

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie
(Direktor univ. Prof. Dr. med. Martin Burchardt)
sowie dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
(ehem. Direktor Prof. Dr. rer. nat. habil. Reinhard Walther)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema:

**Regulation des Androgen-Rezeptors und der MikroRNA miR-1 durch das
Hitzeschockprotein HSP27 in Prostatakarzinomzellen**

Inaugural - Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin
(Dr. med.) der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald



vorgelegt von Tina Schubert
geboren am 18.10.1985 in Rodewisch

Greifswald 2016

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Uwe Lendeckel

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Martin Burchardt

3. Gutachter: Prof. Dr. med. William Krüger

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum Thoraxchirurgie D2.35

Tag der Disputation: 01.11.2017

“If I have seen further, it is by standing on the shoulders of giants.”

Isaac Newton

-Brief an Robert Hooke, 5. Februar 1675/76; zitiert nach Richard Westfall-

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5-17
1.1. Prostatakarzinom (PCa)	5-7
1.2. Androgene	8-9
1.3. Androgen-Rezeptor (AR)	9-11
1.4. Antiandrogene Therapie (ADT)	11-13
1.5. Kastrationsresistentes Prostatakarzinom (CRPC)	13
1.6. Hitzeschockprotein 27 (HSP27)	14-15
1.7. MikroRNA miR-1 (miR-1)	15-17
2. Zielstellung der Arbeit	18
3. Material und Methoden	19-45
3.1. Material	19-26
3.1.1. Chemikalien und Reagenzien	19-21
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	21
3.1.3. Geräte	22-23
3.1.4. Zelllinien	23-24
3.1.5. Antikörper	24
3.1.6. Primer und Vektoren	24-25
3.1.7. Zellkulturmedien	25
3.1.8. Kits	26
3.1.9. Computerprogramme	26
3.2. Methoden	27-45
3.2.1. Zellkultur	27
3.2.2. Auftauen der Zellen	27
3.2.3. Passagieren der Zellen	27-28
3.2.4. Einfrieren der Zellen	28
3.2.5. Transfektion der Zellen	28
3.2.5.1. Knock-Down von HSP27 in LNCaP-Zellen	28-29
3.2.5.2. Überexpression von HSP27 in PC3-Zellen	29-30
3.2.6. Protein- und RNA-Isolierung	31-32
3.2.6.1. RNA-Präparation mit TRIZOL	32
3.2.6.2. Protein-Präparation mit TRIZOL	32-33
3.2.6.3. MikroRNA-Präparation	33-34
3.2.6.4. Zelllyse mittels RIPA-Lysepuffer	34-35
3.2.7. Proteinanalyse	35
3.2.7.1. BRADFORD-Assay	35

3.2.7.2.	SDS-Page	36-37
3.2.7.3.	Western-Blot	37-39
3.2.8.	Nukleinsäureanalytik	39
3.2.8.1.	Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung	39
3.2.8.2.	Reverse Transkription von RNA	39-40
3.2.8.3.	Reverse Transkription von MikroRNA	40
3.2.8.4.	Quantitative Real-time PCR nach reverser Transkription der RNA	41-42
3.2.8.5.	Quantitative Real-time PCR nach reverser Transkription der MikroRNA	42-43
3.2.8.6.	Agarose-Gelelektrophorese der cDNA	43-44
3.2.9.	Statistische Auswertung	44-45
4.	Ergebnisse	46-53
4.1.	Basalexpression von AR und HSP27 in Prostatakarzinomzellen	46
4.1.1.	AR-Expression in Prostatakarzinomzellen	46
4.1.2.	HSP27-Expression in Prostatakarzinomzellen	47-48
4.2.	Charakterisierung des Einflusses des HSP27 auf den AR in Prostatakarzinomzellen	48
4.2.1.	Auswirkungen des Knock-Downs von HSP27 auf den AR	48-50
4.2.2.	Auswirkungen der Überexpression von HSP27 auf den AR	50-51
4.3.	Expression der MikroRNA miR-1 in Prostatakarzinomzellen	52
4.4.	Interaktion der MikroRNA1 miR-1 und des HSP27	52-53
5.	Diskussion	54-63
6.	Zusammenfassung	64-65
7.	Veröffentlichungen im Rahmen der Dissertation	66
8.	Abkürzungsverzeichnis	67-70
9.	Eidesstattliche Erklärung	71
10.	Lebenslauf	72
11.	Danksagung	73-75
12.	Literaturverzeichnis	76-97

1. Einleitung

1.1. Prostatakarzinom

Prostatakrebs (PCa) ist die am häufigsten diagnostizierte und am zweithäufigsten zum Tode führende nicht kutane maligne Erkrankung des Mannes^{1,2}. Aus histologischer Sicht handelt es sich in über 90% der Fälle um Adenokarzinome ausgehend von entarteten azinären Prostataepithelzellen der peripheren Zone³. Davon abzugrenzen sind die deutlich selteneren Varianten des sarkomatoiden oder neuroendokrinen PCa, welche mit einer deutlich schlechteren Prognose vergesellschaftet sind³. Auf Grund seiner hohen Inzidenz und Mortalität stellt das PCa eine große Belastung für das Gesundheitssystem dar. Während in Deutschland im Jahr 2012 63.710 Neuerkrankungen diagnostiziert wurden, werden laut einer Hochrechnung für 2016 allein in den USA ca. 181.000 neue Erkrankungsfälle erwartet^{4,5}. Nach Angaben des Robert Bosch Instituts lagen die direkten Krankheitskosten für Deutschland im Jahr 2002 bei ca. 1.174 Millionen Euro⁶. In einer aktuellen australischen Kostenanalyse wurden die initialen Behandlungskosten für Patienten mit einem lokal begrenzten Tumorstadium mit 16.923\$ und 39.101\$ für Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren beziffert⁷. War anschließend eine Behandlung im metastasierten Setting notwendig, stiegen die Kosten um weitere 55.370\$⁷. Die Auswahl des Therapieverfahrens ist vom klinischen Tumorstadium, dem histologischen Subtyp, der körperlichen Gesamtverfassung und insbesondere dem Therapiewunsch des Patienten abhängig. Daher wird im klinischen Alltag oft von einer „*stadien-adaptierten Therapie*“ des PCa gesprochen.

Unerlässlich zur Diagnosesicherung und Bestimmung des histologischen Subtyps ist eine Gewebegewinnung zur pathologischen Begutachtung. Dies geschieht klassischerweise mittels Prostatastanziopsie. Gelegentlich wird ein PCa jedoch auch zufällig im Rahmen anderer Operationen wie der transurethralen Resektion der Prostata (TURP), zur Behandlung einer gutartigen Prostatavergrößerung (BPH), oder der radikalen Zystoprostatovesikulektomie, zur Therapie eines Blasenkarzinoms (BCa), entdeckt. In diesen Fällen spricht man von einem inzidentellen PCa.

Adenokarzinome können anhand ihres Wachstumsmusters in 5 Gleason-Grade eingeteilt werden (1= gut differenziert, 5= schlecht differenziert)⁸. Der

vorherrschende und der am schlechtesten differenzierte Wachstumstyp werden dann zum sogenannten *Gleason-Score* zusammen gezählt. Hieraus ergibt sich formal ein minimaler Score von 2 und ein maximaler Score von 10⁸. Der Gleason-Score korreliert im Allgemeinen gut mit der Prognose des PCa⁹. Daher kann eine Risikogruppenzuordnung der PCa-Patienten nach *D'Amico* in Abhängigkeit des Gleason-Scores und des PSA-Wertes (Prostata-spezifisches-Antigen) erfolgen¹⁰. Hiernach können Patienten in eine Niedrig-Risiko (*low-risk*: PSA<10 ng/ml, Gleason ≤6), eine Intermediäre (*intermediate-risk*: PSA=10-20 ng/ml, Gleason=7) und eine Hoch-Risiko-Gruppe (*high-risk*: PSA>20 ng/ml, Gleason ≥8) zugeordnet werden¹⁰. Aktuell wird diese Klassifikation jedoch durch die *International Society of Urological Pathology* (ISUP) ergänzt bzw. überarbeitet¹¹. Sarkomatoide und neuroendokrine PCas zeigen ein anderes Wachstumsmuster und können durch immunhistochemische Färbungen von Adenokarzinomen unterschieden werden¹².

Im Falle des Vorliegens eines Adenokarzinoms stehen dann stadienadaptiert verschiedene Therapieoptionen zur Verfügung. Zu den kurativen Therapieansätzen zählen sowohl die chirurgische Sanierung mittels radikaler Prostatovesikulektomie, als auch verschiedene Formen der Radiotherapie¹⁰. Ein kurativer Ansatz ist jedoch nur im nicht metastasierten Setting möglich. Im Rahmen der Niedrig-Risiko-Gruppe kann unter bestimmten Voraussetzungen eine aktive Krankheitsüberwachung (*active-surveillance*) erfolgen. Im Allgemeinen werden hierfür Patienten mit Tumoren im Stadium cT1 oder cT2a, einem PSA ≤10ng/ml, einem Gleason-Score ≤6 und mit einem Tumornachweis in ≤2 Prostatastanzen mit weniger als ≤50% Tumoranteil pro Stanze für geeignet erachtet. Eine Therapieänderung erfolgt erst bei Befundprogress oder Wunsch des Patienten¹⁰. Hiervon zu unterscheiden ist das sogenannte *watchful-waiting*. Hierunter versteht man ein zunächst beobachtendes Vorgehen bei Patienten ohne kurative Zielsetzung, welche meist aufgrund von Komorbiditäten eine eingeschränkte Lebenserwartung von <10-15 Jahren besitzen. Eine Therapie wird erst beim Auftreten von Symptomen beispielsweise in Form einer antiandrogenen Therapie (ADT) oder palliativen Strahlentherapie vorgenommen¹⁰.

Trotz der Fortschritte im Bereich der PCa-Früherkennung präsentieren sich ca. 20% der Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen, operativ nicht kurablen oder metastasierten Tumorstadium¹³. Die Behandlung dieser Patienten bedarf in der Regel eines multimodalen Therapiekonzeptes und ist sehr anspruchsvoll. Sie beinhaltet u.a. eine symptomatische Basistherapie bestehend aus Analgesie sowie Behandlung von Knochenmetastasen mittels Bisphosphonaten, Denosumab, Calcium- und Vitamin D3-Substitution oder lokaler Radiotherapie¹⁰. Zusätzlich können je nach Metastasenlast auch operative Interventionen erfolgen¹⁰. Obwohl es gegenwärtig noch keine fundierte Datenlage bezüglich der radikalen Prostatovesikulektomie im metastasierten Setting gibt, wird diese in einzelnen Zentren im Sinne einer Zytoreduktion insbesondere im lymphonodal positiven Stadium durchgeführt¹⁴. Daher ist zukünftig auch ein Trend hin zur Metastasen Chirurgie denkbar. Den Therapiestandard für diese Patientengruppe bildet jedoch nach wie vor die antihormonelle (antiandrogene) Therapie (siehe unten) bzw. im weiteren Krankheitsverlauf eine Taxan-basierte Chemotherapie (z.B. mit Docetaxel oder Cabazitaxel)¹⁰.

Neuroendokrine Prostatakarzinome verhalten sich äußerst maligne und bedürfen daher eines anderen Therapiekonzeptes als Adenokarzinome^{10,12}. Dieses sollte, falls möglich, im Rahmen einer interdisziplinären Tumorkonferenz festgelegt werden. Typisches Charakteristikum dieser Tumore auf molekularer Ebene ist das Fehlen des Androgen-Rezeptors (AR)^{15,16}. Dies macht eine ADT wirkungslos und erfordert in der Regel eine Kombinationstherapie aus radikaler Prostatovesikulektomie und Chemotherapie nach dem PEB-Schema (Cisplatin, Bleomycin, Etoposid)¹⁰.

Neben genetischer Prädisposition und molekularen Veränderungen spielen vor allem die männlichen Sexualhormone eine entscheidende Rolle in der Tumorprogression der Adenokarzinome¹⁷. Da bereits in sehr frühen Studien der wachstumsfördernde Einfluss von Androgenen auf diese PCa-Zellen nachgewiesen werden konnte, ist die Modulation der Androgen-Achse mit dem Ziel der Hemmung des Tumorwachstums Ansatzpunkt moderner Therapiestrategien für Patienten mit metastasiertem Adeno-PCa^{6,10,17}.

