiedene zeitweise parallele zeitweise hintereinandergeschaltete palliative Therapien zur Verfügung. Da bekannt ist, dass das Prostatakarzinom in Abhängigkeit einer Stimulation durch Testosteron wächst ist der erste Schritt der Therapie ein medikamentöser oder operativer Testosteronentzug. Dieses kann durch Entfernung der hormonproduzierenden Organe (Orchiektomie bds.), durch Blockade der Rezeptoren (direkte Antiandrogene), durch Modulation des hormonellen Regelkreislaufes bzw. durch Hemmung der Hormonsynthese (GnRH-Agonisten, GnRH-Antagonisten) geschehen. Bei weiterem Progress der Erkrankung stehen aktuell noch zwei Chemotherapeutika (Docetaxel und Cabazitaxel) [17, 18] und seit kurzem auch Antiandrogene der neueren Generation (Abirateron, Enzalutamid) [19] zur Verfügung. Zusätzlich befinden sich bereits neuere experimentelle Wirkstoffe (OGX-427, OGX-011, MJC13) [19] in der klinischen Erprobung.

1.2.1 Konventionelle antihormonelle Therapie

Zur aktuell etablierten antihormonellen Therapie gehören zu einem die direkten Antiandrogene (Bicalutamid, Cyproteronacetat und Flutamid) sowie GnRH-Agonisten (Leuprorelinacetat) und GnRH-Antagonisten (Degarelix, Abarelix)[20, 21].

Leuprorelinacetat ist ein synthetisches Analogon des natürlich vorkommenden hypothalamischen „Releasing-Faktors“ LHRH, der die Freisetzung der gonadotropen Hormone LH und FSH aus dem Hypophysenvorderlappen kontrolliert. Die Wirkung erfolgt über eine Besetzung der Rezeptoren was nach kurzzeitiger Stimulation zu einer paradoxen Desensibilisierung der Rezeptoren und somit zu einer verminderten Ausschüttung von LH und FSH führt. Der Effekt ist dadurch zu erklären, dass es bei diesen Medikamenten, im Gegensatz zur physiologischen pulsatilen Aktivierung der Rezeptoren, zu einer kontinuierlichen Aktivierung der Rezeptoren kommt, welches letztendlich eine Desensibilisierung zur Folge hat [22].

Degarelix und Abarelix sind selektive GnRH-Antagonisten welche kompetitiv und reversibel an die hypophysären GnRH-Rezeptoren binden. Dadurch kommt es zu einer schnellen Reduktion der Ausschüttung von LH und FSH und somit zu einer verminderten Produktion und Ausschüttung von Testosteron. Im Gegensatz zu den GnRH-Agonisten kommt es bei diesen Medikamenten nicht zu einer initialen Stimulation der LH - und FSH-Ausschüttung [23].

Die direkten nichtsteroidalen Antiandrogene Bicalutamid und Flutamid blockieren die Funktion des Androgenrezeptors durch kompetitive Hemmung [24, 25], während das steroidale Antiandrogen Cyproteronacetat zusätzlich noch Enzyme in der Androgenbiosynthese hemmt [26].

1.2.2 Chemotherapie

Als Chemotherapeutika des PCa sind aktuell die beiden Zytostatika Docetaxel und Cabazitaxel zugelassen.

Docetaxel ist ein halbsynthetisches Taxan, welches seine Wirkung durch Bindung an die Mikrotubuli vermittelt. Die Mikrotubuli sind Filamente des Zytosklettes eukaryoter Zellen, die nach Bindung von Docetaxel verstärkt polymerisieren und somit zu einem Arrest der Zellen in der G2-Phase der Mitose mit folgender Apoptose der proliferierenden Zellen führen. Zusätzlich ist für die Taxane eine verminderte

Translokation des AR in den Nukleus der Zellen und somit eine verminderte Androgenwirkung auf die Prostatakarzinomzellen sowie eine Antagonisation der antiapoptotischen Wirkung des Proto-Onkogens Bcl-2 beschrieben [27, 28].

Cabazitaxel ist auch ein halbsynthetisches Taxan, welches eine, ebenfalls durch Bindung an Mikrotubuli vermittelte, Wirksamkeit auf Docetaxel resistente Zellen besitzt [29, 30].

1.2.3 PCa-Therapeutika der neuen Generation

Bei manifester Taxan-Resistenz bleibt als letzte Behandlungsoption die Anwendung von PCa-Medikamenten der neueren Generation. Zu diesen gehören die in Deutschland bereits zugelassenen antiandrogenen Wirkstoffe Abirateron und Enzalutamid, beides Inhibitoren der Steroid-Synthese. Darüber hinaus sind aber auch noch weitere hoffnungsvolle Wirkstoffe in der Entwicklung. So z.B. Inhibitoren des Hitzeschockproteins HSP27 (OGX-427), des zytoprotektiven Faktors Clusterin (OGX-011) und des AR Ko-Faktors FKBP52 (MJC13).

Abirateron wirkt durch eine selektive Inhibition des Enzyms 17alpha-Hydroxylase/C17,20-lyase (CYP17). Dieses Enzym ist für die Androgenbiosynthese von entscheidender Bedeutung. CYP17 katalysiert die Umwandlung von Pregnenolon bzw. Progesteron in die Testosteron-Vorstufen Dehydroepiandrosteron (DHEA) bzw. Androstendion durch 17alpha-Hydroxylierung und Spaltung der C17,20-Bindung. Somit ist eine Androgenbiosynthese nicht möglich [31].

Enzalutamid ist ein starker Inhibitor des Androgenrezeptor-Signalweges welcher seine Wirkung über die Blockade mehrerer Schritte in diesem Signalweg entfaltet. Es kommt zu einer kompetitiven Hemmung der Androgenbindung an den AR sowie zu einer Unterbindung der Translokation aktiver Rezeptoren in den Nukleus. Zusätzlich wird die Bindung dieser an die DNA und die Rekrutierung von Co-Faktoren für die Transkription inhibiert. Dies führt zu einer Verringerung des Wachstums der Prostatakarzinomzellen, zu einer Induktion des Zelltodes und somit letztendlich zu einer Tumorregression [32, 33].

OGX-427 ist ein antisense Oligonukleotid welches die Expression von HSP27 inhibiert. Es induziert Apoptose und Tumorwachstum und hemmt die Aktivität des AR. Zudem erhöht eine HSP27-Inhibition die proteasom-vermittelte AR-Degeneration und

erniedrigt somit die Transkriptionsaktivität des Rezeptors [34]. Es befindet sich aktuell in einer klinischen Phase II Studie (Pacific).

HSP90-Inhibitoren sind ein vielversprechende Substanzklasse zur Behandlung des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms. Dabei kommt im Rahmen der Wirkungskaskade zu einer Stress-Antwort, welche, unter anderem über Clusterin (CLU), das Tumorzellüberleben und eine Resistenzentwicklung fördert. OGX-011 ist ein antisense drug welches CLU als Target hat und dieses inhibiert. Darunter kommt es zu einer erhöhten Wirkung der HSP90-Inhibitoren und synergistisch zu einem Rückgang der Transkriptionsaktivität des Hitzeschockfaktors-I (HSF-1) sowie zu einer verminderten Expression von Hitzeschockproteinen, der Proteinkinase, Akt, AR und PSA [35]. Es befindet sich aktuell in einer klinischen Phase III Studie (AFFINITY).

Das 52kDa große Fk506 Bindungsprotein (FKBP52) ist ein wichtiger positiver Regulator des Androgenrezeptors. Die Substanz MJC13 inhibiert die hormonabhängige Aufspaltung des HSP90-FKBP52-AR-Komplexes so dass weniger hormonegebundener Rezeptor im Nukleus vorliegt und es somit zu einer verringerten AR-Funktion kommt [36].

Jedoch auch bei den Wirkstoffen der neuen Generation zeigen klinische Studien der Phase II und III und erste klinische Erfahrungen ein Auftreten primärer und sekundärer Resistenzen gegenüber den Wirkstoffen [37].

1.3 Therapieresistenzen

Allen palliativen Therapieoptionen ist gemein, dass sie in der Regel eine monate- bis jahrelange Wirksamkeit zeigen, es dann jedoch zu einem erneuten Anstieg des PSA-Wertes und zum Progress der Erkrankung kommt [37, 38]. Zusätzlich gibt es Primärresistenzen, bei denen die Behandlung von Anfang an nicht anspricht. Somit muss es Modulationen im intrazellulären Stoffwechsel geben, die Resistenzen bereitstellen oder zu deren Entwicklung führen. Die vielfältigen molekularbiologischen Ansätze der neuesten Therapien und die trotzdem weiterhin bestehende Resistenzentwicklung zeigen, dass die Tumorbilogie des Prostatakarzinoms noch nicht ausreichend verstanden ist. Eine genaue Betrachtung der Stoffwechselwege und der daran beteiligten Faktoren in PCa-Zellen ist dazu nötig. Ein wichtiger Faktor der Entwicklung von Resistenzen und von alternativen Wachstumsfaktoren in

Prostatakarzinomzellen sind Hitzeschockproteine. So führt z.B. die Inhibition von HSP27 zu einer erhöhten Chemotherapie-Sensibilität in Prostatakarzinomzellen [39] und für HSP60 sind pro- und antiapoptotische Effekte in anderen Entitäten beschrieben worden [40-43].

1.4 Hitzeschockproteine und Chemoresistenzen

Hitzeschockproteine sind ubiquitär vorkommende Proteine, die vermehrt bei toxischen Einflüssen (z.B. Hitze, Ethanol-Belastung, Schwermetallbelastung, ultraviolette Strahlung) von Zellen gebildet werden [44]. Sie dienen anderen Proteinen in dieser Streßsituation als Hilfe bei der Faltung, stabilisieren Proteine [45] und beschleunigen durch das Proteasom den Abbau funktionsunfähiger Proteine [46]. Durch Steuerung des Protein turn-overs und von Transportprozessen sind HSPs auch wichtige Faktoren von zellulären Signalwegen und bei Zellantworten [47]. Eingeteilt werden die Hitzeschockproteine nach ihrer Molekülmasse. Dabei lassen sich kleine Hitzeschockproteine mit einer Molekülmasse von 12 bis 45 kDa von den größeren Hitzeschockproteinen wie z.B. HSP60, HSP70, HSP90 und HSP105 abgrenzen. Von besonderem Interesse im intrazellulären Stoffwechsel maligner Zellen ist das HSP60, welches in eukaryoten Zellen überwiegend, jedoch nicht ausschließlich in den Mitochondrien vorliegt. Dieses Protein ist ein wichtiger Effektor der Apoptose und wird in PCa-Zellen verstärkt exprimiert [48-50]. Im Verlauf der Progression kommt es zu einer Herunterregulation [51, 52]. Immunhistologische Untersuchungen deuten ferner an, dass HSP60 regulative Funktionen bei Progression und Therapie-Resistenzen besitzt [53, 54]. In anderen Organen sind sowohl zytoprotektive [40, 41] als auch pro-apoptotische [42, 43] Effekte von HSP60 beschrieben worden, in PCa-zellen ist die Funktion dieses apoptotischen HSP's noch weitgehend ungeklärt.

1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Regulation und Funktionen des apoptotischen Faktors HSP60 in PCa-Zellen zu untersuchen, HSP60-abhängige Signal- und Effektor-kaskaden zu identifizieren und diese schließlich hinsichtlich potentieller Marker und pharmakologischer Targets zu charakterisieren. Zudem sollten die Untersuchungen aufklären, ob HSP60 im Kontext von PCa-Zellen pro- oder anti-apoptotische Eigenschaften besitzt.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
4800 MALDI-ToF/ToF™ Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, USA
Dokumentationseinheit ChemiDoc XRS+	Bio-Rad, München
Heizblock QBT 1	CLF analytische Laborgeräte, Elmersacher
Magnetrührer Magnetic Stirrer R 1000	Carl Roth, Karlsruhe
Neubauer-Zellzählkammer	Carl Roth, Karlsruhe
pH-Meter	Denver Instrument, Göttingen
Pipettensatz 0,5 – 1000 µl	Biohit, Rosbach v.d.H.
Reinstwasseranlage Milli-Q®	Millipore, Billerica, USA
Rotilabo®-Mikrozentrifuge	Carl Roth, Karlsruhe
Schüttler Vibramax 100	Heidolph Instruments, Schwabach
SDS-PAGE-Zubehör 8x8 cm	Bio-Rad, München
SDS-PAGE-Zubehör 20x20 cm	Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
Spektralphotometer Nano-Drop 2000c	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Stromversorgungsgerät PowerPack™	Bio-Rad, München
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell	Bio-Rad, München
Überkopfschüttler Multi Bio RS-24	BioSan, Riga, Lettland
Ultraschallbad Transsonic 460/H	Elma, Singen (Hohentwiel)
Vakuumpumpe Vacusip	Integra Biosciences, Fernwald
Vakuumentrifuge Concentrator plus	Eppendorf, Hamburg
Waage	KERN & Sohn GmbH
Wasserbad W14	Grant Instruments, Cambridge, Großbritannien
Wippschüttler UNITWIST-RT	Armin Baack, Schwerin
Zentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge PerfectSpin P	Peqlab, Erlangen
Zentrifuge Jouan MR1822	Jouan, Unterhaching

2.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
15 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
50 ml Falcon®	BD Biosciences, Heidelberg
Acryl-Einmalküvette	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier	Whatman, Dassel
Filterspitzen SafeSeal Tips Professional	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Gewebekulturflasche 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturschale Cell ⁺ 78 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturschale Cell ⁺ 9,6 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht

Glaspasteurpipette	VWR International, Darmstadt
Kapillarspitze MultiFlex Round Tip	BioScience, Salt Lake City, USA
Kryo-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
MS-Reaktionsgefäß	Sorenson BioScience, Salt Lake City, USA
Nitrilhandschuhe Micro-Touch® Nitra-Tex®	Ansell Healthcare, Brüssel, Belgien
Nitrozellulosemembran PROTRAN®	Whatman, Dassel
Petrischale	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitze	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 2 ml, SafeSeal	Sarstedt, Nümbrecht
Schutzhandschuhe Sterling Nitrile KC300	Kimberly-Clark, Roswell, US
Serologische Pipette	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatte CELL ⁺ 6 well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
ZipTip® Pipette Tips	Millipore, Billerica, USA

2.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1,4-Dithiothreitol	Carl Roth, Karlsruhe
1-Brom-3-Chlorpropan	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Acetonitril für MS	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Feinchemie K.-H. Kallies KG, Sebnitz
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Complete™ Mini, EDTA-frei	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie® Brilliant Blue G 250	Fluka, Buchs, Schweiz
D(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
DEPC	Carl Roth, Karlsruhe
Desoxycholsäure Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
DHT	Sigma-Aldrich, München
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III)	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
Guanidinhydrochlorid	AppliChem, Darmstadt
Harnstoff	Carl Roth, Karlsruhe

HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Ferak, Berlin
LB-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth, Karlsruhe
LE-Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Luminol Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
MOPS	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nonidet™ P-40	Sigma-Aldrich, Steinheim
ortho-Phosphorsäure	Carl Roth, Karlsruhe
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
PMSF	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution	iNtRON biotechnology, Seongnam, Südkorea
SDS	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Thioharnstoff	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Triton® X-100	Ferak, Berlin
Trypsin, Sequencing Grade	Promega, Madison, USA
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.4 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben wurden Puffer und Lösungen in A. bidest angesetzt.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10 % SDS	10 % w/v SDS-Pellets
10x Laufpufferstocklösung	192 mM Glycin 24,8 mM Tris pH 8,3
1x SDS-Laufpuffer	10 % v/v 10x Laufpufferstocklösung 0,1 % v/v 10 % SDS
10x PBS	1,37 M NaCl

	26,8 mM KCl 101,1 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 17,6 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
10x Saccharose-Stopper	0,2 M EDTA 25 % w/v Saccharose 0,25 % w/v Bromphenolblau
10x TBS	0,2 M Tris 1,5 M NaCl pH 7,6
TBS-T	10 % v/v 10x TBS 0,1 % v/v Tween 20
50x TAE-Puffer	2 M Tris 0,057 % v/v Essigsäure 50 mM EDTA
1x TAE-Puffer	0,02 % v/v 50x TAE
2D-Lysepuffer	8 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 65 mM CHAPS 130 mM DTT 80 mM Tris
5x Proteinladepuffer	156 mM Tris, pH 6,8 25 % v/v Glycerol 5 % v/v SDS 12,5 % v/v β-Mercaptoethanol 0,2 % w/v Bromphenolblau
Agarosegellösung 1 %	1 % w/v LE-Agaroses 0,0001 % v/v RedSafe in 1x TAE-Puffer
Ampicillin-Stocklösung	50 mg Ampicillin in 1 ml A. bidest
Antikörperlösung	5 % w/v BSA 10 % v/v 10x TBS 0,001 v/v Tween-20
Äquilibrierungspuffer	0,2 M Natriumacetat in 20 % Ethanol
Blockierlösung	10 % v/v Rotiblock 10x Konzentrat