1.2. Androgene

Androgene sind Steroidhormone, die u.a. für die Entwicklung des männlichen Phänotyps während der Embryonalentwicklung, das Erreichen der sexuellen Reifung in der Pubertät sowie der Aufrechterhaltung der männlichen Fortpflanzungsfunktion im Alter verantwortlich sind. Darüber hinaus beeinflussen sie auch eine Vielzahl von nicht-reproduktiven Geweben und spielen eine kritische Rolle in der Tumorgenese des PCa¹⁸. Etwa 90% der Androgene werden in den Leydig-Zellen des Hodens und 10% in der Nebennierenrinde produziert¹⁹. Zur Klasse der Androgene gehören neben dem Testosteron und seiner biologisch aktiveren Form, dem Dihydrotestosteron (DHT), auch Androsteron, Androstendiol, Corticosteron und Dehydroepiandrosteron (DHEA).

Testosteron ist jedoch hinsichtlich seiner biologischen Funktion das wichtigste zirkulierende Androgen für den Urogenitaltrakt, im Speziellen für die Prostata. In einer Metaanalyse war eine Serum-Testosteronkonzentration im oberen Grenzbereich mit einem 2,3fach höheren PCa-Erkrankungsrisiko assoziiert¹⁹. Dennoch gilt es diesbezüglich nicht als präkanzerogen, sondern eher als Promotor wachsender Tumore¹⁷. Die Bildung von Testosteron unterliegt einem komplexen Regelkreis zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Hoden. Im Hypothalamus wird das Gonadotropin-freisetzende Hormon (Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH) gebildet. Dieses regt in der Hypophyse die Freisetzung der Gonadotropine LH (Luteinisierendes Hormon) und FSH (Follikelstimulierendes Hormon) an. FSH unterstützt die Spermatogenese. LH hingegen wirkt stimulierend auf die Testosteronbildung in den Leydigzellen des Hodens. Testosteron wird aus den Hoden in die Blutbahn freigesetzt und gelangt so an die unterschiedlichen Zielorgane. Nur ein kleiner Teil des zirkulierenden Testosterons (ca. 3%) liegt in seiner aktiven (freien) Form vor¹⁸. Der Rest gelangt gebunden an das Sexualhormon-bindende Globulin (SBG) oder Albumin ins Blut. Um eine überschießende Hormonproduktion zu vermeiden, bewirkt ein steigender Testosteronspiegel die Auslösung eines negativen Rückkopplungsmechanismus, welcher die weitere Freisetzung von GnRH, LH und FSH hemmt und somit die Testosteronproduktion reguliert. Um in Prostatazellen aktiv wirken zu können, muss Testosteron durch die 5 α -Reduktase enzymatisch in DHT umgewandelt werden. Dieses besitzt eine fünffach höhere Affinität für den Androgen-Rezeptor

(AR)¹⁸. Nach Aktivierung steuert der AR u.a. Wachstums- und Differenzierungsvorgänge der Prostatazellen. Die medikamentöse Blockade der Androgen-Achse wird daher zur Hemmung des Zellwachstums genutzt.

1.3. Androgen-Rezeptor

Als Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor gehört der AR zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren. Dies sind Proteine, die erst durch die Bindung eines Liganden (meist Hormone) in der Lage sind, an die DNA zu binden und die Transkription eines oder mehrerer Gene zu beeinflussen. Seine Funktion wird durch ein komplexes Netzwerk bestehend aus Co-regulatorischen Proteinen und Signalkaskaden gesteuert²⁵. Im Prostatagewebe bewirkt er u.a. die Sekretion des PSA, stimuliert die Epithelzellenerneuerung und reguliert die Zelldifferenzierung²⁰.

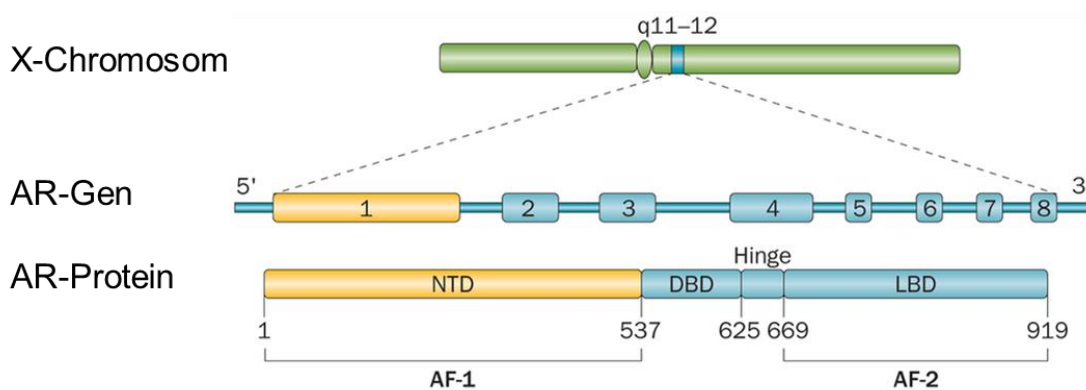


Abbildung 1: Molekularer Aufbau des Androgen-Rezeptorgens und des Androgen-Rezeptorproteins (modifiziert nach Lorente D. et al., Nature Reviews Urology 2015)

AR = Androgen-Rezeptor, NTD = Amino-terminale Domäne, DBD = DNA-Bindungsdomäne,

LBD = Liganden-Bindungs-Domäne, AF-1 + AF-2 = Liganden-unabhängige Transkriptionsaktivierungseinheiten

Das AR-Gen ist auf dem langen Arm des X-Chromosoms lokalisiert. Dieses codiert das 919 Aminosäuren lange und 110 kDa große AR-Protein²¹. Wie andere Mitglieder der Kernrezeptorfamilie weist der AR einen spezifischen Aufbau aus vier funktionellen Domänen auf (Abbildung 1)²¹. Diese werden durch 8 Exons verschlüsselt. Er gliedert sich in eine amino-terminale Domäne (NTD), eine DNA-

Bindungsdomäne (DBD), eine flexible *hinge*-Domäne und eine Liganden-Bindungs-Domäne (LBD)²¹.

Die NTD beinhaltet die Liganden-unabhängige Transkriptionsaktivierungseinheit (AF-1)²¹. Innerhalb dieser AF-1 befinden sich neben den beiden Transkriptionsaktivierungsuntereinheiten TAU-1 und TAU-5 eine variable Anzahl von homopolymeren CAG- bzw. GGN-Repeats, codierend für Polyglutamin bzw. Polyglycin²¹. In gesunden Individuen finden sich in der Regel zwischen 8 bis 31 solcher Polyglutaminrepeats²². Ein vermehrter Einbau von über 40 Repeats kann zur Ausbildung einer Muskelatrophie (SBMA bzw. Kennedy's Erkrankung) führen²³. Eine verkürzte Repeatlänge hingegen kann durch eine gesteigerte transkriptionelle Aktivität des AR die Entstehung eines PCa begünstigen²⁴.

Die zentral gelegene DBD besteht u.a. aus Cysteinresten, welche zur Ausbildung zweier Zinkfinger motive beitragen. Diese verleihen dem AR seine Funktion als Transkriptionsfaktor²¹. Während das erste Zinkfinger motiv entscheidend für die spezifische DNA-Erkennung ist, ist das zweite an der AR-Dimerisierung beteiligt. Die Rezeptordimerisierung ist ein entscheidender Schritt, da der AR nur als Homodimer an sogenannte „*AR response elements*“ (ARE) der DNA binden kann²⁰. Zusätzlich befindet sich ein Teil der Kernlokalisationssequenz (NLS) innerhalb der DBD. Der andere Teil der NLS befindet sich in der *hinge*-Domäne. Diese ist u.a. beteiligt an der Translokation, Dimerisierung und DNA-Bindung des AR. Die LBD besteht aus 12 α -Helices und beinhaltet die Liganden-abhängige Transkriptionsaktivierungseinheit (AF-2). Die Bindung des Liganden bewirkt eine Konformationsänderung innerhalb der LBD und ermöglicht so intra- und intermolekulare Interaktionen des AR²⁰. Zusätzlich ist die LBD an der Interaktion des AR mit ihm stabilisierenden Hitzeschockproteinen (HSP) beteiligt²⁵. Im inaktiven Zustand liegt der AR eingebunden in einen Komplex aus Hitzeschockproteinen (u.a. HSP90 + HSP70 + HSP40) und anderen Co-Chaperonen im Zytosol vor (Abbildung 2)^{25,26}. Die Bindung eines Androgens an die LBD bewirkt eine Konformationsänderung und Phosphorylierung des AR, sowie eine Stabilisierung des Liganden-Rezeptor-Komplexes²⁷. Der Liganden-aktivierte AR induziert über die p38-Kinase die Phosphorylierung des HSP27, wodurch dieses das HSP90 aus dem AR-Komplex verdrängt²⁷.

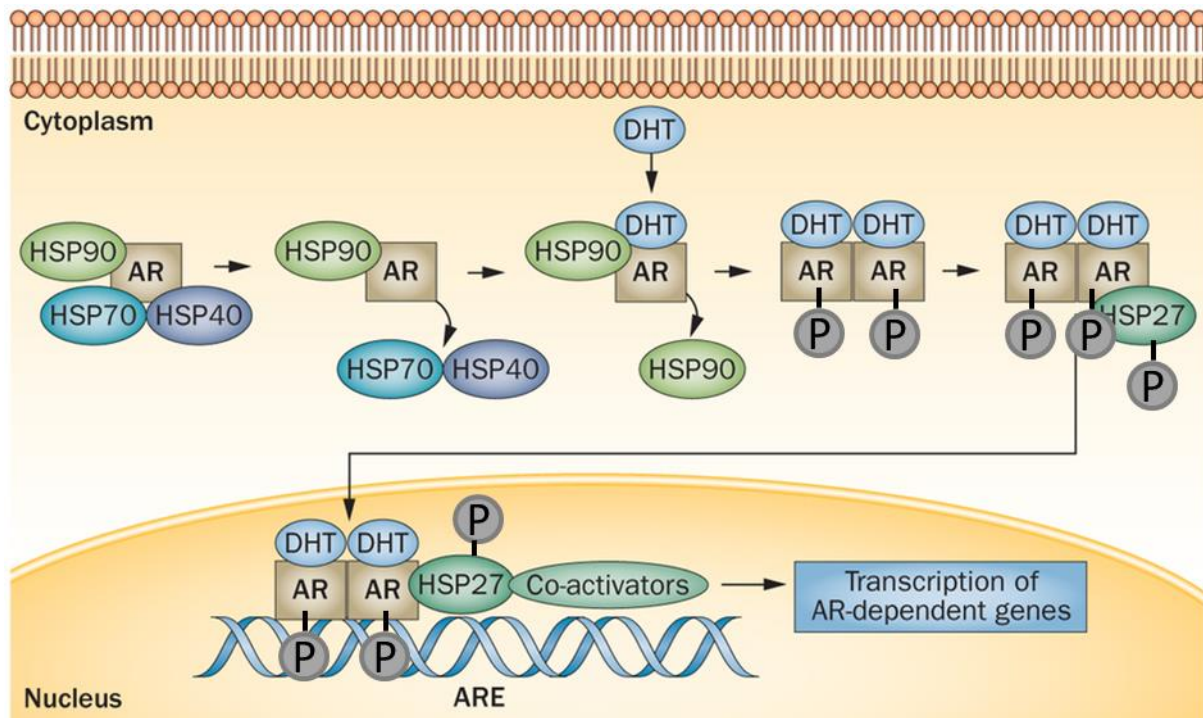


Abbildung 2: Aktivierung des Androgen-Rezeptors (modifiziert nach Azad et al., Nature Reviews Urology 2015)

AR = Androgen-Rezeptor, DHT = Dihydrotestosteron, P = Phosphorylierung, HSP = Hitzeschockprotein, ARE = AR response elements

Nach anschließender Dimerisierung transloziert der AR in den Nucleus und bindet mit Hilfe der Zinkfinger-elemente an die AREs der DNA und entfaltet so seine transkriptionelle Aktivität. Auf Grund des engen funktionellen Zusammenhangs zwischen dem AR und dem HSP27 scheint letzteres ein wichtiges Protein in der Regulation der Androgen-Achse zu sein.

1.4. Antiandrogene Therapie

Die antiandrogene Therapie (ADT) stellt den aktuellen Therapie-Goldstandard für Patienten mit biochemischem Rezidiv nach kurativ intendierter Primärtherapie oder lokal fortgeschrittenem bzw. metastasiertem PCa dar¹⁰. Sie beruht auf dem Umkehrschluss der 1941 von Huggins und Hodges gemachten Entdeckung eines gesteigerten Wachstums von PCa-Zellen nach Androgenstimulierung²⁸. Unterstützt wurde diese Theorie durch die Beobachtung, dass Eunuchen (Kastration vor der Pubertät) nicht am Prostatakarzinom erkrankten²⁹. Ziel der

ADT ist die Absenkung des Testosterons auf das sogenannte Kastrationsniveau (unter 50ng/dL)¹⁰. Neuere Studien zeigten jedoch einen größeren Therapiebenefit bei Testosteronwerten unter 20ng/dL³⁰⁻³². Ein Androgenentzug kann entweder mittels chirurgischer Kastration (bilaterale Orchiektomie) oder medikamentös erzielt werden. Das pharmakologische Spektrum beinhaltet Östrogene, LH-RH-Agonisten, LH-RH-Antagonisten und Antiandrogene (steroidale und nicht-steroidale). Östrogene werden auf Grund ihrer vielzähligen kardiovaskulären Nebenwirkungen jedoch nicht mehr zur Erstlinienbehandlung empfohlen¹³. Der Wirkmechanismus der LH-RH-Agonisten bzw. LH-RH-Antagonisten beruht auf einer negativen Rückkopplung bzw. kompetitiven Hemmung der LH-Ausschüttung aus der Hypophyse, wodurch die testikuläre Testosteronproduktion sinkt³³. Die Wirkung der Antiandrogene entfaltet sich durch eine kompetitive Hemmung des AR³⁴. Je nach gewähltem Pharmakon können erhebliche unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen, wie beispielweise Libidoverlust, Gynäkomastie oder Durchfall auftreten¹⁰. Allen Substanzklassen gemein ist das Auftreten von Hitzewallungen¹⁰.

Obwohl in mehreren Studien ein initialer Therapiebenefit der ADT gezeigt werden konnte, erleidet die Mehrheit der Patienten nach ca. 2-3 Jahren einen Progress hin zu einem kastrationsresistenten Tumorstadium (CRPC)³⁵. CRPC-Zellen zeichnen sich u.a. durch eine intrazelluläre Testosteronsynthese aus³⁶. Diese bleibt von der herkömmlichen ADT unbeeinflusst³⁷. Daher sind diese Zellen trotz laufender ADT in der Lage, eine ausreichend hohe Testosteronbereitstellung zu gewährleisten³⁶. Therapeutischer Ansatzpunkt für dieses Patientenkollektiv sind neuere Antiandrogene wie Abirateronacetat oder Enzalutamid¹⁰. Abirateronacetat bewirkt über die Hemmung des Cytochrom-P-17 eine Hemmung der Testosteronsynthese³⁸. In einer Studie konnte eine Verlängerung des Überlebens (14,8 vs. 10,9 Monate; Abirateronacetat 1000mg/d + Prednisolon 10mg/d vs. Placebo) *nach* Versagen einer Docetaxel-Chemotherapie gezeigt werden³⁹. Aber auch die Applikation *vor* einer Docetaxel-Chemotherapie war mit einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens assoziiert (16,5 vs. 8,3 Monate)⁴⁰. Enzalutamid zählt wie Bicalutamid zu den AR-Antagonisten⁴¹. Es zeichnet sich jedoch durch eine stärkere Bindung an den AR aus und kann die Translokation des aktivierten AR in den Zellkern verhindern⁴¹. Auch für Enzalutamid (4x40mg/d) konnte eine Verlängerung des Gesamtüberlebens (18,4

vs, 13,6 Monate) nach Docetaxel-Chemotherapie gezeigt werden⁴². Weitere Kombinationstherapien sind Gegenstand aktueller Studien.

1.5. Kastrationsresistentes Prostatakarzinom

Unter einem kastrationsresistenten PCa (CRPC) versteht man das Fortschreiten der Erkrankung nach anfänglichem Therapieansprechen trotz medikamentöser oder chirurgischer Kastration. Dieser Progress kann entweder klinisch durch die Neuentstehung von Metastasen bzw. das Fortschreiten der bestehenden Erkrankung oder aber biochemisch durch einen kontinuierlichen PSA-Anstieg über Nadir in 3 aufeinanderfolgenden Messungen bei fortbestehendem Serumtestosteron unterhalb der Kastrationsgrenze (<50 ng/dL) in Erscheinung treten⁴³. Der Entstehungsmechanismus dieser Kastrationsresistenz ist bis heute ungeklärt. Die in vitro Entwicklung eines androgen-unabhängigen Phänotyps beruht in der Regel auf einem vollständigen Verlust des AR. Interessanterweise gibt es Hinweise aus verschiedenen klinischen Studien, dass der AR in in vivo CRPC-Zellen nur selten verloren geht^{44,45}. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass die Resistenz gegen die herkömmliche ADT eventuell Folge einer de- bzw. co-regulierten Androgen-Achse ist. Entgegen früherer Vermutungen besteht auch in diesem Tumorstadium eine Hormonsensitivität. Daher ist der traditionell verwendete Begriff des „hormonrefraktären PCa“ nicht mehr zulässig. Vielmehr scheinen u.a. molekulare Veränderungen wie beispielsweise AR-Genamplifikationen, die Überexpression anti-apoptotischer Proteine, die Steigerung der AR-Aktivität durch co-regulatorische Signalkaskaden oder aber eine veränderte Androgensynthese die Kastrationsresistenzentstehung bei erhaltener Androgen-Sensitivität zu begünstigen⁴⁶⁻⁴⁹. Die weitere Charakterisierung dieser Signalkaskade mit dem AR als Schlüsselprotein erscheint daher ein vielversprechender Ansatz zum besseren Verständnis dieser Mechanismen.

1.6. Hitzeschockprotein HSP27

Hitzeschockproteine (HSP) sind hochkonservierte Proteine, die zur Erhaltung der Zellhomöostase unter Stressbedingungen wie Hypoxie, Hypoglykämie, aber auch emotionaler, mechanischer oder medikamenteninduzierter Belastung beitragen und so das Zellüberleben ermöglichen⁵⁰⁻⁵². Ihre Regulation erfolgt entweder konstitutiv oder induktiv⁵³. Benannt werden die HSPs nach ihrer Molekülgröße. Im humanen Organismus spielen vor allem das HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 und das kleine HSP27 eine wichtige Rolle. Während HSPs mit hohem Molekulargewicht in der Regel als ATP-abhängige Chaperone agieren, sind die kleineren HSPs meist ATP-unabhängig⁵³. In ihrer molekularen Chaperonfunktion regulieren sie u.a. die Proteinfaltung, den Proteintransport, die Proteinstabilität und die Rückfaltung fehlgefalteter Proteine⁵⁴. Durch die „Überwachung“ wichtiger Onkogene beeinflussen sie somit sowohl pro- als auch anti-apoptotische Signaltransduktionswege⁵⁵. Auf Grund der höheren Stoffwechselanforderungen in malignen Zellen weisen viele Tumoren eine deutliche Überexpression verschiedener HSPs im Vergleich zum gesunden Gewebe auf⁵⁶. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine HSP-Überexpression mit einem gesteigerten Tumorwachstum, erhöhtem Metastasierungspotential und der Entwicklung von Resistenzmechanismen gegenüber medikamentösen Therapien assoziiert ist^{53,56}. Auch in PCa-Zellen wurde eine deutliche Überexpression des HSP27 im Vergleich zu normalem Prostatagewebe detektiert⁵⁷.

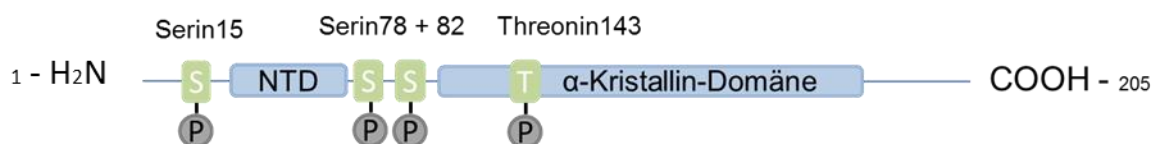


Abbildung 3: Molekularer Aufbau des Hitzeschockproteins 27 (modifiziert nach Katsogiannou M. et al., *Frontiers in Genetic* 2014)

S = Serin, T = Threonin, NTD = Amino-terminale Domäne, P = Phosphorylierung

HSP27 besteht aus 205 Aminosäuren und besitzt eine charakteristische α -Kristallin-Domäne (Abbildung 3)⁵⁸. Seine Funktion ist u.a. abhängig vom Phosphorylierungszustand. Über eine große Anzahl von Kinasen, einschließlich der MAPKAP Kinase 2 und 3, p90Rsk, PKC, PKD und PKG, kann eine reversible Phosphorylierung an 3 Serinresten (15, 78 und 82) sowie am Threonin 143 erfolgen⁵⁸. Dies beeinflusst dann die Oligomerisierung des Proteins und moduliert damit die Chaperonfunktion. Zentrales Regulationsprotein der HSPs in Prostatazellen ist der AR. Daher liegt die Vermutung nahe, dass HSPs eventuell auch an der Entwicklung der Kastrationsresistenz im PCa beteiligt sind. Während im inaktiven Zustand vor allem das HSP90 zur AR-Stabilisierung beiträgt, wird u.a. die Translokation in den Nukleus und die Bindung an AREs durch das HSP27 gesteuert⁵⁰. Damit nimmt es entscheidenden Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des AR. Die genauen Interaktionswege zwischen dem AR und dem HSP27 sind jedoch noch ungeklärt. Auch der Einfluss weiterer Co-Regulatoren, die wiederum die Integrität des HSP27 oder des AR beeinflussen, ist weitgehend unerforscht.

1.7. MikroRNA miR-1

Einen möglichen Regulator der AR bzw. HSP27-Integrität stellt die Gruppe der MikroRNAs dar. Dies sind kleine, nicht-codierende RNA-Moleküle, welche meist aus 18-25 Nukleotiden aufgebaut sind. Erstmals beschrieben wurden diese kleinen RNA-Moleküle 1993 in einer Versuchsreihe am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*⁵⁹. Sie konnten aber auch in über 60 humanen Geweben nachgewiesen werden⁶⁰. Bis zum heutigen Tag wurden bereits über 2500 MikroRNAs identifiziert. Man geht davon aus, dass ca. 60% aller Protein-codierenden Gene durch MikroRNAs beeinflussbar sind⁶¹. Da MikroRNAs keine Kodierungsfunktion besitzen, beruht ihre Regulationsfunktion am ehesten auf der Beeinflussung der Stabilität und Translation anderer RNA-Moleküle mittels sogenannter „Gen-Silencing-Prozesse“⁶². Hierunter versteht man den gezielten Abbau einzelner mRNA-Moleküle oder deren Translationshemmung. Die MikroRNA-Biosynthese unterscheidet sich von der anderer RNA-Moleküle (Abbildung 4)⁶³.

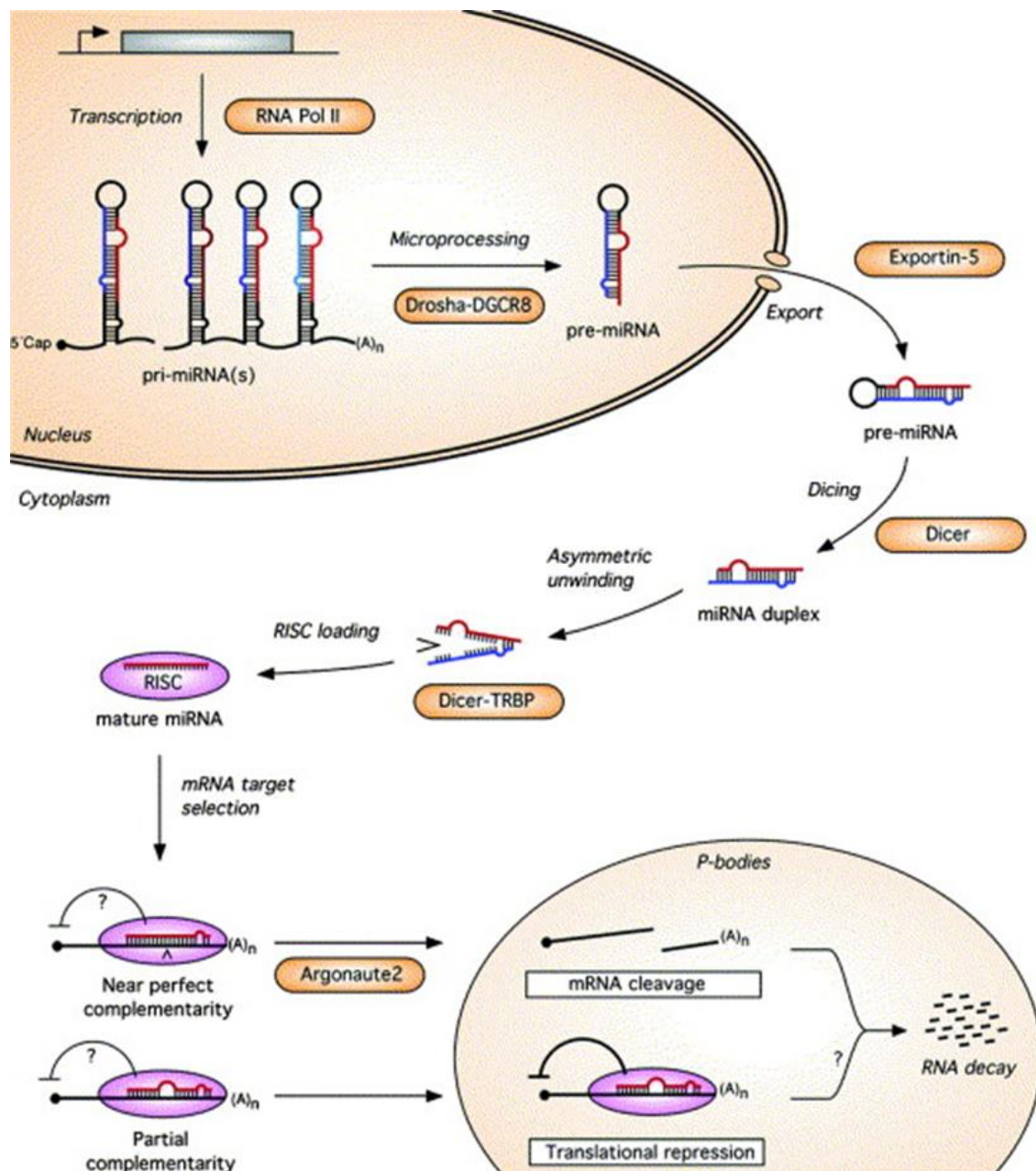


Abbildung 4: MikroRNA-Biosynthese und Wirkmechanismus

(entnommen aus Wienholds E. et al., FEBS Press 2005)