Bradford-Reagenz	10 % w/v Coomassie® Brilliant Blue G 250 5 % v/v Ethanol 8,5 % v/v H ₃ PO ₄
BSA-Standard in 2D-Lysepuffer	100 % w/v BSA in 2D-Lysepuffer
BSA-Standard in A. bidest	100 % w/v BSA
Coomassie-Entfärbelösung	10 % v/v Ethanol (96 %) 2 % v/v ortho-Phosphorsäure (100 %)
Coomassie-Färbelösung	0.02 % w/v Coomassie Brilliant Blue G250 5 % w/v Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat 10 % v/v Ethanol (96 %) 2 % v/v ortho-Phosphorsäure (100 %)
DEPC-Wasser	0,1 % v/v DEPC autoklaviert
ECL-Lösung A	25 % w/v Luminol Natriumsalz in 0,1 M Tris, pH 8,6
ECL-Lösung B	110 % w/v para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO
Elutionspuffer	200 mM Glycin 0,2 % w/v SDS 0,1 % v/v Tween-20 in 100mM Tris-HCl, pH 6,8
Ethanolamin	0,1 M Ethanolamin pH 8,2
Guanidinhydrochlorid	0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95 % Ethanol
Iodacetamidlösung	100 mM Iodacetamid in 20 mM Ammoniumhydrogencarbonat
Kompetenzlösung 1	2 M KCl 0,5 M Kaliumacetat 180 mM CaCl ₂ 0,5 M Manganchlorid x4H ₂ O 15 % v/v Glycerol steril filtriert
Kompetenzlösung 2	0,5 M MOPS 1 M KCl 0,5 M CaCl ₂ x 2H ₂ O 15 % v/v Glycerol

LB-Agar	40 g LB-Agar in 1 l A. bidest autoklaviert
LB-Medium	25 g LB-Medium in 1 l A. bidest autoklaviert
Minipräp-Lösung 1	10 mM EDTA 50 mM Tris, pH7,4 0,1 % v/v Ribonuklease A
Minipräp-Lösung 2	200 mM NaOH 10 % v/v 10 % SDS
Minipräp-Lösung 3	3 M Kaliumacetat pH 5,2
MS-Äquibrierungslösung 1	100 % Acetonitril
MS-Äquibrierungslösung 2	80 % v/v Acetonitril 1 % v/v Essigsäure in MS-Wasser
MS-Äquibrierungslösung 3	50 % v/v Acetonitril 1 % v/v Essigsäure in MS-Wasser
MS-Äquibrierungslösung 4	30 % v/v Acetonitril 1 % v/v Essigsäure in MS-Wasser
MS-DTT-Lösung	25 mM DTT in 20 mM Ammoniumhydrogencarbonat
MS-Elutionslösung 1	50 % v/v Acetonitril 1 % v/v Essigsäure in MS-Wasser
MS-Elutionslösung 2	80 % v/v Acetonitril 1 % v/v Essigsäure in MS-Wasser
MS-Probenlösung	2 % v/v Acetonitril 1 % v/v Essigsäure in MS-Wasser
MS-Trypsinlösung	1 % w/v Trypsin in MS-Wasser

MS-Matrixlösung	α -cyano-4-hydroxymizimtsäure in 50 % v/v Acetonitril und 0,5 % w/v Trifluoressigsäure
Natriumborat	50 mM Natriumborat pH 8,2
Ponceau-S	0,2 % w/v Ponceau S 3 % v/v Trichloressigsäure
RIPA-Stammlösung	50 mM Tris, pH 7,5 5 mM EDTA, pH 8,0 150 mM NaCl 10 mM K_2HPO_4 10 % v/v Glycerol 1 % v/v Triton X-100 0,05 % v/v SDS
RIPA-Gebrauchslösung	67 % v/v RIPA-Stammlösung 1 mM SV 20 mM NaF 20 mM Glycerol-2-Phosphat 0,1 mM PMSF 20 % w/v Complete™ Mini EDTA-frei
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris, pH 6,8
Tetracyclin-Stocklösung	12 mg Tetracyclin-Hydrochlorid in 1 ml 70 % Methanol
Transferpuffer	20 % v/v Methanol 10 % v/v 10x Laufpufferstocklösung
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, pH 8,8

2.5 Kommerzielle Lösungen

Produkt	Hersteller
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
jetPEI™ DNA Transfection Reagent	Peqlab, Erlangen
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Darmstadt
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
peqGOLD TriFast™	Peqlab, Erlangen
Protein A Agarose, Fast Flow	Millipore, Billerica, USA
Roti®-Block 10x Konzentrat	Carl Roth, Karlsruhe

Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
Sensimix SYBR™ Hi-ROX	Bioline, Luckenwalde
SuperSignal® West Dura	Thermo Scientific, Rockford, USA
Gluthathione 4B-Beads	GE Healthcare Life Science

2.6 Kits

Produkt	Hersteller
NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot

2.7 Enzyme

Produkt	Hersteller
Hind III, Nhe I, Bgl II	Sigma Aldrich, Steinheim
FastDigest <i>Bam</i> HI Restriktionsenzym	Fermentas, St. Leon-Rot
FastDigest <i>Xho</i> I Restriktionsenzym	Fermentas, St. Leon-Rot
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
<i>Pfu</i> -Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
Ribonuklease A	Carl Roth, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot

2.8 Antikörper

Primärantikörper	Gebrauchs- verdünnung	Hersteller
anti-Prx1 rabbit polyclonal IgG	1:10000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
anti-HSP60 rabbit polyclonal IgG	1:10000	Cell Signaling Technolgy, Danvers, USA
anti-PHB rabbit polyclonal IgG	1:10000	Abcam, Cambridge, GB
anti-GAPDH rabbit monoclonal IgG	1:10000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Sekundärantikörper		Hersteller
goat anti-rabbit-IgG, HRP-linked	1:5000	Cell Signaling, Danvers, USA

2.9 Primer

Primer für rtPCR	Primersequenz
shHSP60-941- BX FOR	5'- GATCCCCCTGAAGATGTTGATGGAGATTCAAGAGATCTCCATCAACAT CTTCAGTTTTTA-3'
shHSP60-941- BX REV	5'- TCGATAAAAAGCTGAAGATGTTGATGGAGATCTCTTGAATCTCCATCAA CATCTTCAGGGG-3'
shHSP60-1326- BX FOR	5'- GATCCCCGCTGAAGGTTGGTGGGACATTCAAGAGATGTCCCACCAAC CTTCAGCTTTTTTA-3'
shHSP60-1326- BX REV	5'- TCGATAAAAAGCTGAAGGTTGGTGGGACATCTCTTGATTGTCCCACCA ACCTTCAGCGGG-3'
shHSP60-1363- BX FOR	5'- GATCCCCGAAAAGAAAGACAGAGTTATTCAAGAGATAACTCTGTCTTT CTTTCTTTTTTA-3'
shHSP60-1363- BX REV	5'- TCGATAAAAAGAAAAGAAAGACAGAGTTATCTCTTGAATAACTCTGTC TTTCTTTTCGGG-3'
shHSP60-2235- BX FOR	5'- GATCCCCTGTACAAAGTAGAGAAGTATTCAAGAGATACTTCTCTACTT TGACATTTTTTA-3'
shHSP60-2235- BX REV	5'- TCGATAAAAATGTACAAAGTAGAGAAGTATCTCTTGAATACTTCTCTAC TTTGTACAGGG-3'
Primer für Klonierung	Primersequenz
HSP60BamHI-1 For	5'-AAAAGGATCCATGCTTCGGTTACCCACAGTC-3'
HSP60XhoI- 1722 REV	5'-AAAAGCTCGAGTTAGAACATGCCACCTCCCATAC-3'
Primer für Sequenzierung	Primersequenz
HSP60-1-Hind FOR	5'-AAAAAAAAAAGCTTATGCTTCGGTTACCCACAGTC-3'
T777-Seq- pSuperior For	5'-AATACGACTCACTATAGGG-3'
HSP60-1722- Nhe REV	5'-AAAAAAAAAAGCTAGCTTAGAACATGCCACCTCCCATAC-3'

2.10 Vektoren

Vektor	Kurzbezeichnung	Hersteller
pcDNA3.1 (+)		Invitrogen, Darmstadt
pSuperior		OligoEngine, Seattle, USA
pGEX-6P-1		GE Healthcare Life, Science, Freiburg
pExpress		Arakawa H. et al. (2001)

2.11 Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach
Tetracyclin-Hydrochlorid	Roche Diagnostics, Mannheim

2.12 Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
LNCaP	American Type Culture Collection, Manassas, USA
LNCaP	American Type Culture Collection, Manassas, USA

2.13 Medien und Zusätze für Zellkultur

Produkt	Hersteller/Zusammensetzung
Trypsin-EDTA (10x) 0,5/0,2 % in PBS	PAN Biotech, Aidenbach
2x Trypsin/EDTA	20 % v/v 10x Trypsin/EDTA in DPBS
DHT Stammlösung	10 µM DHT in unvergälltem Ethanol
DPBS	PAN Biotech, Aidenbach
Einfriermedium	70 % v/v RPMI 1640 mit Phenolrot 20 % v/v FCS 10 % v/v DMSO

Fötales Rinderserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Panexin NTA Serumersatz	PAN Biotech, Aidenbach
RPMI 1640 mit Phenolrot	PAN Biotech, Aidenbach
RPMI 1640 ohne Phenolrot	PAN Biotech, Aidenbach
Stimulationsmedium	RPMI 1640 ohne Phenolrot 1 % Penicillin/Streptomycin 5 % NTA
Transfektionsmedium (RPMI ^{-/-})	RPMI 1640 mit Phenolrot
Vollmedium (RPMI ^{+/+})	RPMI 1640 mit Phenolrot 1 % Penicillin/Streptomycin 10 % FCS

2.14 Zellbiologische Methoden

Lagerung und Entnahme der Zelllinie

Es wurden $1,2 \times 10^6$ Zellen einer niedrigen Passage, nach Lagerung für 24h bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, als Kryokultur in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die Zellen einer 75 cm^2 Zellkulturflasche für 1 min mit Trypsin behandelt, in Vollmedium resuspendiert und anschließend bei 3000 U/min für 5 min zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das Sediment in 3 ml Einfriermedium aufgenommen und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Zur Entnahme der Zellen aus der Lagerung wurde eine Kryokultur bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut und in 3 ml Vollmedium resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit 3000 U/min für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 3 ml Vollmedium resuspendiert. Die entstandene Suspension wurde in einer 75 cm^2 Zellkulturflasche mit 17 ml Vollmedium ausgesät und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 5% CO_2 gesättigter Luft kultiviert. Die Passagierung erfolgte mit frischem Medium bei Konfluenz in der lichtmikroskopischen Beurteilung.

Passagierung der Zelllinie

Die Passagierung der Zelllinie wurde zweimal wöchentlich in 75 cm^2 Zellkulturflaschen in einem Brutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 durchgeführt. Dazu erfolgte zunächst die lichtmikroskopische Beurteilung der Zellen. Anschließend wurde das alte Medium abgesaugt und auf die Zellen 2 ml DPBS gegeben. Nach Überführung des DPBS in ein separates Falcon wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin

für 3 Minuten behandelt, von der Zellkulturflasche gelöst und dann in dasselbe Falcon wie das DPBS überführt. Zur Aufnahme der restlichen Zellen in der 75cm² Flasche wurde diese mit 2 ml Vollmedium gespült und die so entstandene Zellsuspension ebenfalls in dasselbe Falcon wie das DPBS überführt. Dieses Falcon wurde bei 1000 U/min für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 8 ml Vollmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl unter Benutzung der Neubauer Zählkammer und des CASY Cell Counters wurden bei 3-tägigem Passagier-Zyklus 3 Millionen, bei 4-tägigem Passagier-Zyklus 2,4 Millionen Zellen in eine mit 18 ml Vollmedium vorbereitete 75 cm² Zellkulturflasche ausgesät.

Ernte der Zellen aus einer 6-well Platte mit RIPA-Puffer

Nach lichtmikroskopischer Kontrolle wurde das gebrauchte Medium abgesaugt und je well 600 µl PBS hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen mit dem Zellschaber vom Boden des wells gelöst und in ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Um Zellverluste durch das Überführen möglichst gering zu halten wurden ein well nochmals mit 600 µl PBS gespült und die entstandene Restzellsuspension ebenfalls in dasselbe Eppendorf-Gefäß transferiert, so dass das well lichtmikroskopisch zellfrei war. Die Zellsuspension im Eppendorf-Gefäß wurde dann für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde anschließend mit 200 µl RIPA-Puffer resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellen erfolgte eine Ultraschallbehandlung des RIPA-Zellgemisches am Ultraschalldissektor mit 20 Stößen bei einer Amplitude von 20% und einem Zyklus von 0,5.

2.15 Molekularbiologische Methoden

Transfektion mit Lipofectamin

Das Einbringen von DNA in Zellen erfolgte in ausgesäten LNCaP-Zellen in 6-wells (ca. 70% Konfluenz). Dazu wurde zunächst das alte Vollmedium durch RPMI-Medium ohne Zusatz von FCS und P/S ausgetauscht und die wells für 20 min bei 37 °C im Brutschrank bei 5% CO₂ inkubiert. In der Zwischenzeit erfolgte der Ansatz des DNA-Mixes, bei dem je well 5 µg DNA auf je 500 µl RPMI-Medium in ein gesondertes Eppendorf-Gefäß vorbereitet wurde. Zu diesem Gefäß wurde dann je well 7,5 µl Lipofectamin auf 500 µl RPMI-Medium (zuvor für 5 min miteinander bei Raumtemperatur inkubiert) gegeben und das Gemisch für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde je well 1 ml des Lipofectamin-DNA-

Gemisches tropfenweise aufgetragen und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ für 24, 48 und 72 h inkubiert.

Transfektion mit Elektroporation

Zum Einbringen der DNA in die Zielzellen wurde aus einer 75 cm²-Zellkulturflasche zunächst konditioniertes Medium, bestehend aus 80% frischem Vollmedium und 20% verwendetes Vollmedium der Zelllinie, hergestellt. Von diesem Medium wurden 8,9 ml in ein gesondertes Eppendorf-Gefäß vorgelegt. Anschließend wurden die Zellen der Zellkulturflasche gemäß des Protokolls zur Passagierung der Zellen geerntet und die Zellzahl mit Hilfe des CASY Cell Counters bestimmt. 3,5 Millionen Zellen wurden in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und der Überstand nach Zentrifugation bei 1000 U/min für 5 min abgenommen und verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde dann mit 1000 µl DPBS resuspendiert, wiederum für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und vom DPBS-Überstand befreit. Dann erfolgte die Resuspension in 500 µl Elektroporationspuffer sowie die Zugabe von 45 µg DNA. Das Gemisch wurde in eine Elektroporationsküvette überführt und im Elektroporator bei 250 V und 1600 µF elektroporiert. Unmittelbar nach der Elektroporation wurden 550 µl auf 37 °C erwärmtes FCS in die Küvette gegeben. Die entstandene Zellsuspension wurde anschließend mit einer Pasteurpipette, ohne Aufnahme der an der Oberfläche schwimmenden und durch die Elektroporation getöteten Zellen, in das vorbereitete Gefäß mit konditioniertem Medium überführt. Nach ausreichender Resuspension der Zellen im konditionierten Medium wurden je 3 ml der Endsuspension in eine 3,5 cm Schale ausgesät und bei 37 °C und 5% CO₂ für 24, 48 und 72 h im Brutschrank inkubiert.

Transfektion mit jet-peï

Es wurde zunächst in getrennten extra Eppendorf-Gefäßen ein DNA-Ansatz mit je 2,8 µg DNA mit 100 µl NaCl je well einer 6-well Platte und ein jet-peï-Ansatz mit je 5,6 µl jet-peï mit 100 µl NaCl je well einer 6-well Platte hergestellt. Anschließend wurden 100 µl je well des jet-peï-Ansatzes zum DNA-Ansatz hinzugefügt und das Gemisch für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Je well einer 6-well Platte wurden 3 ml LNCaP-Zellsuspension in einer Verdünnung von 1:2 einer 75 cm² Zellkulturflasche in ein extra Gefäß vorgelegt und mit 200 µl des jet-peï-DNA-Gemisches je well resuspendiert. Anschließend wurden 3 ml je well tropfenweise auf

das 6-well ausgesät und für 24, 48 und 72 h bei 37 °C mit 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Transfektion mit siLentFect

Am Vortag der Transfektion erfolgte die Aussaat der Zellen im Verhältnis von 1:1,5 in 9,5 cm² Kulturschalen. Nach Entfernung des Vollmediums wurden am nächsten Tag je Kulturschale 1,25 ml Transfektionsmedium hinzugegeben. Anschließend wurden 3 Ansätze vorgelegt und nach dem Zusammenmischen jeweils 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dies waren ein Kontroll-Ansatz mit 125 µl Transfektionsmedium, ein Ansatz zur Inhibition mit 125 µl Transfektionsmedium + 1,2 µl Inhibitor und das Transfektionsreagenz mit 250 µl Transfektionsmedium + 5 µl siLentFect. Nach der Inkubation wurde das Transfektionsreagenz jeweils auf den Kontroll- und Inhibitionsansatz gleich aufgeteilt, gut resuspendiert und das so entstandene Gemisch für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der jeweilige Ansatz tropfenweise auf die vorbereiteten Kulturschalen mit 1,25 ml Transfektionsmedium gegeben.

Nukleinsäure-Präparation

Zur Präparation von Gesamt-RNA wurde das TriFast Reagenz gemäß Herstellerangaben eingesetzt. Nach der Phasentrennung wurde die obere Phase in Reaktionsgefäße überführt, mit 250 µl Isopropanol versetzt, 10 mal invertiert und für 10 min bei RT inkubiert. Zur Sedimentation der RNA wurden die Ansätze anschließend zentrifugiert (11000 U/min; 10 min; 4 °C), der Überstand verworfen und das Sediment mit 500 µl Ethanol (75 %) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (9000 U/min; 5 min; 4 °C) wurde das RNA-haltige Sediment für 15 min luftgetrocknet und 32 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

Zur Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurde eine Säulen-freie Mini-Präparation durchgeführt, während die Präparation größerer DNA-Mengen (Midi-Präparation) mit einem Silicagel-Säulen-Kit durchgeführt wurde.