Die Transkription der MikroRNA-Gene erfolgt durch die RNA-Polymerase II. Dies führt zur Bildung der pri-MikroRNA, welche anschließend von der RNase *Drosha* zu pre-MikroRNA weiterprozessiert wird⁶⁴. Die pre-MikroRNA besteht in der Regel aus ca. 70 Nukleotiden. Ein Teil dieser Nukleotidsequenz kann von der GTPase *Exportin 5* erkannt werden, welche dann den Export ins Zytosol bewirkt⁶⁵. Hier erfolgt die weitere Prozessierung durch die zweite RNase *Dicer* zur

reifen doppelsträngigen MikroRNA⁶⁵. Durch das Zusammenwirken von *Dicer* mit dem RNA-Bindeprotein *TRBP* wird der Doppelstrang entwunden und getrennt. Nach der Spaltung wird ein Einzelstrang in den sogenannten *RISC*-Komplex eingebaut. *RISC* steht für „RNA-induced-silencing-complex“ und spiegelt die Funktion der MikroRNAs wider⁶⁵. Dieser besteht dann aus bis zu 25 Nukleotiden und beinhaltet am 5`-Ende eine *Seed-Sequenz*, welche komplementär zu verschiedenen 3'-UTR-mRNA-Sequenzen ist und dadurch eine Bindungsspezifität zwischen MikroRNA und Ziel-mRNA herstellt. Vermittelt durch RNA-Bindeproteine der *Argonaut*-Familie, lagert sich die MikroRNA an den komplementären Ziel-mRNA-Strang an⁶⁵. In Abhängigkeit der Übereinstimmung der Bindungsstellen entfaltet sich die Wirkung der MikroRNA. Sollte eine sehr hohe oder vollständige Bindungskompatibilität vorliegen, wird der Ziel-mRNA-Strang zerschnitten und abgebaut. Dementsprechend kann aus diesem mRNA-Strang keine Proteinsynthese mehr erfolgen. Sollte eine geringe Bindungskompatibilität vorliegen, kommt es zu einer Hemmung der Translation der durch den Ziel-mRNA-Strang kodierten Proteine (Abbildung 4)⁶³. Die Auswirkungen dieses Gen-Silencings sind sehr variabel. Je nach Gewebeart fungieren einige MikroRNAs als Tumorsuppressor, andere hingegen eher als Onkogene⁶⁶⁻⁶⁸. Der Einfluss auf den Urogenitaltrakt ist bisher weitgehend ungeklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sich das Expressionsmuster verschiedener MikroRNAs im PCa-Gewebe deutlich von dem in benignem Gewebe unterscheidet⁶⁶⁻⁶⁹. Dies trifft auch für die MikroRNA miR-1 zu⁶⁹. Auf Grund ihrer hohen Expressionsraten im Herz- und Skelettmuskel nahm man ursprünglich an, dass es sich hierbei um eine muskelspezifische MikroRNA handelt⁷⁰. In der Tat konnte sie jedoch in einer Vielzahl maligner Tumoren nachgewiesen werden⁶⁶⁻⁶⁹. Sowohl im Lungenzell- als auch Leberzellkarzinom konnte eine verringerte Expressionsrate detektiert werden^{71,72}. Da nach Re-expression ein vermehrtes Tumorzellsterben nachgewiesen werden konnte, gilt sie in diesen Geweben als potentieller Tumorsuppressor^{71,72}. Kürzliche Untersuchungen weisen darauf hin, dass auch im PCa-Gewebe eine geringere MikroRNA miR-1 Expression vorliegt⁶⁹. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sie in die Regulation verschiedener HSP eingebunden ist und so eine proapoptotische Wirkung entfalten kann⁷³. Dies erlaubt die Vermutung, dass sie durch eine HSP-vermittelte Interaktion eventuell auch in die Regulation der Androgen-Achse eingebunden ist.

2. Zielstellung der Arbeit

Diese Arbeit soll durch die Charakterisierung der Androgen-Rezeptor-Achse zu einem besseren Verständnis der Kastrationsresistenz in PCa-Zellen beitragen und so zur Entwicklung bzw. Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten beitragen.

Hierzu wurde der regulatorische Einfluss von HSP27 auf die Expression und die Funktion des AR in PCa-Zelllinien untersucht.

Für die experimentellen Ansätze zur molekularen Charakterisierung der Kastrationsresistenz wurde ein in vitro Zellmodell bestehend aus den beiden etablierten Zelllinien LNCaP und PC3 verwendet. LNCaP-Zellen wurden aus einem supraklavikulären Lymphknoten eines 50-jährigen kaukasischen Mannes mit gesicherter Diagnose eines metastasierten Prostatakarzinoms (mPCa) isoliert. Diese Zelllinie ist Androgen- und Östrogenrezeptor positiv und sensitiv gegenüber DHT⁷⁴. PC3-Zellen wurden aus einer Knochenmetastase eines 62-jährigen kaukasischen Mannes mit gesicherter Diagnose eines fortgeschrittenen mPCa isoliert. Diese Zelllinie zeigt nur eine geringe 5-Alpha-Reduktaseaktivität und ist nur minimal bis gar nicht DHT-sensitiv⁷⁵.

Der Einfluss von HSP27 auf die AR-Funktion wurde nach gentechnischer Modulation des Hitzeschockproteins mittels zellbiologischer und molekularbiologischer Techniken durchgeführt. Zur Analyse weiterer Faktoren, die an der HSP27-vermittelten Kontrolle des AR beteiligt sind, wurde abschließend die MikroRNA miR-1 als potentieller Regulator der AR-Funktionen untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien und Reagenzien

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
1,4-Dithiothreitol	ROTH
1-Brom-3-Chlorpropan	Sigma
2-Mercaptoethanol	ROTH
E-Aminocapronsäure	Sigma
Acrylamid Rotiphorese® Gel 30	ROTH
Acrylan®	Antiseptika
Agarose	Biozym
Ammoniumperoxodisulfat	ROTH
Bromphenolblau	Feinchemie K.H. Kallies KG
CHAPS	ROTH
Coomassie Brilliantblau G-250	Fluka
Deionisiertes Wasser	Millipore
Dinatriumhydrogenphosphat	ROTH
Dimethylsulfoxid	AppliChem
DPBS	Gibco
EDTA	ROTH
Essigsäure (≥95,9%)	ROTH
Ethanol, unvergällt (96%)	Universitätsapotheke
Ethanol, vergällt (96%)	Universitätsapotheke
Fibronektin	Sigma
Fetales Kälberserum	SAFC Biosciences
Film-Entwickler	AGFA
Film-Fixierer	AGFA
Formaldehyd	ROTH
Formamid	ROTH
G418	ROTH

GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas
Glycin	ROTH
Guanidiniumhydrochlorid	AppliChem
Harnstoff	ROTH
Isopropanol	ROTH
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
LB-Agar	ROTH
LB-Medium	ROTH
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen
LumiGLO®	Cell Signaling
Methanol	ROTH
MOPS	ROTH
Natriumazid	ROTH
Natriumchlorid	ROTH
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories
peqGOLD TriFast™	peqlab
Ponçeau S	SERVA
RedSafe™	Intron Biotechnology
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
RNase A	ROTH
Roti®-Block	ROTH
Salzsäure	Merck
SensiMix™ SYBR Kit	Bioline
SDS	SERVA
siLentFect®	Bio Rad
SuperSignal®	Thermo Scientific
TEMED	ROTH, Gibco
Thioharnstoff	ROTH
Trichloressigsäure	ROTH
Tris	ROTH

Trypsin	Promega
Tween	ROTH

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
6-Well-Zellkulturschalen	Greiner
96-Well-Platten	Greiner
96-Well-Platten, PCR	VWR
Bechergläser, versch.Größen	Jenaer Glas
Einfrierboxen Kryosafe	National Lab
Falcon® 50ml	Biosciences
Filterpapier	Whatman
Glasflaschen (100/500/1000/2000ml)	Schott Duran
Handschuhe	Kimberly Clark
Kryoröhrchen, 1,8ml	NUNC
Messkolben	Labortherm
Messzylinder	Duran®; Scherf®
Nitrozellulosemembran PROTRAN®	Whatman
Pasteurpipetten	VWR
PCR-Folien	Applied Biosystems
Pipettenspitzen, gefiltert	Sarstedt
Pipettenspitzen, ungefiltert	Sarstedt
serologische Pipetten, steril/unsteril	Sarstedt
Reaktionsgefäße, 0,2ml (PCR-tubes)	Biozym
Reaktionsgefäße, 1,5 ml/2 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße, 15 ml/50 ml	BD Falcon™
Zellkulturflaschen, T75	Sarstedt; Greiner
Zellschaber	Techno Plastic Products
ZipTip® Pipette	Millipore

3.1.3. Geräte

Produkt	Hersteller
Absorptionsmessgerät	Tecan infinite M200
Agarose-Gelelektrophorese	BioRad, Biometra
Auflichtmikroskop Telaval 3	Zeiss
Autoklaven	Systec
Brutschrank	Cell MMM-Group
Eismaschine	Enodis
Electroblotting System	BioRad
Feinwaage	Sartorius
Filmkassette	AGFA / Kodak
Gefrierschränke (-20°C)	AEG; Foron; Liebherr; Miele
Gefrierschränke (-80°C)	Jouan; Nuaire; NUNC
Geldokumentationsgerät	Intas
Heizblock QBT 1	Sarstedt
Kühlschränke (~4°C)	Miele
Laminarbox	Biohit
Magnetrührer	Variomag Multipoint HP
Mikrowelle	micromaxx
Nano-Drop	BioRad
pH-Meter	Orion
Photometer	Eppendorf
Pipetten	Eppendorf; Biohit
Pipettierhilfe	Pipeto
Pumpe	PharmaciaLKB
Reinstwasseranlage Milli-Q Synthesis A 10	Millipore
qRT-PCR-Cycler	BioRad CFX96
Schüttler Vibramax 100	Heidolph Instruments
SDS-PAGE-Platten und Kammersystem	BioRad
Spektralphotometer Nano-Drop 2000c	Thermo Scientific
Stromversorgungsgerät PowerPack™	Bio-Rad
ThermalCycler	Eppendorf
Thermocycler T3000	Biometra

Thermogefäß für flüssigen Stickstoff	Isotherm
Überkopfschüttler Multi Bio RS-24	BioSan
Ultraschallbad	Transsonic
Vakuumpumpe	Integra Biosciences
Waage	Sartorius
Wasserbad	Grant
Wippschüttler	UNITWIST-RT
Zählkammer (Neubauer)	Optik Labor
Zentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf
Zentrifuge PerfectSpin P	Peqlab
Zentrifuge Jouan MR1822	Jouan

3.1.4. Zelllinien

LNCaP

Hersteller	American Type Culture Collection, Manassas, USA
Charakteristik	Der LNCaP-Klon wurde 1977 von J. S. Horoszewicz et al. mittels Aspirationsbiopsie aus einem supraklavikulären Lymphknoten eines 50-jährigen kaukasischen Mannes mit gesicherter Diagnose eines metastasierten Prostatakarzinoms isoliert. Diese Zelllinie ist Androgen- und Östrogenrezeptor positiv und empfindsam gegenüber 5-Alpha-Dihydrotestosteron.