Bei der Mini-Präparation von Plasmid-DNA wurden 1,5 ml einer 3-ml-Bakterien-Übernachtskultur sedimentiert (13000 U/min; 1 min; RT), der Überstand verworfen und das Bakterienzell-Sediment in 200 µl Minipräp-Lösung 1 lysiert. Durch Zugabe von 200 µl Minipräp-Lösung 2 wurden chromosomale DNA und Proteine ausgefällt. Nach

Neutralisation des Ansatzes mit Minipräp-Lösung 3 und Zentrifugation (13000 U/min; 5 min; 4°C) wurde der Überstand abgenommen und für 8 min mit 420 µl Isopropanol bei RT inkubiert. Ausgefällene Plasmid-DNA wurde sodann sedimentiert (13000 U/min; 8 min; 4°C), nach Abnahme des Überstandes an der Luft getrocknet und in 50 µl A. dest. gelöst.

Bei der Midi-Präparation von Plasmid-DNA werden deutlich höhere Ausbeuten erzielt und der Reinheitsgrad der präparierten DNA ist durch den Einsatz einer Silicagel-Säule wesentlich höher. Zur Midi-Präparation wurde das NucleoBond Xtra Plasmid DNA Kit von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben verwendet. Die Bakterienzellen einer 100-ml-Übernacht-Vorkultur wurden sedimentiert (4500 U/min; 15 min; RT), in 8 ml RES-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 8 ml LYS-Puffer lysiert. Nach 5-minütiger Inkubation dieses Ansatzes wurde das Lysat mit 8 ml NEU-Puffer neutralisiert und auf die mit EQU-Puffer äquilibrierte Säule gegeben. Nach Durchlauf des Lysats durch die Säule wurde diese mit 5 ml EQU-Puffer und mit 5 ml WASH-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA mit 5 ml ELU-Puffer vom Säulenmaterial eluiert. Anschließend konnte die gereinigte und gelöste DNA mit 3,5 ml Isopropanol gefällt, sedimentiert (4500 U/min; 15 min; RT), mit Ethanol (70%) gewaschen (4500 U/min; 15 min; RT) und schliesslich in 300 µl A. dest. resuspendiert werden.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 1,5 µl Nukleinsäure-Lösung in einem Nanodrop ND-1000 bei 260 nm und dem Lösungsmittel als Leerwert gemessen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden RNA-Proben bei -80°C, DNA-Proben bei -20°C gelagert.

Reverse Transkription und Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Zur Klonierung des offenen Leserahmens, der für ein bestimmtes Protein kodiert, muss die mRNA-Sequenz zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden (Reverse Transkription; RT), damit diese durch eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt und letztendlich kloniert werden kann. Die cDNA-Synthese beginnt mit der Denaturierung der RNA. Hierzu wurden 1 µg Gesamt-RNA und 1 µl Oligo-dT-Primer in einem Endvolumen von 13,25 µl für 5 min bei 65°C inkubiert. Die Verwendung von Oligo-dT-Primer, die am PolyA-Anteil von mRNA binden, gewährleistete, dass ausschließlich mRNA-Moleküle in cDNA

umgeschrieben wurden. Nach dem Denaturierungsschritt wurden dem Ansatz 4 µl Reaktionspuffer, 1 µl dNTP-Mix, 0,25 µl RiboLock RNase-Inhibitor sowie 1,5 µl MMLV Reverse Transkriptase zugegeben und für 1 h bei 42°C inkubiert. Nach Inaktivierung der Reversen Transkriptase durch 10 min bei 72°C wurde die cDNA rasch auf Eis abgekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Durch PCR können definierte Bereiche einer Matrix-DNA amplifiziert werden. Zur Klonierung von Expressions-Vektoren werden i.d.R. die vollständigen Leserahmen vervielfältigt und in geeignete Expressions-Plasmide eingefügt. Die Bindungsstellen des eingesetzten Primer-Paares definiert die 5'- und 3'-Enden des PCR-Produktes, da der dazwischenliegenden Sequenzbereich durch die Aktivität einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase amplifiziert wird.

Die Zyklen der PCR setzen sich wie folgt zusammen: Bei der Denaturierung werden doppelsträngige Bereiche der cDNA und doppelsträngige PCR-Produkte aufgeschmolzen und stehen somit wieder zur Primerbindung zur Verfügung. Im 2. Schritt lagert sich die Primer an die komplementären Sequenzen der Matrix-DNA an (Annealing). Schließlich wird im 3. Schritt durch die Polymerase der zur Matrix komplementäre Strang synthetisiert (Elongation), womit nun wieder ein doppelsträngiges PCR-Produkt vorliegt und der Zyklus von vorne beginnt. Sind im 5'-Ende der Primer Erkennungssequenzen für Restriktions-Endonukleasen, so kann das PCR-Produkt nach entsprechendem enzymatischem Verdau in einen Vektor kloniert werden.

Die PCR wurde in einem 50-µl-Ansatz durchgeführt und enthielt folgende Agenzien: 5 µl Reaktions-Puffer, 1 µl dNTP-Mix, 5 µl Primer FOR, 5 µl Primer REV, 1 µl *Pfu*-Polymerase und 1 µl eines oben beschriebenen RT-Ansatzes. Die Temperaturführung eines PCR-Zyklus beinhaltete nach einer initialen Denaturierung (95°C; 3 min) die Denaturierung (95°C; 30 sec), das Annealing (65°C; 30 sec) und die Elongation (72°C; 2 – 3 min). Ein PCR-Zyklus wurde 29 mal wiederholt. PCR-Produkte wurden bei -20°C gelagert.

Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung von PCR-Produkten und restringierter DNA sowie zur Reinigung von DNA von unspezifischen DNA-Molekülen und Pufferbestandteilen wurden Nukleinsäure-Proben im Agarose-Gel elektrophoretisch nach ihrer Größe getrennt.

Die Detektion der DNA erfolgte mittels Ethidiumbromid, das mit Nukleinsäuren interkaliert und durch UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Die Abschätzung der Länge eines DNA-Moleküls konnte durch Vergleich mit einem definierten DNA-Marker durchgeführt werden. Agarose-Lösung (1 %) wurde in einem Mikrowellen-Gerät erhitzt, in eine Gelapparatur gegossen und polymerisierte beim Erkalten. DNA-Proben wurden mit Saccharose-Stopp-Lösung versetzt und in die Taschen des Gels gefüllt. Analytische Gel-Läufe zur Kontrolle von PCR-Produkten, DNA-Präparationen oder Restriktions-Ansätzen besaßen ein Volumen von 10 µl, präparative Gel-Läufe, bei denen die Banden ausgeschnitten und weiter verwendet wurden, besaßen ein Volumen von 50 µl. Die Trennung der Nukleinsäuren erfolgte in TAE-Puffer bei 100 V und dauerte zwischen 20 und 50 min. Schließlich wurden die Gele in einem ChemiDoc XRS+ System dokumentiert.

Restriktions-Verdau

Restriktions-Enzyme schneiden innerhalb doppelsträngiger DNA-Moleküle an spezifischen, meist 6 bis 8 Basenpaar langen Erkennungs-Sequenzen. Da hierbei oftmals einzelsträngige Überhänge von 4 bis 6 Basen entstehen, können mit dem gleichen Enzym geschnittene DNA-Stränge miteinander hybridisieren und somit zur Neukombination von DNA-Molekülen genutzt werden (Rekombinante DNA-Technologie; Klonierung).

Beim Restriktions-Verdau wurden 3 bis 5 µg PCR-DNA mit der erwünschten Sequenz eines Target-Proteins oder Vektor-DNA eingesetzt (Präparativer Verdau; 50 µl Gesamtvolumen). Zur Überprüfung von DNA-Klonen wurden etwa 0,1 µg DNA oder 1 µl einer Mini-Präparation eingesetzt (analytischer Verdau; 10 µl Gesamtvolumen). Die Zusammensetzung der Ansätze richtete sich nach den Herstellern der Restriktions-Enzyme und enthielten neben der DNA jeweils 1 µl der eingesetzten Restriktions-Endonukleasen sowie 1/10 Volumen der enzym-spezifischen Reaktionspuffer. Die Reaktion wurde für 1 bis 5 h bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde die erfolgreiche Restriktion im Agarose-Gel überprüft, indem der gesamte Ansatz (analytischer Verdau) oder 3 µl des Ansatzes (präparativer Verdau) im Gel separiert und bezüglich Fragment-Verteilung und -Größen analysiert wurde.

Reinigung von DNA-Fragmenten

Vor dem weiteren Einsatz in Folge-Anwendungen wurden PCR-Produkte direkt und Restriktions-gespaltene DNA-Fragmente und Vektoren nach Separation im Agarose-Gel gereinigt (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit; Macherey-Nagel). Wie vom Hersteller vorgegeben wurden aus dem Gel ausgeschnittene DNA-Fragmente bzw. die PCR-Probe mit dem doppelten Volumen NT1-Puffer versetzt, auf eine Säule gegeben und Zentrifugiert (10000 U/min; 30 sec; RT). Anschließend wurden die gebundenen DNA-Proben zweimal mit 700 µl NT3-Puffer gewaschen (10000 U/min; 30 sec; RT) und mit 15 bis 50 µl NE-Puffer eluiert (10000 U/min; 1 min; RT). Gereinigte DNA-Fragmente wurden bei -20°C gelagert.

Ligation von DNA-Fragmenten

Zwei DNA-Moleküle mit komplementären, einzelsträngigem Überhang können hybridisieren und bilden damit ein fusioniertes DNA-Molekül, das jedoch an der Stelle der Hybridisierung noch in jedem der beiden Stränge einen Einzelstrangbruch besitzt. Um diese Brüche zu schließen wird bei Klonierungen eine Ligase-Reaktion durchgeführt, wodurch die Lücken im Zuckerphosphat-Rückgrat der beiden komplementären Stränge durch kovalente Bindungen geschlossen werden.

Ein Ligationsansatz enthielt 2 µl Ligationspuffer, 5 bis 10 µl DNA-Fragment mit der Ziel-Sequenz, 1 bis 2 µl Vektor-DNA, 1 µl T4 DNA-Ligase und A. bidest bis zu einem Endvolumen von 20 µl. Die Reaktion lief über Nacht bei 4°C.

Transformation von *E. coli*

Die Vervielfältigung von DNA wurde im *E. coli*-Stamm XL-1 Blue durchgeführt. 50 µl kompetente XL-1 Blue Zellsuspension wurde mit 0,1 µg gereinigter Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligations-Ansatzes 30 min auf Eis inkubiert, für 1 min einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und anschließend auf Eis rasch abgekühlt. Anschließend wurde der Transformations-Ansatz mit LB-Medium ohne Antibiotikum auf 1 ml aufgefüllt und für 1 h bei 37°C in einem Bakterien-Schüttler inkubiert. Bei Präparationen von DNA-Plasmiden wurde der vollständige Ansatz als Über-Nacht-Kultur in 100 ml LB-Medium mit Antibiotikum gegeben. Transformierte Ligationen wurden zur weiteren Analyse per Mini-Präparation in 3-ml-Über-Nacht-Kulturen mit Antibiotikum überführt und inkubiert.

2.3 Biochemische Methoden

SDS-Page

Um die Proteine gemäß ihres Molekulargewichtes aufzutrennen wurde die elektrische Wanderung der Proteine in einer Gelmatrix genutzt. Dazu wurde ein 10% Polyacrylamid-Gel, als Trenngel bezeichnet, zwischen 2 Glasplatten gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach Polymerisation des Gels wurde das Wasser entfernt und das Trenngel mit einem 15% Polyacrylamid-Gel, als Sammelgel bezeichnet, überschichtet. In das Sammelgel wurde ein Kamm mit 10 Zacken, welche jeweils Taschen mit einem Fassungsvermögen von ca. 40 µl im Sammelgel aussparten, eingesetzt. Nach Aushärtung des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und die Glasplatte nach Spülung der Kammern mit Aqua bidest mit dem Gel in das Biorad-System eingespannt. Die Reservoirs der Elektrophoresekammer wurden mit Laufpuffer gefüllt und die Proteinproben aufgetragen. Die Proben waren zuvor mit 5x Lämmli-Puffer in einem Verhältnis von 5:1 vermischt, für 5 min bei 95 °C hitzedenaturiert, anschließend auf Eis gekühlt und abzentrifugiert worden. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V und wurde beendet sobald die Farbfront des Ladepuffers das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford erfolgte 5 min nach Gabe von 1,9 ml Bradford-Reagenz zu den Proben durch eine Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm am NanoDrop. Die Proben und die Eichreihe wurden gemäß der folgenden Tabelle pipettiert. Als Standard wurde die BSA-Lösung von Biolabs verwendet.

Eichreihe	Proteinmenge in µg	Aqua bidest in µl
1	0	0
2	1	99
3	2	98
4	4	96
5	6	94
6	10	90
7	20	80
8	40	60
Probe	Proteinmenge in µg	A.bidest in µl
1	2	98

Beadkoppelung

Zur Anreicherung des Fusionsproteins GST-HSP60 und des Kontrollproteins GST wurden sie mittels einer spezifischen Bindung ihres GST-Anteils an Glutathione-Beads aus einem Lysat der überexprimierten *E.coli* Bakterien isoliert.

Dazu wurde ein Pellet der bei -20 °C gelagerten *E.coli* Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 2,5 ml PBS-CAM resuspendiert. Der Zellaufschluss der entstandenen Suspension erfolgte durch Ultraschall bei einer Amplitude von 20% und einem Zyklus von 0,5 für 3x1 min auf Eis. Das Protein-Gemisch wurde dann mit TRITON X-100 auf eine Endkonzentration von 1% versetzt und für 30 min bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C mit 16.400 U/min für 20 min. Vom Überstand wurden 25 µl als „Bakterien-Lysat“ für eine SDS-Page auf Eis archiviert und der restliche Überstand in neue Eppendorf-Gefäße überführt. Das verbliebende Sediment wurde mit 1 ml PBS-CAM versetzt und mittels zweimal 60 Stößen Ultraschall bei einer Amplitude von 20% und einem Zyklus von 0,5 resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 10 µl als „Bakterien-Sediment“ für eine SDS-Page auf Eis archiviert und der Rest verworfen. Für den nächsten Schritt wurden 120 µl Glutathione-Sepharose-4B-Beads auf eine Säule mit einem für die Beads undurchlässigen Filter gegeben und dreimal mit je 1ml PBS-CAM gewaschen. Das nicht für den SDS-Page archivierte Bakterien-Lysat wurde dann mit 1,25 µl 1M DTT + 100 µl Complete + 2,5 µl PMSF versetzt und komplett auf die vorbereiteten Beads in der Säule gegeben und bei 4 °C für 3 Stunden auf dem Überkopf-Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Säule unterhalb des Filters geöffnet und vom Durchlauf 25 µl als „Durchlauf“ auf Eis archiviert. Nach erneutem Verschluss der Säule wurden die Beads in der Säule dreimal mit je 1 ml PBS-CAM gewaschen. Vom 1. Durchlauf jeden Waschganges wurden jeweils 25 µl als „wasch1“, „wasch2“ und „wasch3“ auf Eis archiviert. Die Säulen wurden wieder verschlossen und die auf dem Filter liegenden Beads mit 1 ml PBS-CAM resuspendiert. Davon wurden 170 µl in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die 170 µl Suspension der Beads wurde dreimal für 1 min bei 10.000 U/min zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Sediment der Beads (ca. 35 µl) wurde entnommen und auf Eis als „Beads“ archiviert. Anschließend erfolgte eine SDS-PAGE der archivierten Proben mit Coomassie-Färbung des Gels zum Nachweis der erfolgreichen Koppelung des GST-Anteils des Fusionsproteins an die Glutathione-Beads.

Pulldown

Die Isolation und Anreicherung der spezifischen Bindungspartner von HSP60 erfolgte durch Bindung der Proteine an das Fusionsprotein und das Kontrollprotein.

Dazu wurde das Lysat einer 75 cm² Zellkulturflasche der LNCaP-Prostatakarzinomzelllinie mit 2,5 ml RIPA-Puffer + 2,5 µl DTT versetzt und in die Säule zu den mit den Beads gekoppeltem Fusionsprotein bzw. Kontrollprotein gegeben und für 12 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Säule unterhalb des Filters geöffnet und 25 µl des Durchlaufes als „Durchlauf“ auf Eis archiviert. Nach erneutem Verschluss der Säule wurden die Beads in der Säule dreimal mit je drei mal 1 ml PBS-CAM gewaschen. Vom 1. Durchlauf jeden Waschganges wurden jeweils 25 µl als „wasch1“, „wasch2“ und „wasch3“ auf Eis archiviert. Nach erneutem Verschluss der Säule wurden die Beads mit 500 µl PBS-CAM resuspendiert und in ein gesondertes Eppendorf-Gefäß überführt. Um ggfs. verbliebene Beads in der Säule zu überführen wurde erneut 500 µl PBS-CAM auf die Säule gegeben und anschließend in dasselbe Eppendorf-Gefäß überführt. Das Gemisch aus Beads und PBS-CAM wurde dann dreimal für je 1 min mit 2500 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment der Beads wurde mit 30 µl 5x Ladepuffer resuspendiert und als „Beads“ auf Eis archiviert. Anschließend erfolgte eine SDS-PAGE der archivierten Proben mit Coomassie-Färbung des Gels zur Darstellung der an das Fusionsprotein gebundenen Proteine.