PC3

Hersteller	American Type Culture Collection, Manassas, USA
Charakteristik	Der PC3-Klon wurde 1979 von M. E. Kaighn et al. aus einer Knochenmetastase eines 62-jährigen kaukasischen Mannes mit gesicherter Diagnose eines metastasierten Prostatakarzinoms (Grad IV) isoliert. Diese Zelllinie zeigt eine nur geringe 5-Alpha-Reduktaseaktivität und ist daher nur minimal bis gar nicht empfindsam gegenüber 5-Alpha-Dihydrotestosteron.

PC3-HSP27

Hersteller	American Type Culture Collection, Manassas, USA (PC3-Klon) Molekular-urologisches Forschungslabor Universitätsmedizin Greifswald, Deutschland (PC3-HSP27-Klon)
Charakteristik	Der PC3-HSP27-Klon wurde durch molekularbiologische Modifikation des ursprünglichen PC3-Klons durch M.B. Stope et. al. hergestellt. Hierbei handelt es sich um eine stabile Zelllinie, in welcher im Gegensatz zum Ausgangsklon das Hitzeschockprotein27 stabil überexprimiert wird.

3.1.5. Antikörper**Primärantikörper****Hersteller**

anti-AR-N rabbit polyclonal IgG	Cell Signaling
anti-GAPDH rabbit monoclonal IgG	Cell Signaling
anti-HSP27 mouse monoclonal IgG	Cell Signaling

Sekundärantikörper**Hersteller**

goat anti-rabbit-IgG	Cell Signaling
horse anti-mouse-IgG	Cell Signaling

3.1.6. Primer und Vektoren**Primer****Zielstruktur****Sequenz****AR**

AR FOR

5'-TGCCTGATCTGTGGAGATGA-3'

AR REV

5'-CGAAGACGACAAGATGGACA-3'

HSP27

HSP27 FOR	5'-AAGCTAGCCACGCAGTCCAA-3'
HSP27 REV	5'-CGACTCGAAGGTGACTGGGA-3'

PSA

PSA FOR	5'-CCGGAGAGCCTGTGTCACC-3'
PSA REV	5'-GTGCAGCACCAATCCACGTC-3'

Ribosomales Protein LP0 (housekeeping)(RPLP0)

RPLP0 FOR	5'-CAATGGCAGCATCTACAACC-3'
RPLP0 REV	5'-ACTCTTCCTTGGCTTCAACC-3'

MikroRNA miR-1

miR-1 FOR	5'-ACATACTTCTTTACATTCCA-3'
Universal reverse Primer	5'-TGGTGTCGTGGAGTCCGGT-3'

snRNA RNU6B (housekeeping)

U6 FOR	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
Universal reverse Primer	5'-TGGTGTCGTGGAGTCGT-3'

Vektoren**Produkt**

pcDNA3.1

pcDNA3.1-HSP27

siRNA-HSP27 I

siRNA-HSP27 II

Hersteller

Invitrogen

MB Stope / C. Kubisch

Signal Silence

Signal Silence

3.1.7. Zellkulturmedien**Produkt**

RPMI 1640 mit Phenolrot

RPMI 1640 ohne Phenolrot

Hersteller

PAN Biotech, Aidenbach

PAN Biotech, Aidenbach

3.1.8. Kits

Produkt

mirPremier microRNA Isolationskit
miScript PCR Starter Kit
miScript Primer Assay
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit

Hersteller

SIGMA
Qiagen
Qiagen
Fermentas

3.1.9. Computerprogramme

Programm

Microsoft Word 2011
Microsoft Excel 2011
GraphPad Prism 5
CFX Manager (Version 2.0)
EndNote 6

Hersteller

Microsoft
Microsoft
GraphPad Software
BioRad
Thomson Reuters

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Sowohl der LNCaP- als auch der PC3-Klon wurden käuflich über die Firma American Type Culture Collection erworben und nach Herstellerangaben kultiviert. Nach ausreichendem Anwachsen wurde ein Teil der Zellen in die Routinezellkultur überführt bzw. zur dauerhaften Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2.2. Auftauen der Zellen

Es wurde je ein Kryo-Röhrchen pro Zell-Klon aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und bei 37°C aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert und in 3ml Vollmedium umgesetzt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 3000U/min wurde der Überstand verworfen und das Sediment erneut in 3ml Vollmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in eine mit 17ml Vollmedium gefüllte 75cm² Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank bei 37°C und 5%CO₂-Gehalt kultiviert. Es folgte die tägliche lichtmikroskopische Begutachtung und im Falle von Konflueszenz ein Wechsel des Vollmediums.

3.2.3. Passagieren der Zellen

Die Passage aller 3 Zelllinien erfolgte 2-mal wöchentlich. Hierzu wurde nach lichtmikroskopischer Begutachtung zunächst das Vollmedium abgesaugt und die Zellen anschließend 2-mal mit einer 1%igen PBS-Lösung gewaschen. Anschließend wurde der Zellrasen mit 1ml einer 2-fach Trypsin/EDTA benetzt und für 2 min inkubiert. Durch vorsichtiges Beklopfen der Zellkulturflasche wurden die Zellen vollständig abgelöst. Es folgte die Zugabe von 2ml Vollmedium und Resuspension der Zellen. Zur weiteren Passage wurde 1ml dieser Zellsuspension in eine neue mit 17ml Vollmedium gefüllte 75cm² Zellkulturflasche überführt. Für die folgenden Versuchsreihen wurden alle 3 Zelllinien in mit Fibronectin beschichteten 6-Well Zellkulturplatten ausgesäht. Hierbei wurden 2-3x10⁶ LNCaP-Zellen verwendet, bzw. PC3 und PC3-HSP27-Zellen im Verhältnis 1:6 bis

1:8 eingesetzt. Die Zellzählung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Zur Sicherstellung einer ausreichenden Zellvitalität wurden die Zellen nach maximal 25-facher Passagierung verworfen.

3.2.4. Einfrieren der Zellen

Die Herstellung neuer Kryokonserven erfolgte aus Zellen junger Passage, welche nicht für Versuchszwecke oder die Routinezellkultur benötigt wurden. Hierzu wurden die in Vollmedium suspendierten Zellen 5 min bei 3000U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 3ml Einfriermedium vorsichtig suspendiert. Die Zellzählung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Pro Kryokonserven wurden $1,2 \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Diese wurden für 24 Stunden bei -80°C langsam heruntergekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2.5. Transfektion der Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses des Hitzeschockproteins 27 auf den Androgen-Rezeptor wurden verschiedene Transfektionsversuche durchgeführt. Hierfür wurden entweder cDNA-Überexpressionsvektoren oder small interfering RNAs (siRNA) zum gezielten Gen-Knock-Down verwendet.

3.2.5.1. Knock-Down von HSP27 in LNCaP Zellen

Für gezielte Knock-Down Versuche des HSP27 in LNCaP Zellen wurden diese mit spezifischen siRNAs transfiziert. Für ein bestmögliches Ergebnis wurde eine Kombination aus zwei siRNAs (siRNA-HSP I und siRNA-HSP II, SignalSilence) und siLent Fect verwendet. SiRNAs gehören zur Kategorie doppelsträngiger RNA-Moleküle, welche eine wichtige Rolle bei der RNA-Interferenz spielen, indem sie die Expression spezifischer Gene mittels komplementärer

Nukleotidsequenzen hemmen. LNCaP Zellen wurden in mit Fibronektin beschichteten 6-Well Platten ausgesät. Im Falle ausreichender Adhärenz erfolgte die Vorbereitung der Transfektionsreagenzien pro Well nach folgendem Ansatz:

Gesamtmedium pro Well	= 1,5 ml
→ Transfektionsansatz pro Well	= 0,25ml
→ vorzulegendes Medium pro Well	= 1,25ml

siRNA-Transfektionsansatz:

125 µl RPMI Medium
 + 2,25µl siRNA-HSP27 I
 + 2,25µl siRNA- HSP27 II

Kontrolltransfektionsansatz:

125 µl RPMI Medium

siLentFect-Transfektionsansatz:

125 µl RPMI Medium
 + 0,75 µl siLF (siLent Fect)

Alle 3 Transfektionsansätze wurden separat hergestellt. Danach wurde der siRNA- bzw. Kontrolltransfektionsansatz mit dem siLentFect Transfektionsansatz sorgfältig vermischt und über 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischenzeitlich wurde das verbrauchte Medium von den Zellen abgesaugt und durch je 1,25ml frisches Transfektionsmedium ersetzt. Anschließend wurden je 0,25ml Transfektionsansatz- bzw. Kontrolltransfektionsansatzreagenz auf ein 6-Well getropft und durch vorsichtiges Bewegen der gesamten Zellplatte mit dem vorgelegten Medium vermischt. Danach wurden die Zellen für 72h bis zur Ernte im Brutschrank kultiviert.

3.2.5.2. Überexpression von HSP27 in PC3 Zellen

Eine Überexpression des HSP27 in PC3-Zellen wurde mittels Expressionsvektoren erzielt. Expressionsvektoren sind Klonierungsvektoren, mit denen eine codierende DNA-Sequenz in mRNA transkribiert und nachfolgend in

ein Genprodukt translatiert werden kann. Die Transfektion erfolgte mittels dem pcDNA-HSP27-Vektor bzw. dem Kontrollvektor pcDNA 3 sowie Lipofectamine. Pro Transfektion wurden 5µg DNA eingesetzt. PC3 Zellen wurden in mit Fibronectin beschichteten 6-Well Platten ausgesät. Im Falle ausreichender Adhärenz erfolgte die Vorbereitung der Transfektionsreagenzien pro Well nach folgendem Ansatz:

Gesamtmedium pro Well	= 3ml
→ Transfektionsansatz	= 1ml
→ vorzulegendes Medium	= 2ml

pcDNA-HSP27-Transfektionsansatz:

500 µl RPMI Medium
+ 5µg pcDNA-HSP27

pcDNA-3Kontrolltransfektionsansatz:

500 µl RPMI Medium
+ 5µg pcDNA-3

Lipofectamine-Transfektionsansatz

500 µl RPMI Medium
+ 7,5µl Lipofectamine

Alle 3 Transfektionsansätze wurden separat hergestellt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der pcDNA-HSP27- bzw. der pcDNA-3-Kontrolltransfektionsansatz mit dem Lipofectamine-Transfektionsansatz vermischt und erneut für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischenzeitlich wurde das verbrauchte Medium von den Zellen abgesaugt und durch je 2ml frisches Transfektionsmedium ersetzt. Anschließend wurden je 1ml Transfektionsansatz- bzw. Kontrolltransfektionsansatzreagenz auf einen 6-Well Träger getropft und durch vorsichtiges Bewegen der gesamten Zellplatte mit dem vorgelegten Medium vermischt. Danach wurden die Zellen für 72h bis zur Ernte im Brutschrank kultiviert.

3.2.6. Protein- und RNA-Isolierung

Reagenzien

PBS (pH 7,4)	1,06 mM KHPO ₂
	155,17 mM NaCl
	2,97 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
peqlabGOLD TriFast	
1-Bromo-3-Chloropropan	
Isopropanol	
75% Ethanol, unvergällt	
95% Ethanol, unvergällt	
Guanidinium-HCl-Lösung	50ml Ethanol 95%, unvergällt
	1,433g Guanidinium-HCl
2D-Lysispuffer	2,4g Harnstoff
	0,76g Thioharnstoff
	0,2g CHAPS
	0,1 DTT
	0,048g Tris
	5ml Aqua bidest

Die RNA- und Proteinisolierung erfolgte mittels TriFast. Pro Zelllinie und Versuch wurde je eine 6-Well Zellkulturschale geerntet. Nach lichtmikroskopischer Begutachtung wurde das Medium jeder 6-Well Zellkulturschale abgesaugt und die Zellen 1 mal mit 3ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 500µl TriFast und 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Danach wurden die Zellen mittels Zellschaber gelöst, das Lysat in ein Reaktionsgefäß überführt und erneut homogenisiert. Im Anschluss wurden 100µl 1-Bromo-3-Chloropropan zugegeben und das Reaktionsgefäß für 15 Sekunden gevortext. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine 15 minütige Inversion und anschließende Zentrifugation bei 15.000rpm und 4°C für 15 min. Zur Verbesserung der Phasentrennung wurden die Proben 3 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde die obere wässrige Phase durch vorsichtiges

Abpipettieren ohne Kontamination durch die Interphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Interphase und organische Phase wurden im Reaktionsgefäß belassen und bis zur Proteinpräparation auf Eis gelagert.