Sensitive Coomassie-Färbung

Das zu färbende Polyacrylamid-Gel wurde nach der Gelelektrophorese dreimal für 10 min mit Aqua bidest gewaschen. Nach Entfernung des A. bidest wurde 100 ml Coomassie-Färbelösung für mindestens 3 h auf das Gel gegeben. Anschließend erfolgte nach Entfernung der Färbelösung ein erneutes dreimaliges Waschen des Gels für je 10 min mit A. bidest. Nach Entfernung des A. bidest wurde in Abhängigkeit des makroskopischen Färbungsgrades für 10-60 min die Entfärbelösung zum Gel gegeben. Alle Färbe-, Wasch- und Entfärbe-Schritte fanden auf dem Kipptisch statt.

Vorbereitung der Gelstücke zur MS-Analyse

Zur Identifikation der an das Fusionsprotein gebundenen Proteine wurde das Gel phototechnisch dokumentiert und die sichtbaren Banden ausgeschnitten. Für den Verdau der Proteine im Gel war es notwendig die Gelstücke zu entfärben. Zum Entfärben der Gelstückchen erfolgte die Zugabe von 200 µl 100 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3^-$ -Lösung mit anschließender Inkubation für 30 min bei 37 °C auf dem Thermomixer. Nach kurzer Zentrifugation des Probengefäßes wurde der Überstand verworfen. War es nicht zu einem kompletten Entfärben der Probe gekommen, wurden diese Schritte wiederholt. Anschließend erfolgte die Dehydrierung der Proben mit 100 µl 100% ACN pro Probengefäß und Inkubation für 15 min bei 37 °C auf dem Thermomixer. Das ACN wurde dann wieder abgenommen und verworfen. Zum tryptischen Verdau wurden die Proben mit 15-20 µl Trypsin-Lösung (10 ng/µl) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die erhaltenen Peptide wurden anschließend aus dem Gel extrahiert. Die Extraktion erfolgte zunächst mit 10 µl 0,1% CH_3COOH für 1 h, anschließend mit 15 µl 0,05% $\text{CH}_3\text{COOH}/50\%\text{ACN}$. Die vereinigten Überstände wurden auf 3-5 µl eingeeengt. Die erhaltene Probe wurde dann mit 12 µl Puffer A aufgefüllt und für die Massenspektrometrie verwendet. Die Lagerung der Proben bis zur Analyse erfolgte bei -20 °C. Die massenspektrometrische Messung erfolgte durch Fr. Dr. Simone Venz aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie.

Westernblot

Um spezifische Proteine nach einem SDS-Page zu identifizieren wurde ein Westernblot durchgeführt. Dazu wurde das Polyacrylamid-Gel zunächst aus der Gel-Elektrophoresekammer entfernt, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel in eine Schale mit Transferpuffer überführt. Ebenso wurden 8 Lagen Filterpapier und 1 Nitrozellulosemembran mit Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurden nacheinander 4 Lagen des Filterpapiers, die Nitrozellulosemembran, das Sammelgel und weitere 4 Lagen des Filterpapiers aufeinander in den Blotter gestapelt. Eventuell vorhandenen Luftblase wurden mit einem Glaszylinder unter leichtem Druck aus dem Stapel ausgestrichen. Das Blotting fand für 1 h bei 1,2 mA pro cm^2 statt. Nach Beendigung des Vorganges wurde die Nitrozellulosemembran zum Nachweis einer erfolgreichen Übertragung der Proteine in einer Schale auf dem Kipptisch für 3 min mit Ponceau Rot gefärbt. Nach Abkippen des Ponceau Rot wurde die Membran einmal mit A. bidest gewaschen. Das Entfärben der Membran erfolgte dann durch

eine Zugabe von TBS-T auf die Membran. Dann wurde die Membran für 1h mit Blockierlösung auf dem Kipptisch inkubiert und anschließend nochmal kurz mit TBS-T gewaschen. Über Nacht wurde der Primärantikörper in Antikörperlösung bei 4 °C auf dem Kipptisch auf die Membran gegeben. Nach Entfernung des Primärantikörpers am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für je 5 min auf dem Kipptisch mit TBS-T gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper in 15 ml Blockierlösung für 1 h auf dem Kipptisch inkubiert. Die Detektion und Quantifizierung der Proteine am ChemiDok XRS + mit Hilfe der Image LabTM Software erfolgte nach erneutem dreimaligem je 5-minütigen Waschen mit TBS-T. Dazu wurde die Membran in das Gerät eingelegt und gleichmäßig mit 2 ml einer Detektionslösung inkubiert. Es wurden insgesamt 7 Bilder in regelmäßigen Abständen gemacht, beginnend nach 120 Sekunden und mit einer Gesamt-Detektionszeit von 2700 Sekunden.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse potentieller Bindungspartner von HSP60

3.1.1 Klonierung eines bakteriellen Expressionsvektors zur Synthese von GST-HSP60-Fusionsproteinen

Um potentielle Interaktionspartner von HSP60 zu identifizieren sollte ein Fusionsprotein generiert werden, das neben der Sequenz von HSP60 auch einen Aminosäureabschnitt der Glutathion-S-Transferase (GST) enthält, wodurch dieses rekombinante Protein an Glutathion-Beads gekoppelt werden konnte. Das dadurch immobilisierte HSP60-Protein konnte somit mit Zelllysaten inkubiert und spezifisch am HSP60-Anteil des Fusionsproteins gebundene Proteine analysiert werden. Dieser als Pull-Down bezeichnete Ansatz ermöglicht die Identifizierung potentieller Bindungspartner von HSP60 und kann neue Effektoren und Signalwege des Proteins aufzeigen.

Zur Klonierung der full-length Sequenz von HSP60 wurde die Gesamt-RNA aus LNCaP-Zellen isoliert, die mRNA in cDNA umgeschrieben und in einer HSP60-spezifischen PCR eingesetzt. Als Primer dienten zwei Oligonukleotide, die am 5'-Ende (Start-Codon) sowie am 3'-Ende (Stop-Codon) des offenen Leserahmens von HSP60 hybridisierten. Zudem befanden sich an den 3'-Enden der Primer Erkennungssequenzen für die Restriktions-Endonukleasen *Bam*HI und *Xho*I,

wodurch das PCR-Produkt nach Restriktion in den entsprechend verdauten bakteriellen Expressionsvektor pGEX-6P-1 ligiert werden konnte (Abb. 1).

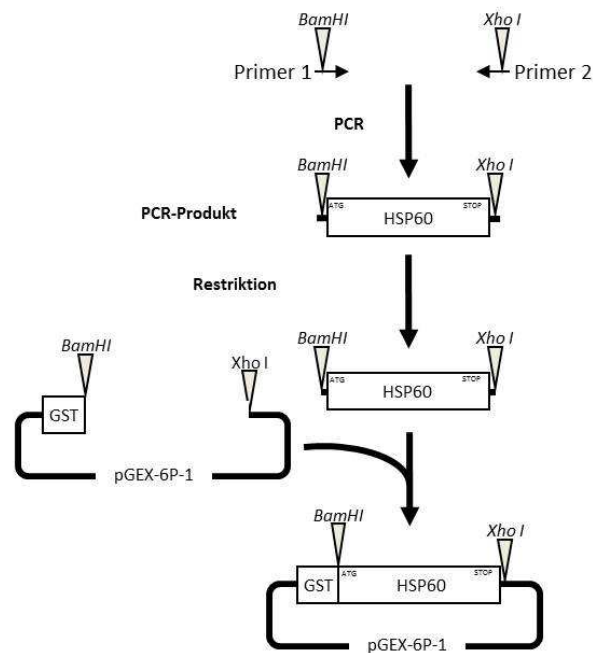


Abb. 1: Strategie zur Klonierung des eukaryotischen Expressionsvektors pGEX-6P-1-HSP60; eingesetzte Enzyme sind angegeben

Das PCR-Produkt hatte eine berechnete Größe von 1727 bp und lief im Gel zwischen den Markerbanden von 1500 bp und 2000 bp (Abb. 2.A). Der *Bam*HI/*Xho*I-linearisierte Vektor pGEX-6P-1 ist gemäß Herstellerangaben 4984 bp groß und erschien erwartungsgemäß auf Höhe der 5000-bp-Markerbande (Abb. 2.A). Sowohl PCR-Produkt als auch Vektor wurden nach *Bam*HI/*Xho*I-Doppelverdau aus dem Gel herausgeschnitten, extrahiert und zur Ligation eingesetzt. Durch Kontrollverdau der ligierten und nach Transformation in *E. coli* Stamm XL-1 Blue amplifizierten Klone des Vektors pGEX-6P-1-HSP60 mit *Bam*HI und *Xho*I wurde das Konstrukt wieder aufgeschnitten und es zeigten sich wiederum 2 Banden für das HSP60-Insert (1727 bp) und den Vektor (4984 bp; Abb. 2.B).

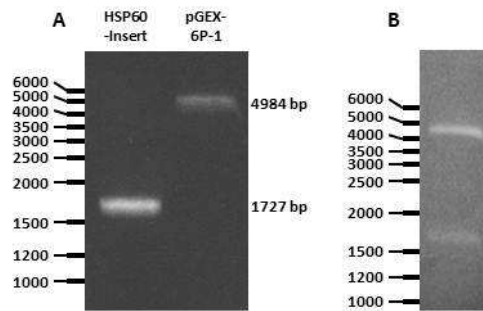


Abb. 2: PCR-Produkt (HSP60-Insert) und Vektor (pGEX-6P-1); (A) vor Ligation und (B) nach Kontrollverdau

Die Sequenz des HSP60-Inserts wurde durch Sequenzierung überprüft.

3.1.2 Identifizierung potentieller HSP60-Bindungspartner mittels Pull-Down Assay

Für die Pull-Down Assays mussten zunächst das rekombinante GST-HSP60-Fusionsprotein sowie das Kontrollprotein GST bakteriell exprimiert werden. Hierzu wurde kein rekombinations-negativer *E. coli* Stamm wie XL-1 Blue, sondern der protease-defiziente Stamm BL21 eingesetzt, wodurch die Syntheserate des Fusionsproteins erhöht werden sollte. Mittels Transformation wurden das Konstrukt pGEX-6P-1-HSP60 sowie der leere Kontrollvektor pGEX-6P-1, von dem nur der GST-Anteil abgelesen werden kann, in kompetente *E. coli* BL21 Zellen eingebracht. Die Expression der Vektoren wurde durch Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und durch Entnahme von 1-ml-Proben wurde der zeitliche Verlauf der Synthese des Fusionsproteins überprüft. Nach Ultraschall-Aufschluss, Trennung im Gel und Coomassie-Färbung konnten die rekombinanten Proteine analysiert werden (Abb. 3). Das GST-Protein alleine zeigte eine Größe von 27 kDa, während das GST-HSP60-Fusionsprotein die erwartete Größe von 87 kDa aufwies, zusammengesetzt aus GST-Anteil (27 kDa) und HSP60-Anteil (60 kDa).

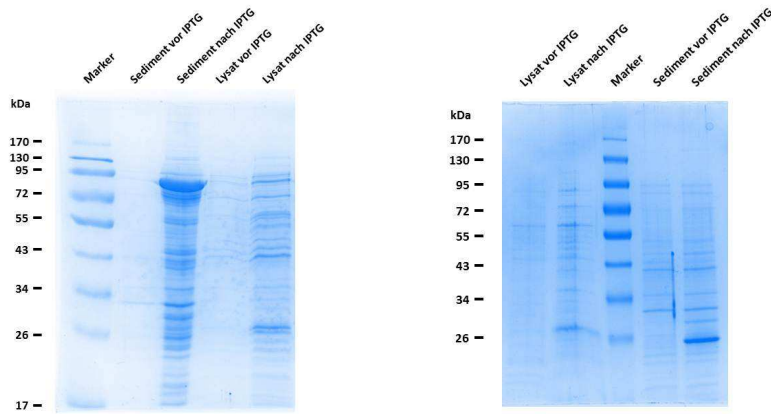


Abb. 3.: Sensitive Coomassie-Färbung der Proteinexpression nach Transformation der Konstrukte pGEX-6P-1-HSP60 und pGEX-6P-1 in die kompetenten *E.coli*-Zellen BL 21, jeweils vor und nach Stimulation mit IPTG

Nach Ultraschall-Aufschluss der Bakterienzellen und Homogenisierung in PBS-CAM Puffer konnten die Bakterienlysate mit GST-HSP60-Fusionsprotein und GST-Kontrollprotein zur weiteren Anreicherung und vor allem zur Immobilisierung an Glutathione-Sepharose-4B-Beads gekoppelt werden. An diese Beads sind Glutathion-Reste kovalent gebunden, an welchen wiederum die GST-Anteile von Fusionsproteinen spezifisch binden können (Enzym-Substrat-Bindung). Damit ist das HSP60-Protein an den Glutathion-Beads immobilisiert und kann für Pull-Down Experimente eingesetzt werden. Abb. 4 zeigt Glutathion-Beads mit gebundenem GST-Kontrollprotein (4.A) und gebundenem GST-HSP60-Fusionsprotein (4.B).

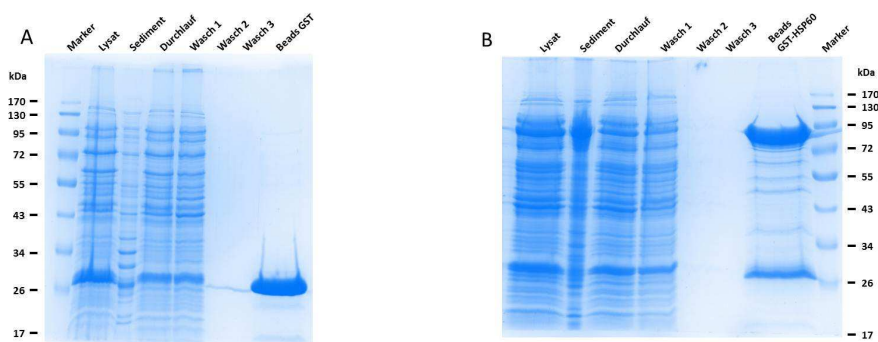


Abb. 4.: Sensitive Coomassie-Färbung der Proteinexpression nach Koppelung des Fusionsproteins pGEX-6P-1 (A) und des Fusionsproteins pGEX-6P-1-HSP60 (B) an Glutathione-Sepharose-4B-Beads

Die in Abb. 4 charakterisierten und an Glutathion-Beads immobilisierten GST-Kontrollproteine und GST-HSP60-Fusionsproteine wurden nun im eigentlichen Pull-Down Assay eingesetzt. Die immobilisierten Proteine wurden mit LNCaP-Lysat inkubiert und anschliessend mehrfach mit Puffer gewaschen. Nach anschließender Trennung der Beads-Fraktion im Gel zeigten sich neben den Banden für GST und GST-HSP60 noch weitere Proteinsignale im Coomassie-gefärbten Gel (Abb. 5).

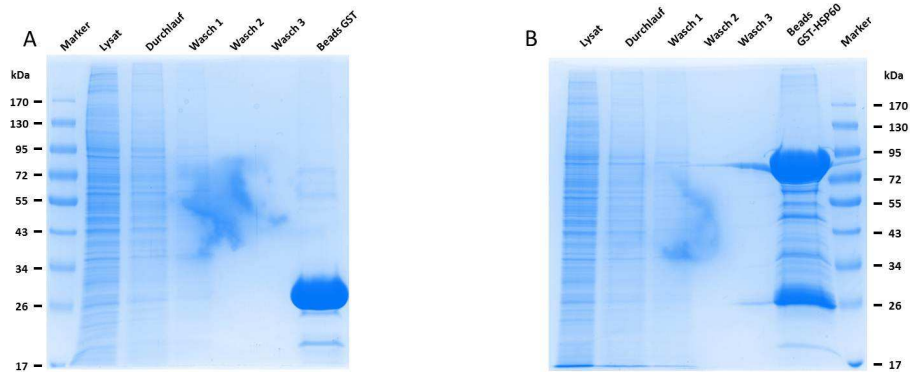


Abb. 5.: Sensitive Coomassie-Färbung der Proteinexpression nach Pulldown der gekoppelten GST-Beads (A) und der gekoppelten GST-HSP60-Beads (B) mit einem Lysat der LNCaP-Zelllinie

Diese Proteine waren potentielle Bindungspartner von HSP60 und wurden mittels massenspektrometrischer Analyse identifiziert. Hierzu wurden die Spuren des Beads-gebundenen GST-Kontrollproteins und des GST-HSP60-Fusionsproteins in gleich große Gelstücke zerschnitten (Abb. 6), für die Massenspektrometrie vorbereitet und durch Dr. rer. nat. Simone Venz (Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universitätsmedizin Greifswald) analysiert.