3.2.6.1. RNA-Präparation mit TRIZOL

Zur Fällung der RNA wurde die wässrige Phase mit 250µl Isopropanol versetzt, 10 mal invertiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte die Zentrifugation bei 15.000rpm und 4°C für 10 Minuten. Der Überstand wurde durch vorsichtiges Absaugen entfernt und das RNA-Pellet mit 75%igem Ethanol durch 5-10 minütige Inversion und anschließende 5 minütige Zentrifugation bei 12.000rpm und 4°C gewaschen. Dieser Vorgang wurde 3 mal wiederholt. Danach wurde der Überstand verworfen und das RNA-Pellet für 5-10 Minuten luftgetrocknet. Abschließend wurde das RNA-Pellet je nach Pelletgröße in 22-32µl RNase freiem Wasser gelöst und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

3.2.6.2. Protein-Präparation mit TRIZOL

Zur Ausfällung der DNA (Interphase) wurde das auf Eis zwischengelagerte Reaktionsgefäß mit 150µl 95%igem Ethanol versetzt, 10 mal invertiert, 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und bei 600rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand (ca. 400µl) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 750µl Isopropanol versetzt, 20 Minuten invertiert und bei 15.000rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde vom Überstand befreit, mit 1ml Guanidinium-HCl versetzt, für 20 Minuten auf dem Rollinkubator gewaschen, bei 12.000rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und abschließend erneut vom Überstand befreit. Dieser Vorgang wurde 3 mal wiederholt. Anschließend wurde das Proteinpellet mit 1ml 95%igem Ethanol für 20 Minuten auf dem Rollinkubator gewaschen und bei 12.000rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet für 10 Minuten vakuumgetrocknet.

Abschließend wurde das Proteinpellet je nach Pelettgröße in 100-200µl 2D-Lysepuffer durch 45 minütige Inversion gelöst.

3.2.6.3. MikroRNA-Präparation

Reagenzien:

mirPremier® microRNA Isolations Kit

HBSS-Puffer

8g/l NaCl
 0,4g/l KCL
 0,06g/l KH₂PO₄
 0,098g/l MgSO₄
 0,048g/l Na₂HPO₄
 0,14g/l CaCl₂
 0,35g/l NaHCO₃
 1g/l Glucose
 0,01g/l Phenolrot (Natriumsalz)

Lysepuffer (300µl pro 6well)

70% MikroRNA Lysis Buffer
 30% Binding Solution
 10µl/ml Mercaptoethanol

Die MikroRNA-Isolation erfolgte gemäß den Herstellerangaben des *mirPremier® microRNA Isolations Kits*. Dieses Isolationsverfahren beruht auf einem speziellen Lysepuffer sowie mehreren Filtrationsschritten mittels spezifischer Kieselgelsäulen. Pro Zelllinie und Versuch wurde je eine 6-Well Zellkulturschale geerntet. Nach lichtmikroskopischer Begutachtung wurde das Medium jeder 6-Well Zellkulturschale abgesaugt und die Zellen 2 mal mit 2ml HBSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 300µl Lysepuffer und 5 minütiger Inversion bei Raumtemperatur lysiert. Das Lysat wurde anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 16.400rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das 1,1-fache Volumen 95%-igen Ethanol dazugegeben und vorsichtig vermischt. Danach wurde das Gemisch auf

die Kieselgelsäule pipettiert und bei 16.400rpm und 4°C für 30 Sekunden zentrifugiert. Die Kieselgelsäule wurde in ein neues Reaktionsgefäß eingesetzt und 1 mal mit 700µl 95% Ethanol gewaschen. Danach erfolgte ein zweiter und dritter Waschschrift mittels Kit-spezifischer Wash-Solution und anschließender Zentrifugation bei 16.400rpm und 4°C für 30 Sekunden. Im Anschluss wurde die Säule 1 Minute luftgetrocknet und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 20-40µl Kit-spezifischer Elution-Solution, 1 minütiger Einwirkzeit und anschließender Zentrifugation wurden die MikroRNAs aus der Säule gelöst. Durch Wiederholung dieses Schrittes konnte eine höhere MikroRNA-Ausbeute erzielt werden. Abschließend erfolgte die Lagerung auf Eis bis zur Weiterverarbeitung.

3.2.6.4. Zellyse mittels RIPA-Lysepuffer

Reagenzien

PBS (pH 7,4)	1,06 mM K ₂ HPO ₄
	155,17 mM NaCl
	2,97 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
RIPA-Stammlösung	50 mM Tris (pH 7,5)
	5 mM EDTA (pH 8,0)
	150 mM NaCl
	10 mM K ₂ HPO ₄
	10% Glycerol
	1% Triton X-100
RIPA-Gebrauchslösung	0,05% SDS
	67% RIPA-Stammlösung
	1 mM SV
	20 mM NaF
	20 mM Glycerol-2-Phosphat
	0,1 mM PMSF
20% Complete™ Mini EDTA-frei	

Pro Zelllinie und Versuch wurde je eine 6-Well Zellkulturschale geerntet. Nach lichtmikroskopischer Begutachtung wurde das Medium jeder 6-Well Zellkulturschale abgesaugt und die Zellen 1 mal mit 3ml PBS gewaschen. Anschließend wurden Zellen mittels Zellschaber in 1ml PBS geerntet und bei 3000 U/min für 5 min bei 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment je nach Zelldichte in 100-200µl RIPA-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension für 1 Stunde auf Eis inkubiert und abschließend für ca. 30 Sekunden mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die Zelllysate wurden bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

3.2.7. Proteinanalyse

3.2.7.1. BRADFORD-Assay

Der Bradford-Assay ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Er beruht auf der Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 mit Proteinen. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner Sulfonatform stabilisiert und das Absorptionsmaximum verschiebt sich von 470nm nach 595nm. Der Standard zur Ermittlung der Proteinmenge wurde nach folgender Tabelle pipettiert und nach 5 minütiger Inkubation die Extinktion bei 595nm am Photometer gemessen.

TriFast-Proben			Bradford-Reagenz	RIPA-Proben	
BSA-Standard in 2D-Lysepuffer	2D-Lysepuffer	A. bidest		BSA-Standard in A. bidest	A. bidest
-	30 µl	70 µl	1,9 ml	-	100 µl
1 µl	29 µl	70 µl	1,9 ml	1 µl	99 µl
2 µl	28 µl	70 µl	1,9 ml	2 µl	98 µl
4 µl	26 µl	70 µl	1,9 ml	4 µl	96 µl
6 µl	24 µl	70 µl	1,9 ml	6 µl	94 µl
10 µl	20 µl	70 µl	1,9 ml	10 µl	90 µl
20 µl	10 µl	70 µl	1,9 ml	20 µl	80 µl
Probe	2D-Lysepuffer	A. bidest		Probe	A. bidest
2 µl	28 µl	70 µl	1,9 ml	2 µl	98 µl

3.2.7.2. SDS-Page

Reagenzien

10x Laufpufferstocklösung	192 mM Glycin 24,8 mM Tris (pH 8,3)
1x SDS-Laufpuffer	10% 10x Laufpufferstocklösung 0,1% 10% SDS
5x Proteinladepuffer	156 mM Tris (pH 6,8) 25% Glycerol 5% SDS 12,5% β -Mercaptoethanol 0,2% Bromphenolblau
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris (pH 6,8) 10% 10x Laufpufferstocklösung
Trenngelpuffer	1,5 M Tris (pH 8,8)

SDS-PAGE ist eine Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Trennung von Proteinen in einem elektrischen Feld in Abhängigkeit von der Molekülmasse. Die Eigenladung der Proteine wird durch das im Gel enthaltene anionische SDS maskiert. Größere Proteine bewegen sich langsamer durch das Feld als kleinere und können so voneinander getrennt werden. Zur Beurteilung der Molekülgröße wird ein Proteingrößen-Marker mitgeführt. Trenn- und Sammelgel wurden wie folgt hergestellt:

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

Die Proteinproben wurden mit 5xProteinladepuffer versetzt. RIPA-Lysate wurden anschließend für 5 min denaturiert, auf Eis heruntergekühlt und abzentrifugiert. Es wurde das SDS-System von BioRad verwendet. Pro Gel-Tasche wurden 20µg Protein aufgetragen. Der Gel-Lauf erfolgte bei 120V und wurde beendet, bevor das Farbband des Ladepuffers das untere Gel-Ende erreicht hatte.

3.2.7.3. Western-Blot

Reagenzien

Antikörperlösung	5% BSA 10% 10x TBS 0,001 Tween-20
Blockierungslösung	1x Roti®-Block
Lumineszenzlösung	5% LumiGLO®-Reagent A (20x) 5% LumiGLO®-Reagent B (20x)
Ponçeau S-Lösung	0,2% Ponçeau S 3% Trichloressigsäure
Sekundärantikörperlösung	1x Roti®-Block
TBS-T	20 mM Tris

138 NaCl
 0,1% Tween 20
 (pH 7,6)

Entwickler	nach Herstellerprotokoll
Fixierer	nach Herstellerprotokoll

Als Western Blot bezeichnet man die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran, die anschließend über unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen werden können.

Nach Beendigung des Gellaufs wurde die Gel-Haltvorrichtung vorsichtig entnommen, das Trenngel vom Sammelgel mittels Spatel gelöst und in Transferpuffer legt. Zusätzlich wurden 8 Filtermembranen und 1 Nitrozellulosemembran in Transferpuffer äquilibriert. Der Aufbau des Blots erfolgte wie folgt:

Kathode
 4 Filterpapiere
 Arcylamidgel
 Nitrozellulosemembran
 4 Filterpapiere
 Anode

Luftblasen wurden durch Abrollen mit einer Glasröhre entfernt. Anschließend wurde bei 1,2mA pro cm² für 1 Stunde geblottet. Zur Transferkontrolle wurde die Nitrozellulosemembran 5 min in eine Ponceau S-Lösung eingelegt und anschließend begutachtet. Im Falle eines erfolgreichen Transfers wurde die Membran mit TBS-T und A. bidest gewaschen und für 1 Stunde mit Roti-Block-Lösung blockiert. Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper bei 4°C über Nacht. Zur optimalen Benetzung wurde das Inkubationsbehältnis auf einem Wippschüttler gelagert. Am Folgetag wurde die Primärantikörperlösung abgenommen und die Membran 3 mal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem zum Primärantikörper passenden Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur und Inversion

inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde verworfen und die Membran nochmals 3 mal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Zwischenzeitlich wurden die Lumineszenzlösung und die Filmkassette vorbereitet. Jede Membran wurde mit Lumineszenzlösung beträufelt und für 2-3 min inkubiert. Hiernach wurde die Membran in die Filmkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde unter vollständigem Lichtausschluss ein Röntgenfilm in die Kassette gelegt, nach entsprechender Expositionszeit wieder entfernt, im Entwickler inkubiert und im Fixierer abgestoppt. Abschließend wurde der Film densitometrisch ausgewertet.

3.2.8. Nukleinsäureanalytik

3.2.8.1. Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung

Die photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Nano-Drop-Messsystem bei 260nm. Als Leerwert wurde DEPC-Wasser verwendet.

3.2.8.2. Reverse Transkription von RNA

Reverse Transkription (RT) bezeichnet die Umschreibung von RNA in komplementäre DNA. Hierzu werden spezielle RNA-abhängige DNA-Polymerasen und Oligo-dT-Primer benötigt. Es wurde das „RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit“ verwendet. Die Reaktion erfolgte in 20µl Ansätzen nach folgendem Protokoll:

	Reagenzien	Inkubationsprotokoll
1. Schritt	1µg RNA 1,5µl Oligo-dT-Primer RNase-freies H ₂ O	65°C für 5 Minuten
2. Schritt	6µl Reaktions-Puffer 1,5µl RiboLock	42°C für 60 Minuten 72°C für 10 Minuten

3µl dNTP-Mix
1,5µl RevertAid RT

3. Schritt (Abkühlphase)

4°C für ∞

Abschließend wurden die Proben mit 200-300µl A.bidest aufgefüllt und bis zur Weiterverwendung auf Eis gelagert oder tiefgefroren.

3.2.8.3. Reverse Transkription von MikroRNA

Die RT der MikroRNA erfolgte mit dem „miScript Reverse Transcription Kit“. Im Unterschied zur RT von RNA wird bei der Umschreibung von MikroRNA diese mittels einer Poly-A-Polymerase zusätzlich polyadenyliert und somit für einen Oligo-dT-Primer erkennbar. Die Reaktion erfolgte in 10µl Ansätzen nach folgendem Protokoll:

	Reagenzien	Inkubationsprotokoll
1. Schritt	1µg RNA	37°C für 60 Minuten
	2µl Reaktions Puffer	95°C für 5 Minuten
	0,5µl Reverse Transkriptase	
	RNase freies Wasser	
2. Schritt (Abkühlphase)		4°C für ∞

Abschließend wurden die Proben 1:4 mit A.bidest aufgefüllt und bis zur Weiterverwendung auf Eis gelagert oder tiefgefroren.