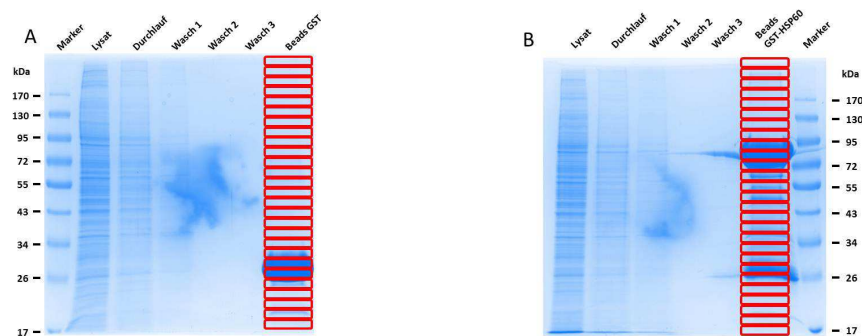


Abb. 6.: Sensitive Coomassie-Färbung der Proteinexpression nach Pulldown der gekoppelten GST-Beads (A) und der gekoppelten GST-HSP60-Beads (B) mit einem Lysat der LNCaP-Zelllinie; ausgeschnittene Spur markiert

In einem ersten Schritt wurden alle Signale bakterieller Herkunft eliminiert. Sodann erfolgte der Abgleich von an GST-Kontrollprotein und GST-HSP60-Fusionsprotein gebundenen Zielproteinen, so dass schließlich 143 Proteine mit dem HSP60-Anteil des Fusionsproteins interagiert haben und potentielle Bindungspartner von HSP60 darstellen. Der größte Teil dieser Proteine gehörte zu Strukturproteinen eukaryotischer Zellen, die oftmals in hohen Konzentrationen in den Zellen vorliegen und somit sehr häufig als Hintergrundsignale auftreten, sowie Proteine, die der basalen Zellphysiologie zuzuordnen sind (siehe vollständige Auflistung in Anhang 1).

3.1.3 Evaluierung ausgewählter potentieller Bindungspartner von HSP60

Für unsere Arbeiten von besonderem Interesse waren die potentiellen HSP60-Bindungspartner Hitzeschockprotein70 (HSP70), Hitzeschockprotein 75 (HSP75), Hitzeschockprotein 105 (HSP105), Peroxiredoxin-1 (Prx-1), Peroxiredoxin-2 (Prx-2), Prohibitin (PHB), und Poly ADP Ribose Polymerase (PARP). Alle diese Faktoren sind im Zusammenhang mit Proliferation, Apoptose und Chemoresistenz beschrieben worden und sollten daher mittels Western Blot Analysen von Pull-Down Ansätzen als HSP60-spezifische Bindungspartner verifiziert werden. Da für HSP75 und HSP105 jedoch keine geeigneten Antikörper zur Verfügung gestellt werden konnten, fielen diese beiden Proteine aus der Evaluierung heraus.

Für HSP70, Prx-2, und PARP waren nach Western Blot Analysen von Pull-Down Ansätzen keine Signale detektierbar, eine Bindung dieser Proteine an HSP60 demnach nicht zweifelsfrei prognostizierbar. Für PHB (Abb. 7.A) und Prx-1 (Abb. 7.B) waren jedoch Signal im Western Blot detektierbar, so dass bei diesen beiden Proteinen von einer Bindung mit HSP60 ausgegangen werden kann.

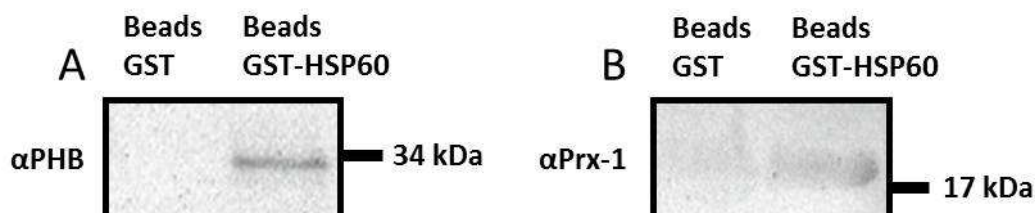


Abb. 7.: Westernblot der gekoppelten Beads mit GST-LNCaP-Zelllysat und mit GST-HSP60-LNCaP-Zelllysat mit Antikörpern gegen Prohibitin (PHB) (A) und Peroxiredoxin-1 (Prx-1) (B)

3.2 Modulation der HSP60-Expression in PCa-Zellen

3.2.1 Klonierung von HSP60-Expressionsvektoren

Um die Funktionen von HSP60 in PCa-Zellen analysieren zu können sollte das Protein überexprimiert und die Zellen hinsichtlich möglicher Effekte auf molekulare und zelluläre Antworten hin untersucht werden. Zur Überexpression wurden zwei Vektoren kloniert: Ein Konstrukt enthielt den Zytomegalie-Virus-Promotor und sollte eine möglichst starke Expression von HSP60 bewirken (pcDNA3.1), während das zweite Konstrukt für den schwächeren Rous-Sarcoma-Virus-Promotor kodierte und nur eine moderate Synthese des Zielproteins ermöglichen sollte (pExpress). Zur Herstellung von PCR-Produkten mit der cDNA-Sequenz von HSP60 wurde das Konstrukt pGEX-6P-1-HSP60 als Template genutzt. Die eingesetzten Primer flankierten den gesamten offenen Leserahmen und besaßen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme an ihren 3'-Enden (*Bam*HI/*Xho*I für pcDNA3.1; *Hind*III/*Nhe*I für pExpress). Nach Restriktion der PCR-Produkte und der korrespondierenden Vektoren konnten die HSP60-Inserts in die entsprechenden Plasmide ligiert werden (Abb. 8).

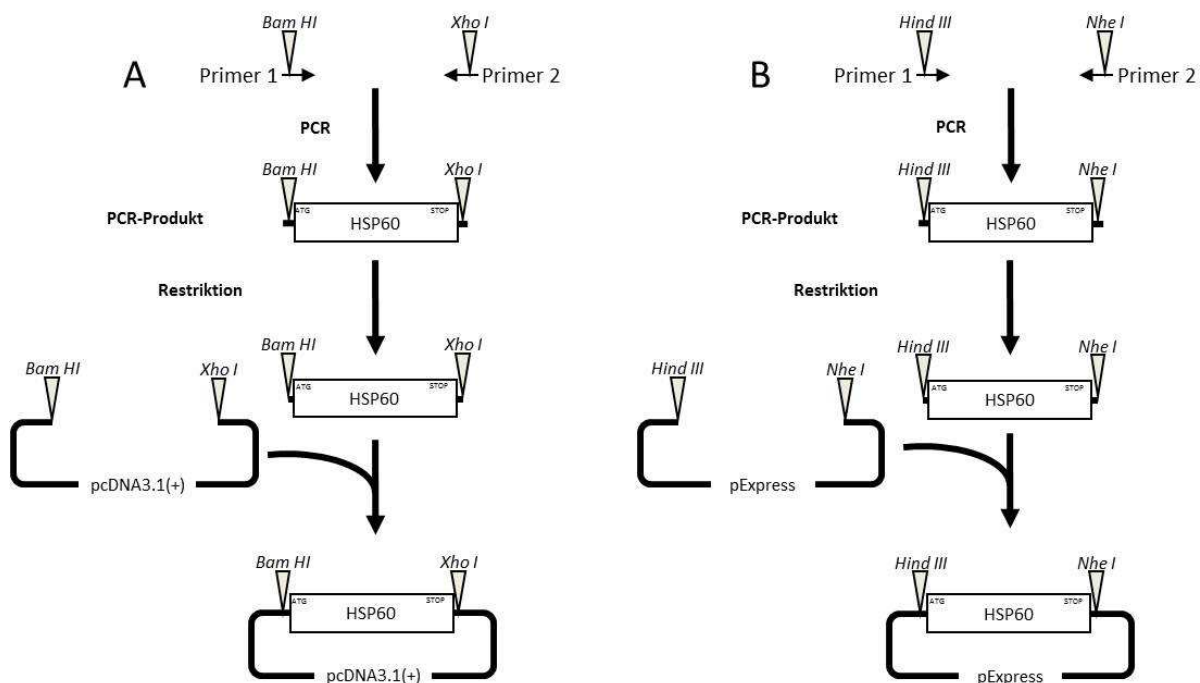


Abb. 8: Strategie zur Klonierung der beiden eukaryotischen Expressionsvektoren (A) pcDNA3.1-HSP60 ((+) Invitrogen,A) und (B) pExpress-HSP60 (Arakawa H. et al. (2001) BMC Biotechnol. Doi 10.1186/1472-6750-1-7); eingesetzte Enzyme sind angegeben

Wie in Abb. 9a und 9b dargestellt zeigten Kontrollgele die erwarteten Fragment-Größen für das HSP60-Insert (1727 bp) und für beide linearisierten Vektoren (pcDNA3.1: 5428 bp; pExpress: 4680 bp). und wurden mittels Sequenzierungen bestätigt. Nach Ligation, Selektion in *E. coli* Zellen und Testverdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI/*Xho*I (pcDNA3.1-HSP60) und *Hind*III/*Nhe*I (pExpress-HSP60) wurden die gleichen Fragmentgrößen detektiert. Zusätzlich wurden beide Expressions-Konstrukte sequenziert.

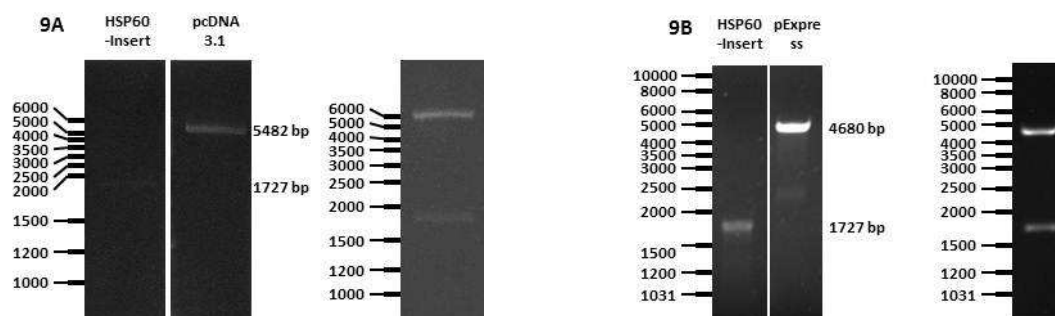


Abb. 2: PCR-Produkt (HSP60-Insert) und Vektor (pGEX-6P-1) vor Ligation und nach Kontrollverdau; (9A) pcDNA3.1, (9B) pExpress

3.2.2 Überexpression von HSP60 in transfizierten PCa-Zellen

Nach Präparation beider Konstrukte konnten die Plasmide pcDNA3.1-HSP60 und pExpress-HSP60 in Transfektionsversuchen eingesetzt und die Effizienz der HSP60-Überexpression charakterisiert werden. Die Konstrukte wurden mittels transients Transfektion in die Prostatakarzinomzelle LNCaP eingebracht und die Expression des Hitzeschockproteins 60 nach unterschiedlichen Inkubationszeiten durch Western Blot Analysen bestimmt.

Dabei zeigte sich ein nur sehr kurzer Anstieg der HSP60-Konzentration in pcDNA3.1-HSP60-transfizierten Zellen, der bereits nach 48 h wieder auf das Niveau der kontroll-transfizierten Zellen absank (Abb. 10.A). In Zellen, in die pExpress-HSP60 eingebracht wurde konnte über den gesamten Zeitraum kein signifikanter Anstieg der HSP60-Expression nachgewiesen werden (Abb. 10.B).

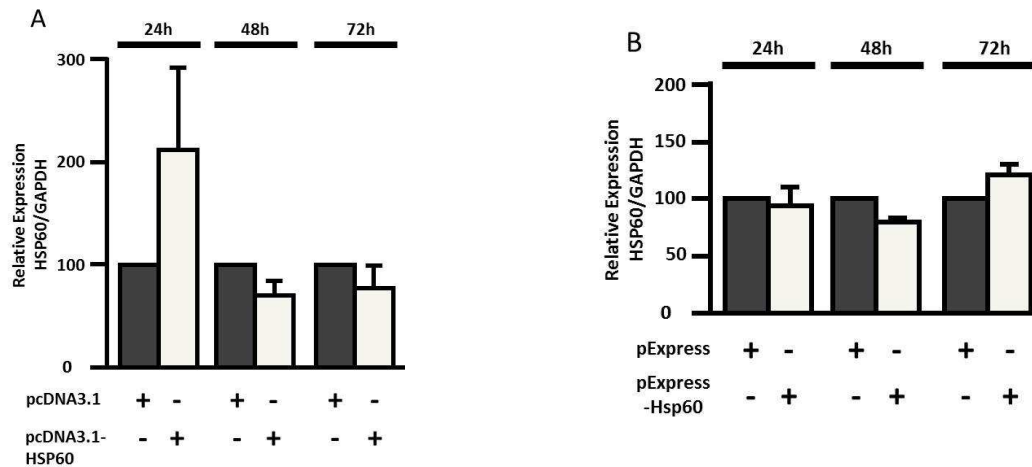


Abb. 10: HSP60-Überexpression nach Transfektion von LNCaP-Zellen mit pcDNA3.1-HSP60 (A) und mit pExpress-HSP60 (B), Analyse per Westernblotting, normalisiert auf GAPDH, dargestellt ist der Mittelwert von mindestens 3 Durchgängen

Auch die Kombination beider Expressionsplasmide in einer Doppeltransfektion führte zu keiner effizienteren Hochregulation der HSP60-Synthese (Abb. 11).

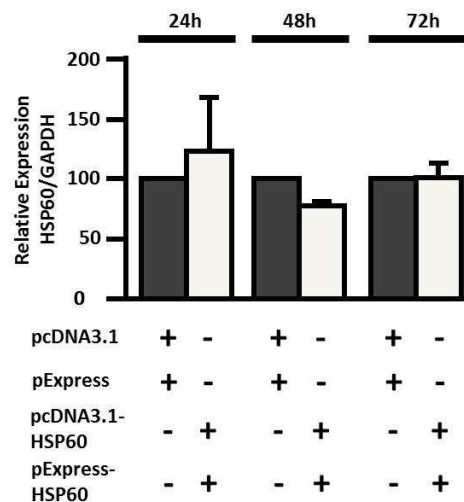


Abb. 11: HSP60-Überexpression nach Transfektion von LNCaP-Zellen mit pcDNA3.1-HSP60 und pExpress-HSP60, Analyse per Westernblotting, normalisiert auf GAPDH, dargestellt ist der Mittelwert von mindestens 3 Durchgängen

Interessanterweise war in allen Durchgängen festzustellen, dass einer wenn auch nur geringen Überexpression von HSP60 stets die rasche Herunterregulation des Proteins folgte.

3.2.3 Klonierung eines HSP60-Knock-Down-Vektors

Zur Modulation der HSP60-Expression in Zellkulturen sollte neben Expressionsvektoren für die Überexpression des Proteins auch ein DNA-Plasmid zum Einsatz kommen, das für die cDNA einer HSP60-spezifischen siRNA kodiert und

somit zu einem Knock-Down von HSP60 führt. Hierzu wurde das pSuperior-System eingesetzt, bei welchem die cDNA für eine small hairpin RNA (shRNA) in einen für die Transkription kurzer RNA-Moleküle optimierten Vektor einkloniert wird. Nach Synthese des shRNA-Abschnittes bildet dieser einen Doppelstrang, wird an einem Ende durch eine zelluläre RNase geschnitten und es kommt schliesslich zur Bildung eines doppelsträngigen RNA-Moleküls, das funktionell einer siRNA entspricht. Das Design der Hybridisierungs-Oligonukleotide und Klonierung des pSuperior-Konstruktes wurde gemäß den Angaben des Vektor-Herstellers durchgeführt. Insgesamt 4 siRNA-Bindungs-Sequenzen in der HSP60-Sequenz wurden ausgewählt und entsprechende Oligonukleotid-Paare bestellt. Die komplementären Oligonukleotide wurden hybridisiert und besaßen an beiden Enden einzelsträngige DNA-Sequenzen, die für die Ligation in den mit *Bgl*II und *Xho*I verdauten Vektor pSuperior genutzt werden konnten (Abb. 12).

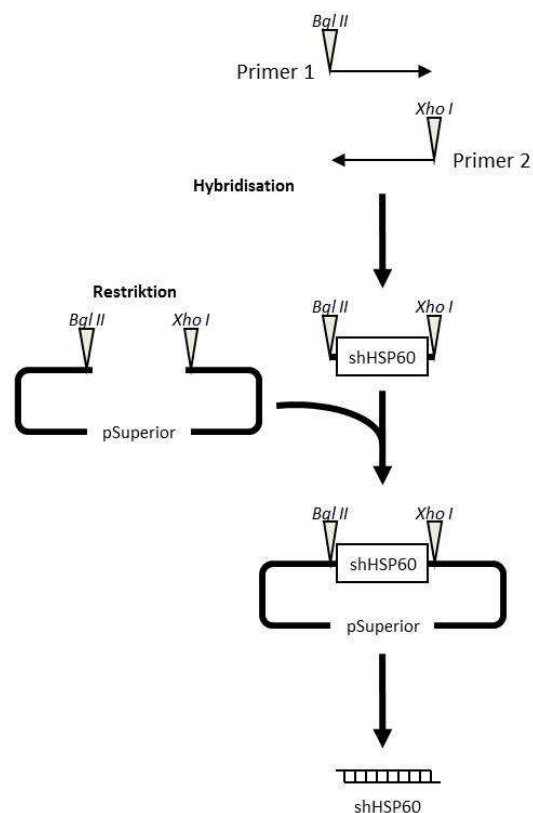


Abb. 12: Strategie zur Klonierung des eukaryotischen Expressionsvektors pSuperior (Oligoengine); eingesetzte Enzyme sind angegeben

Die Hybridisierungsprodukte mit einer kalkulierten Länge von 68 bp konnten im Gel detektiert (Abb. 13.A) und in der Folge in den *BglII/XhoI*-geschnittenen Vektor pSuperior (3177 bp; Abb. 13.B) ligiert werden. Die Validierung der Ligations-Produkte erfolgte durch Sequenzierung der kurzen shRNA-Inserts, da die Hybridisierungsprodukte nicht die vollständige Erkennungssequenz für die Restriktionsenzyme besaßen und somit nicht durch Testverdau identifiziert werden konnten.

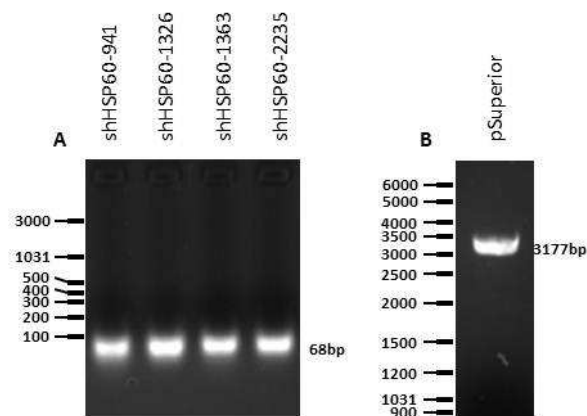


Abb. 13: PCR-Produkte (HSP60-Insert) und Vektor (pSuperior); A) vor Ligation und B) nach Kontrollverdau

3.2.4 Knock-Down von HSP60 in transfizierten PCa-Zellen

Zur Ermittlung der shRNA-Sequenz mit der höchsten Knock-Down Effizienz wurden Transfektionsexperimente mit allen 4 Konstrukten mit den HSP60-spezifischen siRNA-Sequenzen 941, 1326, 1363 und 2235 durchgeführt. Die Unterschiede zwischen den Konstrukten waren sehr gering, für alle weiteren Versuche wurde daher nur noch der pSuperior-shHSP60 Klon 2235 eingesetzt (folgend als pSuperior-shHSP60 bezeichnet).

Nach transienter Transfektion von pSuperior-shHSP60 in LNCaP-Zellen zeigte sich ein leichtes Absenken der HSP60-Expression nach 24 h. Nach 48 h kam es jedoch wieder zu einem Anstieg der HSP60-Expression in den Zellen (Abb. 14).

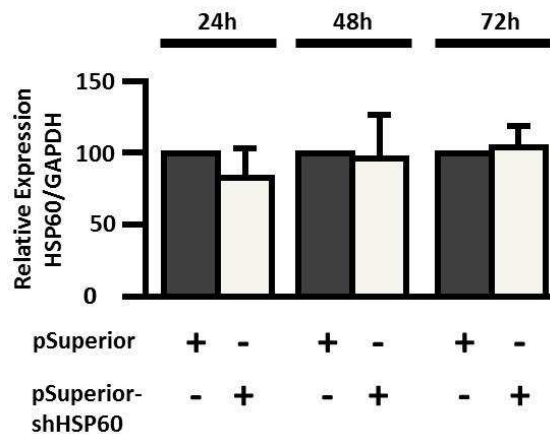


Abb. 14: HSP60-Knock-Down nach Transfektion von LNCaP-Zellen mit pSuperior-shHSP60, Analyse per Westernblotting, normalisiert auf GAPDH, dargestellt ist der Mittelwert von mindestens 3 Durchgängen

Wie bereits bei den HSP60-Überexpressionsversuchen angedeutet zeigten auch die Knock-Down Experimente, dass einer HSP60-Modulation eine sehr rasche Gegenregulation zu folgen scheint.

3.3 Regulation der HSP60-Expression durch den AR-Liganden Dihydrotestosteron (DHT)

Da PCa-Zellen insbesondere bezüglich ihrer Proliferation, aber auch hinsichtlich einiger weiterer zentraler Zellantworten durch Androgene und AR-abhängige Signalkaskaden gesteuert werden, sollte überprüft werden, ob das apoptotische Protein HSP60 ebenfalls zu den androgen-abhängigen Faktoren gehört.

Hierzu wurde die androgen-abhängige PCa-Linie LNCaP und die androgen-insensitive Linie PC-3 mit dem wirksamsten AR-Liganden Dihydrotestosteron (DHT; 10 μ M) inkubiert und ein möglicher Einfluss auf die Expression von HSP60 durch Western Blot Analysen untersucht (Abb. 15).

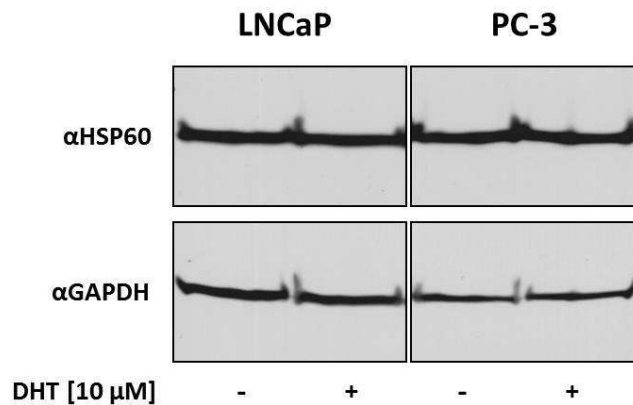


Abb. 15: Modulation der HSP60-Expression nach Inkubation der LNCaP- und PC-3-Zellen mit DHT, Analyse per Westernblotting

Es zeigte sich in mehreren Durchgängen, dass DHT keinen Einfluss auf die Expressionsrate von HSP60 hatte. Da zum Zeitpunkt dieser Versuchsansätze die Dokumentationseinheit ChemiDoc noch nicht vorhanden war, wurde auf eine statistische Quantifizierung verzichtet.

3.4 Regulation der HSP60-Expression durch den Tumorsuppressor mikroRNA-1 (miR-1)

miR-1 ist in der Literatur als Tumorsuppressor beschrieben und könnte daher neben anderen Target-Genen auch solche apoptotischer Faktoren steuern. Es wurde daher untersucht, ob miR-1 einen regulativen Einfluß auf die Expression von HSP60 haben könnte.

Wie in Abb. 16 dargestellt führte die Inhibition von miR-1 sowohl auf mRNA- wie auch auf Protein-Ebene zu einer reduzierten HSP60-Expression verglichen mit den Kontrollzellen. Umgekehrt bewirkte die Überexpression von miR-1 einen Anstieg der HSP60-Expression, wiederum auf mRNA- wie auch auf Protein-Ebene gezeigt.

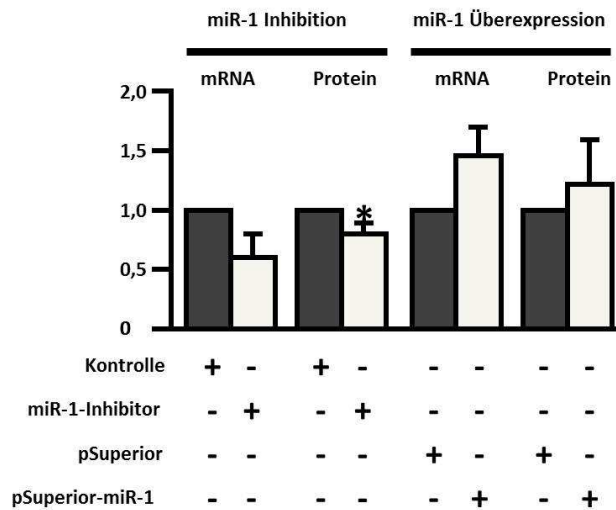


Abb. 16: Modulation der miR-1 durch Inhibition (miR-1-Inhibitor) und Überexpression (pSuperior-miR-1) und anschließender quantitativer Real-Time PCR, als Referenz dient die U6 mRNA. Inhibition führt zu einem Absinken der HSP60-Expression auf mRNA-Ebene (0,59 +/- 0,20; p=0,06) und Protein-Ebene (0,80 +/- 0,08; p=0,01) (statistisch signifikant); miR-1 Überexpression führt zu einem Anstieg der HSP60-Expression auf mRNA-Ebene (1,45 +/- 0,25; p=0,11) und Protein-Ebene (1,21 +/- 0,39; p=0,32)

Hierbei muss jedoch kritisch angemerkt werden, dass nur die Suppression des HSP60 Proteins nach miR-1 Inhibition statistisch signifikant war (p=0,010). Die anderen Datensätze stellen demnach Tendenzen dar, die jedoch sowohl auf mRNA- und Protein-Ebene sowie durch miR-1 Überexpression wie auch Inhibition bestätigt werden konnten.

4 Diskussion

Für funktionelle Untersuchungen von HSP60 in PCa-Zellen wurden DNA-Konstrukte kloniert, deren Expression in transfizierten Zellen zu einer Überexpression oder einer siRNA-vermittelten Herabregulation der HSP60-Synthese führen sollte. Diese Plasmide sollten dann in folgenden Transfektionsexperimenten genutzt werden, um die intrazelluläre HSP60-Konzentration zu modulieren und daraus resultierende Änderungen von Expressionsraten anderer Faktoren oder von zellulären Antworten wie Apoptose und Proliferation analysieren zu können. Solche Untersuchungen sind dazu geeignet, Rückschlüsse auf die Funktionen von HSP60 und auf die Beteiligung weiterer Signal- und Effektormoleküle zu ziehen.

Für die Klonierungen wurde die Sequenz von HSP60 in die beiden Überexpressionsvektoren pcDNA3.1 und pExpress sowie vier HSP60-spezifische siRNA-Sequenzen in den shRNA-Vektor pSuperior kloniert. Die folgenden Analysen

der HSP60-Expression in entsprechend transfizierten Zellen durch Western Blotting zeigten jedoch, dass weder eine deutliche Überexpression noch ein effektiver Knock-Down des Hitzeschockproteins erreicht werden konnte. Dies wurde auch nicht nach Änderungen der Transfektionsbedingungen bezüglich Transfektionsreagenzien, eingesetzter Zellzahl und DNA-Menge oder durch Elektroporation erreicht. Mit dem Vektor pcDNA3.1 wurde ein oft genutzter und auch in unserem Labor lange etablierter Vektor eingesetzt, der für eine starke Überexpression von HSP27 und AR in PCa-Zellen geeignet ist [50, 55]. Dennoch war in Testreihen mit dem Konstrukt pcDNA3.1-HSP60 nur ein kurzer und sehr geringer Anstieg der HSP60-Expression nachweisbar. Da eine zu hohe Expression von rekombinanten Proteinen auch zu zellulären Gegenregulationen führen kann, wurde statt des starken Expressionsvektors pcDNA3.1 der Vektor pExpress mit einem deutlich schwächeren Promotor getestet [56]. Jedoch war auch nach Transfektion von pExpress-HSP60 keine ausreichende Überexpression des Proteins detektierbar. Ebenso erbrachten Doppeltransfektionen mit beiden Konstrukten und sequentielle Transfektionen, d. h. zweimalige Transfektionen eines Zellansatzes im Abstand von 48 h keine effizientere Überexpression von HSP60. Interessanterweise zeigten sich vergleichbare Ergebnisse bei den Knock-Down-Experimenten mit den vier transfizierten shRNA-Vektoren. Auch hierbei konnte nur ein sehr geringes und zeitlich begrenztes Sinken der HSP60-Konzentration mit allen vier getesteten HSP60-spezifischen siRNA-Sequenzen nachgewiesen werden. Da die kurze Modulation der HSP60-Expression jedoch sowohl bei Überexpression als auch bei Knock-Down-Ansätzen reproduzierbar auftrat, könnte man eine rasche und sehr effiziente Gegenregulation durch zelluläre Mechanismen vermuten. Dies wäre im Fall von HSP60 ein Hinweis darauf, dass das Protein kritische physiologische Funktionen erfüllt, die keine stärkeren Abweichungen der intrazellulären Konzentration tolerieren. Da die klonierten Vektoren zur Modulation der HSP60-Expression kaum Effekte zeigten, waren geplante Wachstumskinetiken mit überexprimierten und herabregulierten HSP60-Leveln nicht möglich. Somit ist der Einfluss von HSP60 auf das Wachstum von PCa-Zellen nicht zu untersuchen gewesen und eine erste Aussage, ob HSP60 im PCa pro- oder anti-apoptotisch wirkt, nicht möglich.

Um mehr über potentielle Funktionen von HSP60 in PCa-Zellen zu erfahren wurde ein Konstrukt hergestellt, das die bakterielle Expression eines GST-HSP60-Fusionsproteins ermöglichte und mit dem Pull-Down Assays durchgeführt werden

konnten. Hierbei zeigte sich erwartungsgemäß, dass durch die sehr sensitive massenspektrometrische Analyse der Proben zahlreiche potentielle Bindungspartner detektiert werden konnten. Es handelte sich dabei aber zum großen Teil um hochabundante Strukturproteine und Proteine des Grundstoffwechsels, die regelmäßig detektiert und als unspezifischer Hintergrund betrachtet werden können. Eine Validierung der massenspektrometrischen Auswertung beschränkte sich daher nur auf Faktoren von Proliferation, Apoptose und Chemoresistenz. Für HSP70, PARP und Prx-2 konnten in Western Blotting Analysen von Pull-Down Ansätzen keine Bindung an HSP60 bestätigt werden, Prx-1 und PHB jedoch waren auch durch Immunoblotting als HSP60-Bindungspartner nachweisbar.

Das mitochondriale Protein PHB ist in der inneren Membran der Organelle lokalisiert und wird als Regulator von Proliferation und Apoptose beschrieben [57-60]. In PCa-Zellen ist PHB zudem ein Inhibitor der AR Expression und Funktion [61-63], und somit insbesondere bei der Progression des PCa von besondere Bedeutung. Die Funktionen bei der Steuerung apoptotischer Mechanismen, aber auch die Lokalisation in Mitochondrien lassen eine funktionelle Interaktion von PHB und dem apoptotischen Faktor HSP60 als möglich erscheinen. Ebenso plausibel ist die potentielle Bindung von HSP60 und Prx-1, wie sie die vorliegenden experimentellen Daten nahe legen. Prx-1 ist wie PHB ebenfalls an der Kontrolle von Zellproliferation [64, 65] und Apoptose [66, 67] beteiligt. Diesen Funktionen entsprechend kann Prx-1 auch als Resistenzfaktor gegenüber Chemo- und Strahlentherapie wirken [68-70]. Da HSP60 auch im Zytosol vorliegt [71] ist auch eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit dem zytosolischen Faktor Prx-1 [72] nicht ausgeschlossen.

In einem weiteren Teilprojekt der vorliegenden Arbeit wurden Faktoren untersucht, die die Expression von HSP60 steuern und damit HSP60-spezifische Aktivitäten regulieren können. Da der AR sowie AR-abhängige Signalkaskaden die Progression von PCa-Zellen wesentlich beeinflussen, wurde ein möglicher Einfluss des AR-Liganden DHT untersucht. Inkubationsexperimente mit der Androgen-sensitiven PCa-Linie LNCaP zeigten jedoch keinen Einfluss von DHT und dadurch aktivierter AR-vermittelter Signalkaskaden auf die Expression von HSP60. Trotz der zentralen Rolle bei der Regulation von PCa-Zellen scheint der AR Expression und Funktion von HSP60 nicht zu kontrollieren.

Mit der kleinen regulatorischen MikroRNA miR-1 dagegen konnte ein Regulator der HSP60-Expression identifiziert werden. In anderen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die Expression von miR-1 in PCa-Zellen durch das kleine Hitzeschockprotein HSP27 supprimiert wird [73]. Da miR-1 als Tumorsuppressor beschrieben wird, wurde daher eine funktionelle Verbindung mit dem apoptotischen Faktor HSP60 vermutet. miR-1 ist ursprünglich als Kardiomyozyten-spezifische MikroRNA beschrieben worden [74-76], jedoch zeigten aktuelle Publikationen, dass miR-1 neben weiteren soliden Tumoren auch im PCa eine Rolle bei der Progression spielen kann [77-79]. Entsprechend dieser Funktion zeigten histologische Studien auch, dass der Tumorsuppressor miR-1 in malignen Zellen des PCa verglichen mit nicht-malignen Gewebereichen der Prostata herunterreguliert ist [78]. In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass miR-1 ein Induktor des apoptotischen Faktors HSP60 darstellt und diesen auf mRNA- wie auch auf Protein-Ebene induziert. Gemäß der tumorsuppressiven Funktion von miR-1 kann daraus abgeleitet werden, dass HSP60 in PCa-Zellen pro-apoptische Effekte vermittelt. Aufgrund der geringen Effizienz der HSP60-Überexpressions-Konstrukte war jedoch eine Überprüfung dieser Hypothese im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Insgesamt stellen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit den apoptotischen Faktor HSP60 als einen wichtigen Faktor dar, der in PCa-Zellen durch bisher nicht bekannte Mechanismen auf Ebene der Protein-Konzentration sehr exakt reguliert wird. Dies erschwert weitere experimentelle Untersuchungen zur Funktion von HSP60 bei der Progression des PCa. Möglicherweise könnte ein Vektor-System mit induzierbaren Promotor einer raschen zellulären Gegenregulation entgegenwirken und durch eine effizientere Modulation des HSP60-Proteins funktionelle Untersuchungen ermöglichen. Denkbar wäre auch der Einsatz viraler Vektorensysteme, um eine höhere und vor allem länger anhaltende Effizienz des DNA-Transfers zu erhalten. Andererseits lässt die präzise Regulation der intrazellulären HSP60-Konzentration vermuten, dass es sich bei diesem Protein um einen essentiellen Faktor der Zellphysiologie handelt. Die Regulation durch den Tumorsuppressor miR-1 sowie die direkte Protein-Protein-Bindung mit den beiden apoptotischen Proteinen Prx-1 und PHB deuten darauf hin, dass HSP60 apoptotische Vorgänge in PCa-Zellen steuern kann und somit ein wichtiger Faktor bei Entwicklung und Progression maligner Zellen darstellt.