3.2.8.4. Quantitative Real-time PCR nach reverser Transkription der RNA

Eine quantitative Real-time PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren. Sie beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und ermöglicht zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Die Quantifizierung wird mittels Fluoreszenz-Messung während eines PCR-Zyklus durchgeführt. Die PCR gliedert sich in eine Denaturierungs-, Primerhybridisierungs- und Elongationsphase. Je nach Protokoll werden diese 20-50 mal durchlaufen. Es wurde das *SensiMix™ SYBR®* Kit verwendet. Zusätzlich wurde je ein spezifischer Forward- und Reverse-Primer (HSP27, AR, PSA) eingesetzt. Als Housekeeping Gen wurde RPLP0 verwendet. Alle Ansätze wurden als Duplikate gemessen. Zusätzlich wurde ein Standard bestehend aus dem Pool aller verwendeten Proben eingesetzt. Zur Reinheitskontrolle wurde stets eine Wasserprobe mitgeführt. Die Reaktion erfolgte in 20µl Ansätzen nach folgendem Protokoll:

Mastermix	+	3µl cDNA
1µl Forward-Primer (10µM)		
1µl Reverse-Primer (10µM)		
10µl SensiMix™ SYBR®		
5µl Millipore-Wasser		

Das Ansetzen der Duplikate erfolgte auf Eis in einer 96-Well Platte. Der Mastermix wurde für jedes Primer-Paar in benötigter Menge angefertigt und auf Eis gelagert. Danach wurden je 3µl cDNA bzw. Millipore-Wasser für die Reinheitskontrolle pro Well vorgelegt und mit 17µl Mastermix durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt. Anschließend wurde die Platte mit einer Thermocyclerfolie verschlossen und abzentrifugiert. Die PCR wurde nach folgendem Protokoll durchlaufen:

1. Schritt: initiale Denaturierung der DNA	95°C für 10 Minuten
2. Schritt: Denaturierung	95°C für 10 Sekunden
3. Schritt: Annealing der Primer	60,1°C für 15 Sekunden
4. Schritt: Strangsynthese	72°C für 10 Sekunden
Wiederholung Schritt 2-4	44x
5. Schritt: Denaturierung	95°C für 10 Sekunden
6. Schritt: Schmelzkurvenanalyse	65°C bis 95°C; in 0,5°C Schritten

Anschließend erfolgte eine Schmelzkurvenkontrolle und Prüfung der Duplikatqualität. Im Falle von Suffizienz erfolgte die Endauswertung mit dem CFX-Manger (BioRad).

3.2.8.5. Quantitative Real-time PCR nach reverser Transkription der MikroRNA

Die quantitative Real-time PCR von umgeschriebener MikroRNA erfolgte mit dem „miScript PCR Starter Kit“. Im Unterschied zur RT-PCR mit mRNA werden in diesem Falle statt eines spezifischen Forward- und Reverse-Primerpaares ein Universalprimer (UP), welcher den Poly-A-Schwanz erkennt (siehe oben), und ein Forward-Primer, welcher spezifisch für die jeweilige MikroRNA ist, benötigt. Als Housekeeping Gen wurde snRNA Rnu6 (U6 Primer) verwendet. Alle Ansätze wurden als Duplikate gemessen. Zusätzlich wurde ein Standard bestehend aus dem Pool aller verwendeten Proben eingesetzt. Zur Reinheitskontrolle wurde stets eine Wasserprobe mitgeführt. Die Reaktion erfolgte in 10µl Ansätzen nach folgendem Protokoll:

Mastermix	+	3µl cDNA
1µl Universalprimer		
1µl MikroRNA spezifischer Primer (miR-1 oder U6)		
5µl SYBR® Green		

Das Ansetzen der Duplikate erfolgte auf Eis in einer 96-Well Platte. Der Mastermix wurde in benötigter Menge angefertigt und auf Eis gelagert. Danach wurden je 3µl cDNA bzw. Millipore-Wasser pro Well vorgelegt und mit 7µl Mastermix durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt. Anschließend wurde die Platte mit einer Thermocyclerfolie verschlossen und abzentrifugiert. Die PCR wurde nach folgendem Protokoll durchlaufen:

1. Schritt:	Aktivierung	95°C für 10 Minuten
2. Schritt:	Denaturierung	95°C für 10 Sekunden
3. Schritt:	Annealing der Primer	55°C für 15 Sekunden
4. Schritt:	Strangsynthese	72°C für 10 Sekunden
	<i>Wiederholung Schritt 2-4</i>	<i>44x</i>
5. Schritt:	Schmelzkurvenanalyse	65°C bis 95°C; in 0,5°C-Schritten

Anschließend erfolgte eine Schmelzkurvenkontrolle und Prüfung der Duplikatqualität. Im Falle von Suffizienz erfolgte die Endauswertung mit dem CFX-Manger (BioRad).

3.2.8.6. Agarose-Gelelektrophorese der cDNA

Reagenzien

5x Ladepuffer	0,16% Bromphenolblaulösung, gesättigt 4 mM EDTA 2,66% Formaldehyd 20% Glycerol 30,8% Formamid 40% 10x MOPS
10x MOPS	0,4 M MOPS 0,1 M Natriumacetat 10 mM EDTA

	(pH 7,0) (lichtgeschützt aufbewahrt)
50x TAE-Puffer	2 M Tris 0,95 M Essigsäure 50 mM EDTA pH ~8,0
1x TAE-Puffer	0,02% 50x TAE
Agarosegel	1% Agarose 1x TAE-Puffer 0,005% RedSafe™
RedSafe™ (20.000x)	

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Trennung von Nukleinsäuren in Abhängigkeit ihrer Größe. Es wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Zuerst wurde die Agarose in 1xTAE-Puffer aufgekocht und nach Erkalten auf ca. 60°C mit RedSafe™ versetzt. Anschließend wurde das Gemisch in die Gelapparatur gegossen und der passende Kamm eingesetzt. Nach Erkalten wurde der Kamm vorsichtig entfernt. Die aufzutragende cDNA-Probe wurde mit 5xLadepuffer versetzt und in die Kammer pipettiert. Anschließend erfolgte der Gellauf bei 100V für ca. 30 Minuten. Abschließend wurde das Gel unter UV-Licht begutachtet und ausgewertet.

3.2.9. Statistische Auswertung

Die Datenauswertung erfolgte mittels CFX-Manger (BioRad) und GraphPad Prism 5.0. Zur Normalisierung der Western-Blot Signale wurde die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Housekeeping Gen verwendet. Die in den Abbildungen gezeigten Daten stellen repräsentative Ergebnisse oder

Mittelwerte mit Standardabweichungen (\pm SEM, standard error of the mean) aus unabhängigen Versuchen dar. Die Auswertung basiert auf mindestens 3 unabhängigen Versuchen. Die Ermittlung signifikanter Ergebnisse erfolgte mittels ungepaartem T-Test. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0.05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

Zur Charakterisierung des Einflusses von HSP27 auf den AR und dessen Aktivität erfolgte zunächst die Bestimmung der Basalexpression beider Proteine in LNCaP und PC3-Zellen. Anschließend wurde durch Modulation der HSP27-Expression der Einfluss auf den AR untersucht. Hierfür wurden einerseits Transfektionsversuche in LNCaP und PC3-Zellen durchgeführt, als auch die stabile Zelllinie PC3-HSP27 verwendet. Anschließend erfolgte die Charakterisierung des Einflusses der miR-1 auf den HSP27-AR Regelkreis.

4.1. Basalexpression von AR und HSP27 in Prostatakarzinomzellen

4.1.1. AR-Expression in Prostatakarzinomzellen

Nach o.g. Protokollen erfolgte die Protein-Extraktion aus unbehandelten LNCaP und PC3-Zellen. Der Nachweis erfolgte mittels Western Blot. Als Housekeeping-Gen wurde GAPDH verwendet.

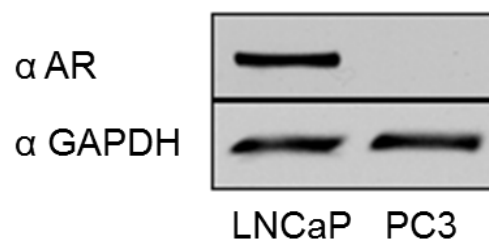


Abbildung 5: Western Blot Signal zum Nachweis der AR-Proteinexpression in LNCaP und PC3-Zellen

Zum Nachweis des Androgen-Rezeptors wurde ein gegen den N-Terminus gerichteter Antikörper verwendet. Als Housekeeping-Gen wurde GAPDH verwendet. AR = *Androgen-Rezeptor*; GAPDH = *Glyceraldehyd-3-Phosphate Dehydrogenase*

Erwartungsgemäß ließ sich in den Androgen-abhängigen LNCaP-Zellen der AR mittels eines an den N-Terminus des AR bindenden Antikörpers nachweisen, wohingegen in Androgen-unabhängigen PC3 keine Expression detektierbar war (Abbildung 5).

4.1.2. HSP27-Expression in Prostatakarzinomzellen

Anschließend erfolgte die Ermittlung des endogenen HSP27-Proteinlevels in unbehandelten LNCaP und PC3-Zellen. Der Nachweis erfolgte ebenfalls mittels Western Blot. Als Housekeeping-Gen wurde GAPDH verwendet.

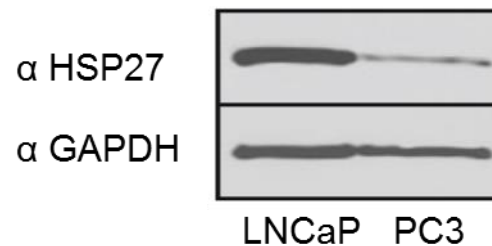


Abbildung 6: Western Blot Signal zum Nachweis der HSP27-Expression in LNCaP und PC3-Zellen

Zum Nachweis wurde ein spezifischer HSP27 Antikörper verwendet. Als Housekeeping-Gen wurde GAPDH verwendet. *HSP27 = Hitzeschockprotein 27; GAPDH = Glyceraldehyd-3-Phosphate Dehydrogenase*

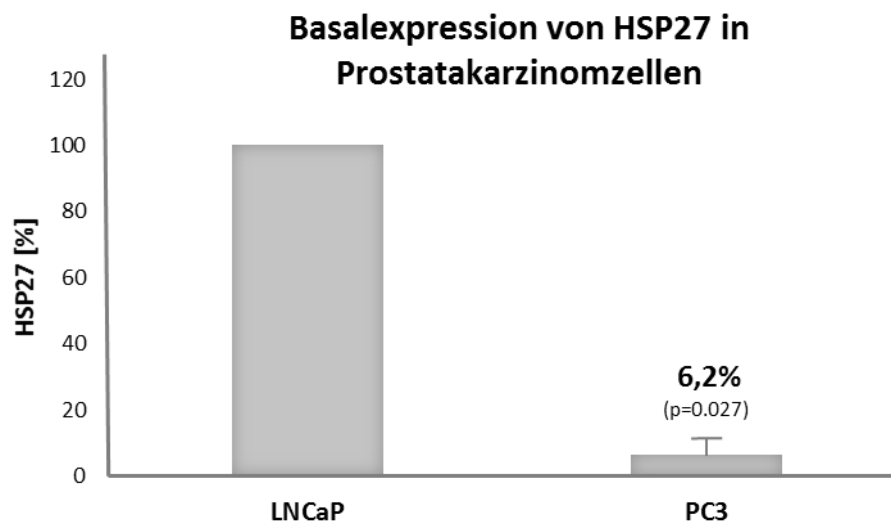


Abbildung 7: Quantifizierung der Proteinexpression des HSP27 in LNCaP und PC3-Zellen

Zum Nachweis wurde ein spezifischer HSP27 Antikörper verwendet. Als Housekeeping-Gen wurde GAPDH verwendet. *HSP27 = Hitzeschockprotein 27; GAPDH = Glyceraldehyd-3-Phosphate Dehydrogenase*

In den AR-positiven LNCaP-Zellen war im Vergleich zu den AR-negativen PC3-Zellen ein deutlich höheres endogenes HSP27-Proteinlevel nachweisbar (Abbildung 6). Nach Quantifizierung der Western Blot Signale zeigte sich eine lediglich 6,2%ige ($p=0.027$) basale Expression des HSP27 in PC3-Zellen im Vergleich zu LNCaP-Zellen (Abbildung 7).

4.2. Charakterisierung des Einflusses von HSP27 auf den AR in Prostatakarzinomzellen

Zur Untersuchung eines regulatorischen Einflusses von HSP27 auf den AR erfolgten gezielte HSP27 Knock-Down-Experimente in LNCaP bzw. Überexpressionsversuche in PC3-Zellen.