5 Zusammenfassung

Tumorbiologie und molekulare Mechanismen der Progression des Prostatakarzinoms (PCa) sind komplex und bisher nur unzureichend verstanden. Trotz einiger medikamentöser Ansätze zur Therapie des PCa mit teilweise neuartigen Wirkstoffen spielen primäre und sekundäre Therapie-Resistenzen bei der Behandlung eine große Rolle. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des apoptotischen Faktors Hitzeschockprotein HSP60 in PCa-Zellen, um potentielle Signalkaskaden und Effektormoleküle einer HSP60-abhängigen PCa-Progression aufzudecken.

Durch massenspektrometrische Analysen von potentiellen HSP60-Bindungspartnern wurden mit den Proteinen Peroxiredoxin-1 (Prx-1), Peroxiredoxin-2 (Prx-2), Hitzeschockprotein HSP70, Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) sowie Prohibitin (PHB) Kandidaten identifiziert, die bei Chemoresistenz wie auch bei proliferativen und apoptotischen Prozessen eine Rolle spielen können. Jedoch konnten durch Western Blot Analysen der Bindungs-Experimente nur Prx-1 und PHB als HSP60-Bindungspartner bestätigt werden. Die Modulation der HSP60-Expression mittels klonierter Überexpressions- und Knock-Down-Vektoren schlug aufgrund einer mutmaßlichen starken und sehr raschen zellulären Gegenregulation fehl. Dies kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass es sich bei HSP60 um einen essentiellen zellulären Faktor mit einer sehr stringenten Expressions-Kontrolle handeln könnte. Analysen der HSP60-Expression nach Modulation der Syntheseraten von miR-1 zeigten eine deutliche Induktion des Hitzeschockproteins durch die MikroRNA.

Die Frage, ob HSP60 in PCa-Zellen pro- oder anti-apoptotisch wirkt, konnte mangels effizienter Modulation der HSP60-Expression nicht ausführlicher untersucht werden. Da der positive HSP60-Regulator miR-1 jedoch als Tumorsuppressor beschrieben wird und eine Protein-Protein-Interaktion von HSP60 mit den pro-apoptotischen Proteinen Prx-1 und PHB nachgewiesen werden konnte, kann man die begründete Annahme formulieren, dass HSP60 in PCa-Zellen pro-apoptotische Funktionen ausführt.

6 Literaturverzeichnis

1. McNeal, J.E., *The zonal anatomy of the prostate*. Prostate, 1981. 2(1): p. 35-49.
2. Garcia, F.U., M.M. Haber, and X. Chen, *Prostatic basal cells in the peripheral and transitional zones: zonal variation in morphology and in immunophenotype*. Prostate, 2007. 67(15): p. 1686-92.
3. De Marzo, A.M., D.S. Coffey, and W.G. Nelson, *New concepts in tissue specificity for prostate cancer and benign prostatic hyperplasia*. Urology, 1999. 53(3 Suppl 3a): p. 29-39; discussion 39-42.
4. Azzouni, F. and J. Mohler, *Role of 5alpha-reductase inhibitors in prostate cancer prevention and treatment*. Urology, 2012. 79(6): p. 1197-205.
5. Cunha, G.R., et al., *The endocrinology and developmental biology of the prostate*. Endocr Rev, 1987. 8(3): p. 338-62.
6. Robert Koch Institut (RKI) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID), *Krebs in Deutschland 2007/2008*. Berlin 2012.
7. Stenman, U.H., et al., *Prostate-specific antigen*. Semin Cancer Biol, 1999. 9(2): p. 83-93.
8. Penney, K.L., et al., *Gleason grade progression is uncommon*. Cancer Res, 2013. 73(16): p. 5163-8.
9. Wojcieszek, P. and B. Bialas, *Prostate cancer brachytherapy: guidelines overview*. J Contemp Brachytherapy, 2012. 4(2): p. 116-20.
10. Partin, A.W., et al., *Prostate-specific antigen as a marker of disease activity in prostate cancer*. Oncology (Williston Park), 2002. 16(9): p. 1218-24; discussion 1224, 1227-8 passim.
11. Leibovici, D., et al., *How accurate is our clinical prediction of "minimal prostate cancer"?* Isr Med Assoc J, 2013. 15(7): p. 359-63.
12. Etzioni, R., et al., *Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends*. J Natl Cancer Inst, 2002. 94(13): p. 981-90.
13. Breidablik, H.J., et al., *PSA measurement and prostate cancer--overdiagnosis and overtreatment?* Tidsskr Nor Laegeforen, 2013. 133(16): p. 1711-6.
14. Klotz, L., *Active surveillance for prostate cancer: overview and update*. Curr Treat Options Oncol, 2013. 14(1): p. 97-108.
15. Aizer, A.A., et al., *Multidisciplinary care and pursuit of active surveillance in low-risk prostate cancer*. J Clin Oncol, 2012. 30(25): p. 3071-6.
16. Villers, A., et al., *Summary of the Standards, Options and Recommendations for the management of patients with nonmetastatic prostate cancer (2001)*. Br J Cancer, 2003. 89 Suppl 1: p. S50-8.
17. Mackler, N.J. and K.J. Pienta, *Drug insight: Use of docetaxel in prostate and urothelial cancers*. Nat Clin Pract Urol, 2005. 2(2): p. 92-100; quiz 1 p following 112.
18. Colloca, G., A. Venturino, and F. Checcaglini, *Second-line chemotherapy in metastatic docetaxel-resistant prostate cancer: a review*. Med Oncol, 2012. 29(2): p. 776-85.
19. Bishr, M. and F. Saad, *Overview of the latest treatments for castration-resistant prostate cancer*. Nat Rev Urol, 2013. 10(9): p. 522-8.
20. Hammerer, P. and S. Madersbacher, *Landmarks in hormonal therapy for prostate cancer*. BJU Int, 2012. 110 Suppl 1: p. 23-9.

21. Van Poppel, H. and L. Klotz, *Gonadotropin-releasing hormone: an update review of the antagonists versus agonists*. Int J Urol, 2012. 19(7): p. 594-601.
22. Lama, G., et al., *Leuprorelin acetate long-lasting effects on GnRH receptors of prostate cancer cells: an atomic force microscopy study of agonist/receptor interaction*. PLoS One, 2013. 8(1): p. e52530.
23. Sonesson, A. and B.B. Rasmussen, *In vitro and in vivo human metabolism of degarelix, a gonadotropin-releasing hormone receptor blocker*. Drug Metab Dispos, 2013. 41(7): p. 1339-46.
24. Furr, B.J., *The development of Casodex (bicalutamide): preclinical studies*. Eur Urol, 1996. 29 Suppl 2: p. 83-95.
25. Furr, B.J. and H. Tucker, *The preclinical development of bicalutamide: pharmacodynamics and mechanism of action*. Urology, 1996. 47(1A Suppl): p. 13-25; discussion 29-32.
26. Pham-Huu-Trung, M.T., et al., *Effects of cyproterone acetate on adrenal steroidogenesis in vitro*. Horm Res, 1984. 20(2): p. 108-15.
27. Gelfand, V.I. and A.D. Bershadsky, *Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function*. Annu Rev Cell Biol, 1991. 7: p. 93-116.
28. Gelmon, K., *The taxoids: paclitaxel and docetaxel*. Lancet, 1994. 344(8932): p. 1267-72.
29. Vrignaud, P., et al., *Preclinical antitumor activity of cabazitaxel, a semisynthetic taxane active in taxane-resistant tumors*. Clin Cancer Res, 2013. 19(11): p. 2973-83.
30. Attard, G., et al., *Update on tubulin-binding agents*. Pathol Biol (Paris), 2006. 54(2): p. 72-84.
31. Attard, G., A.S. Beldegrun, and J.S. de Bono, *Selective blockade of androgenic steroid synthesis by novel lyase inhibitors as a therapeutic strategy for treating metastatic prostate cancer*. BJU Int, 2005. 96(9): p. 1241-6.
32. Semenas, J., N. Dizeyi, and J.L. Persson, *Enzalutamide as a second generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer*. Drug Des Devel Ther, 2013. 7: p. 875-81.
33. Scher, H.I., et al., *Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1-2 study*. Lancet, 2010. 375(9724): p. 1437-46.
34. Zoubeydi, A., et al., *Cooperative interactions between androgen receptor (AR) and heat-shock protein 27 facilitate AR transcriptional activity*. Cancer Res, 2007. 67(21): p. 10455-65.
35. Lamoureux, F., et al., *Clusterin inhibition using OGX-011 synergistically enhances Hsp90 inhibitor activity by suppressing the heat shock response in castrate-resistant prostate cancer*. Cancer Res, 2011. 71(17): p. 5838-49.
36. De Leon, J.T., et al., *Targeting the regulation of androgen receptor signaling by the heat shock protein 90 cochaperone FKBP52 in prostate cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(29): p. 11878-83.
37. Deshmukh, R.R., et al., *Chemotherapeutic inhibitors in the treatment of prostate cancer*. Expert Opin Pharmacother, 2013.
38. Galletti, E., et al., *Paclitaxel and docetaxel resistance: molecular mechanisms and development of new generation taxanes*. ChemMedChem, 2007. 2(7): p. 920-42.
39. Baylot, V., et al., *Targeting TCTP as a new therapeutic strategy in castration-resistant prostate cancer*. Mol Ther, 2012. 20(12): p. 2244-56.
40. Shan, Y.X., et al., *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): p. 1135-43.

41. Ghosh, J.C., et al., *Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis*. J Biol Chem, 2008. 283(8): p. 5188-94.
42. Samali, A., et al., *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): p. 2040-8.
43. Xanthoudakis, S., et al., *Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis*. EMBO J, 1999. 18(8): p. 2049-56.
44. De Maio, A., *Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams*. Shock, 1999. 11(1): p. 1-12.
45. Walter, S. and J. Buchner, *Molecular chaperones--cellular machines for protein folding*. Angew Chem Int Ed Engl, 2002. 41(7): p. 1098-113.
46. Wu, C., *Heat shock transcription factors: structure and regulation*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. 11: p. 441-69.
47. Santoro, M.G., *Heat shock factors and the control of the stress response*. Biochem Pharmacol, 2000. 59(1): p. 55-63.
48. Cornford, P.A., et al., *Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer*. Cancer Res, 2000. 60(24): p. 7099-105.
49. Tang, D., 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): p. 46-58.
50. Stope, M.B., 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): p. 327-31.
51. Hadaschik, B.A., et al., *[Stress proteins in prostate cancer. Challenge and promise]*. Urologe A, 2007. 46(5): p. 516-20.
52. Stope, M.B., et al., *Androgen receptor and heat shock proteins in progression of prostate cancer cells*. Int J Clin Pharmacol Ther, 2012. 50(1): p. 65-7.
53. Cappello, F., et al., *Immunohistochemical evaluation of PCNA, p53, HSP60, HSP10 and MUC-2 presence and expression in prostate carcinogenesis*. Anticancer Res, 2003. 23(2B): p. 1325-31.
54. Castilla, C., et al., *Immunohistochemical expression of Hsp60 correlates with tumor progression and hormone resistance in prostate cancer*. Urology, 2010. 76(4): p. 1017 e1-6.
55. Stope, M.B., et al., *Shortened isoforms of the androgen receptor are regulated by the cytoprotective heat-shock protein HSPB1 and the tumor-suppressive microRNA miR-1 in prostate cancer cells*. Anticancer Res. accepted, 2013.
56. Arakawa, H., D. Lodygin, and J.M. Buerstedde, *Mutant loxP vectors for selectable marker recycle and conditional knock-outs*. BMC Biotechnol, 2001. 1: p. 7.
57. Wang, S., et al., *Prohibitin, a potential tumor suppressor, interacts with RB and regulates E2F function*. Oncogene, 1999. 18(23): p. 3501-10.
58. Wang, S., et al., *Rb and prohibitin target distinct regions of E2F1 for repression and respond to different upstream signals*. Mol Cell Biol, 1999. 19(11): p. 7447-60.
59. Zhang, L., et al., *Prohibitin induces apoptosis in BGC823 gastric cancer cells through the mitochondrial pathway*. Asian Pac J Cancer Prev, 2012. 13(8): p. 3803-7.
60. Zhu, B., et al., *Prohibitin regulates TGF-beta induced apoptosis as a downstream effector of Smad-dependent and -independent signaling*. Prostate, 2010. 70(1): p. 17-26.

61. Kang, T., et al., *MiR-27 Targets Prohibitin and Impairs Adipocyte Differentiation and Mitochondrial Function in Human Adipose-derived Stem Cells*. J Biol Chem, 2013.
62. Fletcher, C.E., et al., *Androgen-regulated processing of the oncomir miR-27a, which targets Prohibitin in prostate cancer*. Hum Mol Genet, 2012. 21(14): p. 3112-27.
63. Dart, D.A., et al., *Manipulating prohibitin levels provides evidence for an in vivo role in androgen regulation of prostate tumours*. Endocr Relat Cancer, 2009. 16(4): p. 1157-69.
64. Cha, M.K., K.H. Suh, and I.H. Kim, *Overexpression of peroxiredoxin I and thioredoxin1 in human breast carcinoma*. J Exp Clin Cancer Res, 2009. 28: p. 93.
65. Chua, P.J., et al., *Silencing the Peroxiredoxin III gene inhibits cell proliferation in breast cancer*. Int J Oncol, 2010. 36(2): p. 359-64.
66. Wolf, G., et al., *Peroxiredoxin III protects pancreatic ss cells from apoptosis*. J Endocrinol, 2010. 207(2): p. 163-75.
67. Kim, S.Y., T.J. Kim, and K.Y. Lee, *A novel function of peroxiredoxin 1 (Prx-1) in apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-mediated signaling pathway*. FEBS Lett, 2008. 582(13): p. 1913-8.
68. He, T., et al., *Peroxiredoxin 1 knockdown potentiates beta-lapachone cytotoxicity through modulation of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase signals*. Carcinogenesis, 2013. 34(4): p. 760-9.
69. Gao, M.C., et al., *Silencing Prx1 and/or Prx5 sensitizes human esophageal cancer cells to ionizing radiation and increases apoptosis via intracellular ROS accumulation*. Acta Pharmacol Sin, 2011. 32(4): p. 528-36.
70. Chaudhary, A., T. Pechan, and K.L. Willett, *Differential protein expression of peroxiredoxin I and II by benzo(a)pyrene and quercetin treatment in 22Rv1 and PrEC prostate cell lines*. Toxicol Appl Pharmacol, 2007. 220(2): p. 197-210.
71. Gupta, S. and A.A. Knowlton, *Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis*. Circulation, 2002. 106(21): p. 2727-33.
72. Wood, Z.A., et al., *Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins*. Trends Biochem Sci, 2003. 28(1): p. 32-40.
73. Stope, M.B., et al., *Chemoresistance in prostate cancer is initiated by phosphorylation of the heat shock protein HSP27 and subsequent suppression of microRNA miR-1*. unter Begutachtung, 2013.
74. Han, M., J. Toli, and M. Abdellatif, *MicroRNAs in the cardiovascular system*. Curr Opin Cardiol, 2011. 26(3): p. 181-9.
75. Oliveira-Carvalho, V., et al., *MicroRNAs: new players in heart failure*. Mol Biol Rep, 2013. 40(3): p. 2663-70.
76. Zhu, H. and G.C. Fan, *Role of microRNAs in the reperfused myocardium towards post-infarct remodelling*. Cardiovasc Res, 2012. 94(2): p. 284-92.
77. Hudson, R.S., et al., *MicroRNA-1 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in human prostate cancer*. Nucleic Acids Res, 2012. 40(8): p. 3689-703.
78. Kojima, S., et al., *Tumour suppressors miR-1 and miR-133a target the oncogenic function of purine nucleoside phosphorylase (PNP) in prostate cancer*. Br J Cancer, 2012. 106(2): p. 405-13.
79. Ambs, S., et al., *Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer*. Cancer Res, 2008. 68(15): p. 6162-70.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A. bidest	Aqua bidestillata
Abb.	Abbildung
AR	Androgenrezeptor
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
CLU	Clusterin
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
d.h.	das heißt
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTT	1,4-Dithiothreitol
et al.	und andere
FCS	fetals calf serum
GAPDH	Glyceinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormone
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HSF-1	Hitzeschockfaktor-I
HSP105	Hitzeschockprotein HSP105
HSP27	Hitzeschockprotein HSP27
HSP60	Hitzeschockprotein HSP60
HSP70	Hitzeschockprotein HSP70
HSP75	Hitzeschockprotein HSP105
HSP90	Hitzeschockprotein HSP90
kDA	Kilodalton
LH	lutenisierendes Hormon
LHRH	lutenisierendes Hormon releasing Hormon
mA	Miliampere
min	Minute
miR-1	Mikro-RNA-1
ml	Mililiter
mM	Milimolar
mRNA	messenger ribonucleic acid

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly ADP Ribose Polymerase
PBS	phosphate buffered saline
PCa	Prostatakarzinom
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHB	Prohibitin
Prx-1	Peroxiredoxin-1
Prx-2	Peroxiredoxin-2
PSA	prostata-spezifisches Antigen
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
RNA	ribonucleic acid
RPMI-Medium	Roswell-Park-Memorial-Institute-Medium
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate
shRNA	small hairpin ribonucleic acid
siRNA	small interfering ribonucleic acid
TBS	tris buffered saline
TBS-T	TBS mit 0,1 % Tween 20
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Regulation und Funktionalität des Hitzeschockproteins HSP60 in Prostatakarzinomzellen“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät und keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich kein anderes Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass die Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Andreas Streitbörger

Geburtsdatum: 02.02.1979

Geburtsort: Coesfeld

Familienstand: ledig

Wissenschaftliche Tätigkeit

- Seit 2012 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand)**
Klinik und Poliklinik für Urologie, Universitätsmedizin Greifswald
Forschungslabor
- 2005 – 2009 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Hilfswissenschaftler)**
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B, Universitätsmedizin Greifswald
Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Universitätsmedizin Greifswald

Beruf

- Seit 2009 **Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Urologie**
Universitätsmedizin Greifswald

Studium

- 2002-2008 **Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald**
Studium der Humanmedizin

Berufsausbildung

- 1999-2002 **Ausbildung zum Krankenpfleger am UKM**

Zivildienst

- 1998-1999 **Universitätskrankenhaus Münster (UKM)**

Schulische Ausbildung

- 1998 **Allgemeine Hochschulreife**

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Burchard gebührt mein Dank für die Möglichkeit diese Arbeit durchzuführen und vor allem für die Motivierung im entscheidenden Moment.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Walther, Frau Dr. rer. nat. Venz und allen Mitarbeitern des Instituts für medizinische Biochemie und Molekularbiologie danke ich für die allzeit vorhandene freundliche Unterstützung und Beratung.

Beim gesamten Team des urologischen Forschungslabores namentlich Anne Brandenburg, Juliane Bradl, Melanie Preuß, Lisa Rauschenberger, Martin Weiß, Christian Stender, Tina Schubert, Stefanie Peters und Katja Wittig möchte ich mich für die schöne Zeit, die vielen vielen Erklärungen und die allzeit vorhandene Hilfsbereitschaft danken.

All meinen Freunden und Kollegen, die mich während der ganzen Zeit trotz heftiger Stimmungsschwankungen meinerseits ertragen, motiviert und unterstützt haben danke ich herzlichst.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben Medizin zu studieren und ein Leben nach meinen Vorstellungen zu führen.

Meiner Freundin Marie danke ich für ihre unendliche Geduld und Unterstützung und das Aushalten so manch eines Sturmes.

„Last but not least“ gebührt mein außerordentlicher Dank Herrn Dr. rer. nat. Matthias Stope. Ohne seine erstaunliche Geduld, Hartnäckigkeit und unermüdlichen Korrekturen hätte es diese Arbeit nie gegeben.

11 Anhang

Durch Massenspektrometrie identifizierte HSP60-spezifische Bindungspartner.

1	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component OS=Homo sapiens GN=EFTUD2 PE=1 SV=1 [MASS=109435]
2	14-3-3 protein sigma OS=Homo sapiens GN=SFN PE=1 SV=1 [MASS=27774]
3	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=DECR1 PE=1 SV=1 [MASS=36067]
4	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 OS=Homo sapiens GN=PSMD3 PE=1 SV=2 [MASS=60977]
5	40S ribosomal protein S3a OS=Homo sapiens GN=RPS3A PE=1 SV=2 [MASS=29945]
6	40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Homo sapiens GN=RPS4X PE=1 SV=2 [MASS=29598]
7	40S ribosomal protein S7 OS=Homo sapiens GN=RPS7 PE=1 SV=1 [MASS=22127]
8	40S ribosomal protein S9 OS=Homo sapiens GN=RPS9 PE=1 SV=3 [MASS=22591]
9	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Homo sapiens GN=RPLP0 PE=1 SV=1 [MASS=34273]
10	60S ribosomal protein L11 OS=Homo sapiens GN=RPL11 PE=1 SV=2 [MASS=20252]
11	60S ribosomal protein L12 OS=Homo sapiens GN=RPL12 PE=1 SV=1 [MASS=17818]
12	60S ribosomal protein L18 OS=Homo sapiens GN=RPL18 PE=1 SV=2 [MASS=21634]
13	60S ribosomal protein L22 OS=Homo sapiens GN=RPL22 PE=1 SV=2 [MASS=14787]
14	60S ribosomal protein L7 OS=Homo sapiens GN=RPL7 PE=1 SV=1 [MASS=29226]
15	7-dehydrocholesterol reductase OS=Homo sapiens GN=DHCR7 PE=1 SV=1 [MASS=54489]
16	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein OS=Homo sapiens GN=ARPC5L PE=1 SV=1 [MASS=16941]
17	Adenine phosphoribosyltransferase OS=Homo sapiens GN=APRT PE=1 SV=2 [MASS=19608]
18	ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A5 PE=1 SV=6 [MASS=32895]
19	ADP-ribosylation factor 5 OS=Homo sapiens GN=ARF5 PE=1 SV=2 [MASS=20530]
20	ADP-ribosylation factor-like protein 8B OS=Homo sapiens GN=ARL8B PE=1 SV=1 [MASS=21539]
21	Annexin A1 OS=Homo sapiens GN=ANXA1 PE=1 SV=2 [MASS=38714]
22	Annexin A11 OS=Homo sapiens GN=ANXA11 PE=1 SV=1 [MASS=54389]
23	Annexin A2 OS=Homo sapiens GN=ANXA2 PE=1 SV=2 [MASS=38604]
24	Annexin A3 OS=Homo sapiens GN=ANXA3 PE=1 SV=3 [MASS=36375]
25	Annexin A4 OS=Homo sapiens GN=ANXA4 PE=1 SV=4 [MASS=35882]
26	Annexin A5 OS=Homo sapiens GN=ANXA5 PE=1 SV=2 [MASS=35937]
27	Annexin A6 OS=Homo sapiens GN=ANXA6 PE=1 SV=3 [MASS=75873]
28	Annexin A7 OS=Homo sapiens GN=ANXA7 PE=1 SV=3 [MASS=52739]
29	Apolipoprotein D OS=Homo sapiens GN=APOD PE=1 SV=1 [MASS=21275]
30	Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=RARS PE=1 SV=2 [MASS=75379]
31	ATP synthase subunit b, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5F1 PE=1 SV=2 [MASS=28908]
32	ATP synthase subunit d, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5H PE=1 SV=3 [MASS=18491]
33	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5C1 PE=1 SV=1 [MASS=32996]
34	ATP synthase subunit O, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5O PE=1 SV=1 [MASS=23277]
35	ATP-binding cassette sub-family E member 1 OS=Homo sapiens GN=ABCE1 PE=1 SV=1 [MASS=67314]
36	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1 OS=Homo sapiens GN=XRCC6 PE=1 SV=2 [MASS=69843]
37	Bleomycin hydrolase OS=Homo sapiens GN=BLMH PE=1 SV=1 [MASS=52562]
38	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=MTHFD1 PE=1 SV=3 [MASS=101559]
39	Calmodulin-like protein 5 OS=Homo sapiens GN=CALML5 PE=1 SV=2 [MASS=15892]
40	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor OS=Homo sapiens GN=IGF2R PE=1 SV=2 [MASS=274274]
41	Cell division control protein 2 homolog OS=Homo sapiens GN=CDC2 PE=1 SV=1 [MASS=34095]
42	Copine-1 OS=Homo sapiens GN=CPNE1 PE=1 SV=1 [MASS=59058]
43	Cytochrome c oxidase subunit 2 OS=Homo sapiens GN=MT-CO2 PE=1 SV=1 [MASS=25565]
44	Cytoskeleton-associated protein 4 OS=Homo sapiens GN=CKAP4 PE=1 SV=2 [MASS=66022]
45	DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=DNAJA3 PE=1 SV=1 [MASS=52537]

46	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 OS=Homo sapiens GN=RPN1 PE=1 SV=1 [MASS=68569]
47	ELAV-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=ELAVL1 PE=1 SV=2 [MASS=36092]
48	Envoplakin OS=Homo sapiens GN=EVPL PE=1 SV=2 [MASS=231616]
49	Eukaryotic initiation factor 4A-I OS=Homo sapiens GN=EIF4A1 PE=1 SV=1 [MASS=46154]
50	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2-like protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 [MASS=37787]
51	Extended synaptotagmin-1 OS=Homo sapiens GN=ESYT1 PE=1 SV=1 [MASS=122856]
52	Fatty acid synthase OS=Homo sapiens GN=FASN PE=1 SV=2 [MASS=273398]
53	Filaggrin OS=Homo sapiens GN=FLG PE=1 SV=3 [MASS=435166]
54	Filamin-A OS=Homo sapiens GN=FLNA PE=1 SV=4 [MASS=280737]
55	Filamin-B OS=Homo sapiens GN=FLNB PE=1 SV=1 [MASS=278193]
56	Filamin-C OS=Homo sapiens GN=FLNC PE=1 SV=3 [MASS=291020]
57	Galectin-7 OS=Homo sapiens GN=LGALS7 PE=1 SV=2 [MASS=15075]
58	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=G6PD PE=1 SV=4 [MASS=59256]
59	Glutamate carboxypeptidase 2 OS=Homo sapiens GN=FOLH1 PE=1 SV=1 [MASS=84330]
60	Glutathione S-transferase Mu 2 OS=Homo sapiens GN=GSTM2 PE=1 SV=2 [MASS=25744]
61	Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=2 [MASS=23356]
62	GTP-binding nuclear protein Ran OS=Homo sapiens GN=RAN PE=1 SV=3 [MASS=24423]
63	Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-2 subunit OS=Homo sapiens GN=GNAI2 PE=1 SV=3 [MASS=40451]
64	Guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(S)/G(T) subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=GNB1 PE=1 SV=3 [MASS=37377]
65	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 OS=Homo sapiens GN=GNB2L1 PE=1 SV=3 [MASS=35076]
66	Heat shock protein 105 kDa OS=Homo sapiens GN=HSPH1 PE=1 SV=1 [MASS=96864]
67	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TRAP1 PE=1 SV=3 [MASS=80109]
68	Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2 [MASS=22782]
69	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2 [MASS=15998]
70	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPCL1 PE=1 SV=1 [MASS=32142]
71	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens GN=HNRNPC PE=1 SV=4 [MASS=33670]
72	Histone H1.4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1E PE=1 SV=2 [MASS=21865]
73	Histone H2A type 1-B/E OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AB PE=1 SV=2 [MASS=14135]
74	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HADH PE=1 SV=2 [MASS=34277]
75	Importin-5 OS=Homo sapiens GN=IPO5 PE=1 SV=4 [MASS=123629]
76	Insulin-degrading enzyme OS=Homo sapiens GN=IDE PE=1 SV=4 [MASS=117968]
77	Interleukin enhancer-binding factor 2 OS=Homo sapiens GN=ILF2 PE=1 SV=2 [MASS=43062]
78	Involucrin OS=Homo sapiens GN=IVL PE=1 SV=2 [MASS=68478]
79	Keratin, type I cuticular Ha1 OS=Homo sapiens GN=KRT31 PE=1 SV=3 [MASS=47237]
80	Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Homo sapiens GN=KRT13 PE=1 SV=3 [MASS=49586]
81	Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Homo sapiens GN=KRT17 PE=1 SV=2 [MASS=48105]
82	Keratin, type I cytoskeletal 18 OS=Homo sapiens GN=KRT18 PE=1 SV=2 [MASS=48057]
83	Keratin, type I cytoskeletal 19 OS=Homo sapiens GN=KRT19 PE=1 SV=3 [MASS=44092]
84	Keratin, type II cuticular Hb4 OS=Homo sapiens GN=KRT84 PE=1 SV=1 [MASS=64895]
85	Keratin, type II cuticular Hb6 OS=Homo sapiens GN=KRT86 PE=1 SV=1 [MASS=53500]
86	Keratin, type II cytoskeletal 4 OS=Homo sapiens GN=KRT4 PE=1 SV=4 [MASS=57285]
87	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3 [MASS=60045]
88	Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT6B PE=1 SV=5 [MASS=60067]
89	Keratin, type II cytoskeletal 7 OS=Homo sapiens GN=KRT7 PE=1 SV=3 [MASS=51417]
90	Lamin-A/C OS=Homo sapiens GN=LMNA PE=1 SV=1 [MASS=74139]
91	Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha OS=Homo sapiens GN=TMPO PE=1 SV=2 [MASS=75492]
92	Lamin-B2 OS=Homo sapiens GN=LMNB2 PE=1 SV=3 [MASS=67688]

93	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=LRPPRC PE=1 SV=3 [MASS=157904]
94	Leucine-rich repeat-containing protein 59 OS=Homo sapiens GN=LRR59 PE=1 SV=1 [MASS=34930]
95	Leucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=LARS PE=1 SV=2 [MASS=134465]
96	LIM domain only protein 7 OS=Homo sapiens GN=LMO7 PE=1 SV=2 [MASS=192708]
97	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens GN=LDHA PE=1 SV=2 [MASS=36688]
98	Matrin-3 OS=Homo sapiens GN=MATR3 PE=1 SV=2 [MASS=94623]
99	Membrane-associated progesterone receptor component 1 OS=Homo sapiens GN=PGRMC1 PE=1 SV=3 [MASS=21671]
100	Microtubule-associated protein 4 OS=Homo sapiens GN=MAP4 PE=1 SV=2 [MASS=121018]
101	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim23 OS=Homo sapiens GN=TIMM23 PE=1 SV=1 [MASS=21943]
102	Myoferlin OS=Homo sapiens GN=MYOF PE=1 SV=1 [MASS=234707]
103	NADH-cytochrome b5 reductase 3 OS=Homo sapiens GN=CYB5R3 PE=1 SV=3 [MASS=34235]
104	Nestin OS=Homo sapiens GN=NES PE=1 SV=2 [MASS=177438]
105	Neural cell adhesion molecule 2 OS=Homo sapiens GN=NCAM2 PE=1 SV=2 [MASS=93046]
106	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK OS=Homo sapiens GN=AHNAK PE=1 SV=2 [MASS=629097]
107	Nuclease-sensitive element-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=YBX1 PE=1 SV=3 [MASS=35924]
108	Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1 [MASS=22110]
109	Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens GN=PRDX2 PE=1 SV=5 [MASS=21892]
110	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain OS=Homo sapiens GN=FARSB PE=1 SV=2 [MASS=66129]
111	Plakophilin-1 OS=Homo sapiens GN=PKP1 PE=1 SV=2 [MASS=82860]
112	Poly(rC)-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PCBP1 PE=1 SV=2 [MASS=37498]
113	Poly(rC)-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=PCBP2 PE=1 SV=1 [MASS=38580]
114	Protein KIAA1967 OS=Homo sapiens GN=KIAA1967 PE=1 SV=2 [MASS=102901]
115	Protein POF1B OS=Homo sapiens GN=POF1B PE=1 SV=2 [MASS=68695]
116	Putative annexin A2-like protein OS=Homo sapiens GN=ANXA2P2 PE=5 SV=2 [MASS=38659]
117	Putative Ras-related protein Rab-1C OS=Homo sapiens GN=RAB1C PE=5 SV=2 [MASS=22017]
118	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 OS=Homo sapiens GN=IQGAP1 PE=1 SV=1 [MASS=189251]
119	Ras-related protein Rab-10 OS=Homo sapiens GN=RAB10 PE=1 SV=1 [MASS=22541]
120	Ras-related protein Rab-18 OS=Homo sapiens GN=RAB18 PE=1 SV=1 [MASS=22977]
121	Ras-related protein Rab-1A OS=Homo sapiens GN=RAB1A PE=1 SV=3 [MASS=22678]
122	Ras-related protein Rab-2A OS=Homo sapiens GN=RAB2A PE=1 SV=1 [MASS=23545]
123	Ras-related protein Rab-35 OS=Homo sapiens GN=RAB35 PE=1 SV=1 [MASS=23025]
124	Ras-related protein Rab-7a OS=Homo sapiens GN=RAB7A PE=1 SV=1 [MASS=23490]
125	Ras-related protein Rap-2b OS=Homo sapiens GN=RAP2B PE=1 SV=1 [MASS=20504]
126	RNA-binding protein Raly OS=Homo sapiens GN=RALY PE=1 SV=1 [MASS=32463]
127	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 OS=Homo sapiens GN=ATP2A2 PE=1 SV=1 [MASS=114756]
128	Serpin H1 OS=Homo sapiens GN=SERPINH1 PE=1 SV=2 [MASS=46440]
129	Sideroflexin-1 OS=Homo sapiens GN=SFXN1 PE=1 SV=4 [MASS=35619]
130	Small proline-rich protein 3 OS=Homo sapiens GN=SPRR3 PE=1 SV=2 [MASS=18154]
131	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=ATP1A1 PE=1 SV=1 [MASS=112895]
132	Sorting and assembly machinery component 50 homolog OS=Homo sapiens GN=SAMM50 PE=1 SV=3 [MASS=51976]
133	Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens GN=SFPQ PE=1 SV=2 [MASS=76149]
134	T-complex protein 1 subunit alpha OS=Homo sapiens GN=CCT1 PE=1 SV=1 [MASS=60343]
135	T-complex protein 1 subunit eta OS=Homo sapiens GN=CCT7 PE=1 SV=2 [MASS=59366]
136	Thioredoxin-related transmembrane protein 1 OS=Homo sapiens GN=TMX1 PE=1 SV=1 [MASS=31791]
137	Transferrin receptor protein 1 OS=Homo sapiens GN=TFRC PE=1 SV=2 [MASS=84871]

138	Tubulin beta-2C chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2C PE=1 SV=1 [MASS=49831]
139	UPF0468 protein C16orf80 OS=Homo sapiens GN=C16orf80 PE=1 SV=1 [MASS=22774]
140	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C OS=Homo sapiens GN=VAPB PE=1 SV=3 [MASS=27228]
141	Vimentin OS=Homo sapiens GN=VIM PE=1 SV=4 [MASS=53651]
142	Vinculin OS=Homo sapiens GN=VCL PE=1 SV=4 [MASS=123799]
143	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 OS=Homo sapiens GN=VDAC3 PE=1 SV=1 [MASS=30658]