4.2.1. Auswirkungen des Knock-Downs von HSP27 auf den AR

Nach o.g. Protokoll erfolgte die Transfektion von LNCaP-Zellen mit HSP27 spezifischer siRNAs. Laborinterne Vorversuche ergaben die höchste Transfektionseffizienz durch Verwendung beider HSP27-spezifischer siRNAs (siRNA-HSP27 I und siRNA-HSP27 II) und einer Transfektionszeit von 72 Stunden.

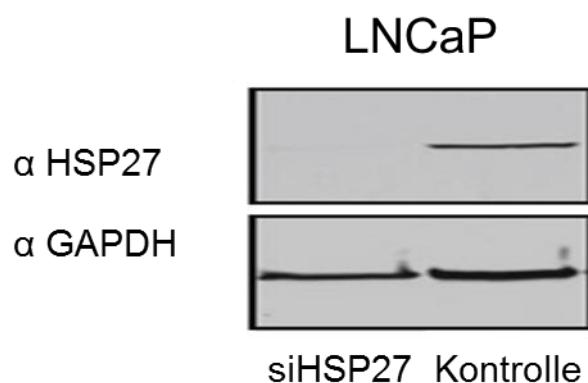


Abbildung 8: Western Blot Signal zum Nachweis der HSP27-Expression in LNCaP-Zellen nach HSP27 Knock-Down mittels siRNA-HSP27 I+II

Zum Nachweis wurde ein spezifischer HSP27 Antikörper verwendet. Als Housekeeping-Gen wurde GAPDH verwendet. *HSP27* = *Hitzeschockprotein 27*; *GAPDH* = *Glyceraldehyd-3-Phosphate Dehydrogenase*

Die Sicherung des erfolgreichen Knock-Downs erfolgte mittels Western Blot (Abbildung 8). Im Falle von Suffizienz folgte die Quantifizierung des AR mittels RT-PCR und Western Blot. Der Einfluss auf die transkriptionale Aktivität des AR wurde durch Quantifizierung von PSA Transkripten ermittelt.

AR-Transkripte in LNCaP-Zellen nach HSP27-Knock-Down

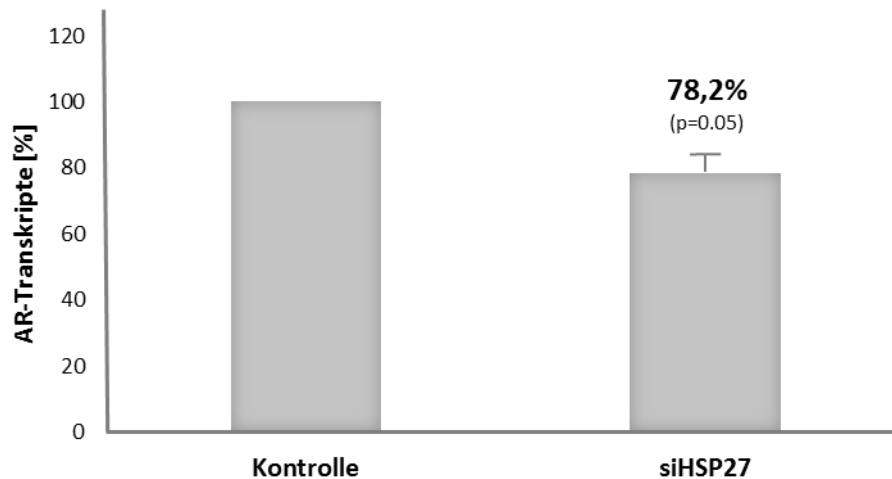


Abbildung 9: Quantifizierung der AR-Transkripte in LNCaP-Zellen nach HSP27 Knock-Down mittels siRNA-HSP27 I+II

Zum Nachweis wurden spezifische Primer-Paare verwendet. Als Housekeeping-Gen wurde RPLP0 verwendet. *AR* = Androgen-Rezeptor; *RPLP0* = Ribosomales Protein LP0

AR-Proteinexpression in LNCaP-Zellen nach HSP27-Knock-Down

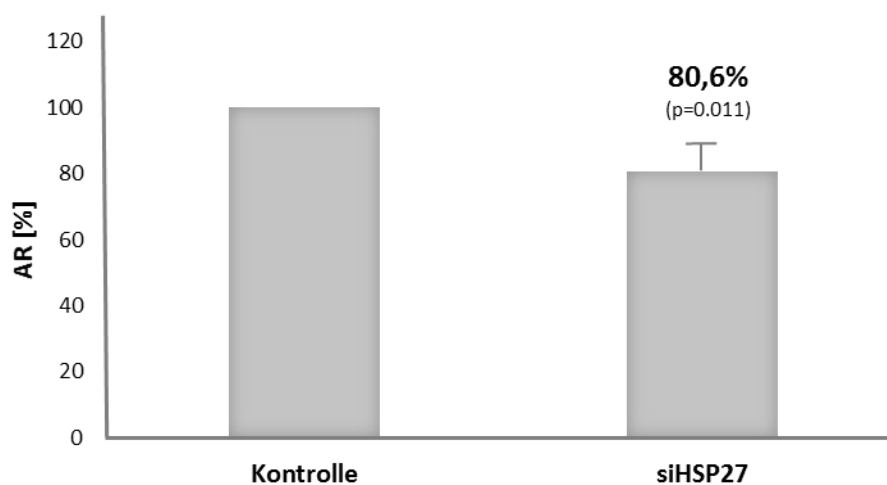


Abbildung 10: Quantifizierung der AR-Proteinexpression in LNCaP-Zellen nach HSP27 Knock-Down mittels siRNA-HSP27 I+II

Zum Nachweis des Androgen-Rezeptors wurde ein gegen den N-Terminus gerichteter Antikörper verwendet. Als Housekeeping-Gen wurde GAPDH verwendet. *AR* = Androgen-Rezeptor; *GAPDH* = Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase

Nach erfolgreichem HSP27 Knock-Down war eine signifikant verringerte Anzahl an AR-Transkripten (78,2%) ($p=0.05$) und signifikant niedrigere AR-Proteinexpression (80,6%) ($p=0.011$) sowie und signifikant reduzierte transkriptionelle Aktivität (PSA-Transkripte) (78,3%) ($p=0.031$) nachweisbar (Abbildung 9-11).

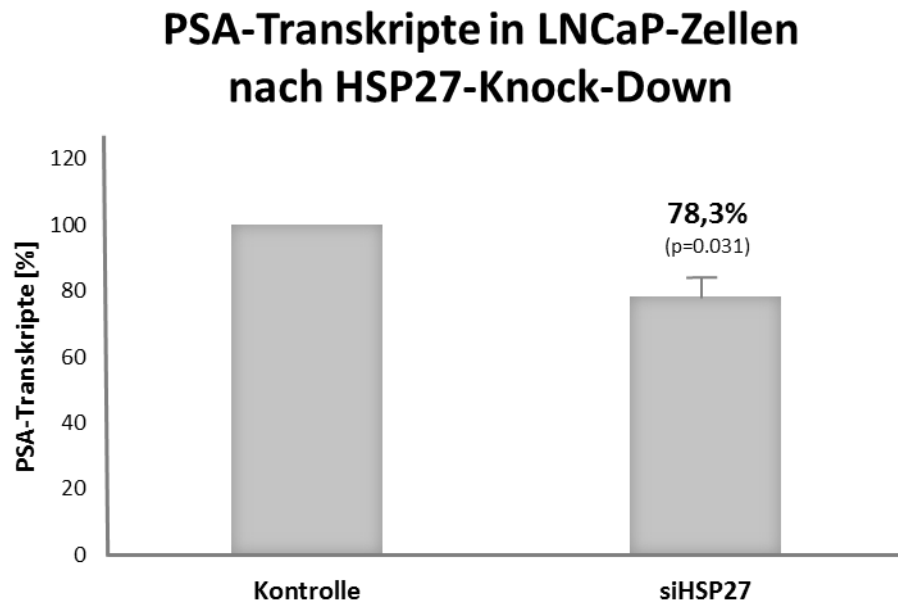


Abbildung 11: Quantifizierung der PSA-Transkripte in LNCaP-Zellen nach HSP27 Knock-Down mittels siRNA-HSP27 I+II

Zum Nachweis wurden spezifische Primer-Paare verwendet. Als Housekeeping-Gen wurde RPLP0 verwendet. *PSA = Prostata-spezifisches-Antigen; RPLP0 = Ribosomales Protein LP0*

4.2.2. Auswirkungen der Überexpression von HSP27 auf den AR

Zur Überprüfung der Ko-Regulation des HSP27 und des AR folgten HSP27-Überexpressionsversuche in PC3-Zellen. Die Transfektion erfolgte nach o.g. Protokoll. Die Transfektionszeit betrug ebenfalls 72 Stunden. Die Sicherung der erfolgreichen Überexpression erfolgte mittels Western Blot (Abbildung 12). Im Falle von Suffizienz folgte die Quantifizierung des AR mittels RT-PCR und Western Blot.

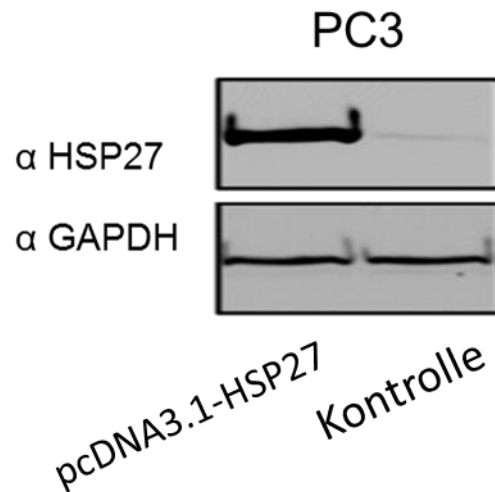


Abbildung 12: Western Blot Signal zum Nachweis der HSP27-Überexpression in PC3-Zellen

Zum Nachweis wurde ein spezifischer HSP27 Antikörper verwendet. Als Housekeeping-Gen wurde GAPDH verwendet. *HSP27* = Hitzeschockprotein 27; *GAPDH* = Glycerinaldehyd-3-Phosphate Dehydrogenase

Eine erfolgreiche HSP27-Überexpression führte zu einem signifikanten Anstieg der AR-Transkripte (156,2%) ($p=0.038$) (Abbildung 13). Eine Re-Expression des AR-Proteins oder ein Anstieg der PSA-Transkripte war jedoch nicht nachweisbar. Auch nach stabiler HSP27-Überexpression in PC3-HSP27 Zellen zeigte sich lediglich eine Erhöhung der AR-Transkripte (Daten nicht gezeigt).

AR-Transkripte in PC3-Zellen nach HSP27-Überexpression

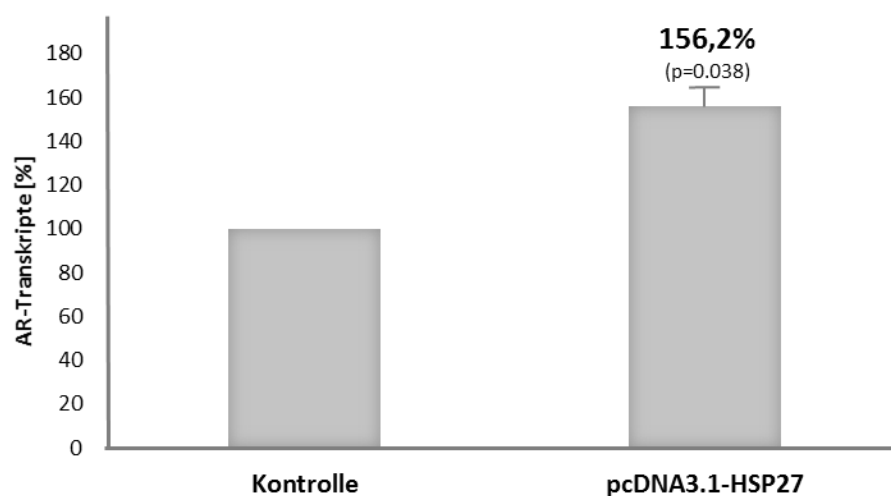


Abbildung 13: Quantifizierung der AR-Transkripte in PC3-Zellen nach HSP27 Überexpression

Zum Nachweis wurden spezifische Primer-Paare verwendet. Als Housekeeping-Gen wurde RPLP0 verwendet. *AR* = Androgen-Rezeptor, *RPLP0* = Ribosomales Protein LP0

4.3. Expression der MikroRNA miR-1 in Prostatakarzinomzellen

Zur Ermittlung eines möglichen Einflusses der miR-1 auf den HSP27-AR-Regelkreis erfolgte die Bestimmung des endogenen miR-1 Levels in LNCaP und PC3-Zellen. Die miR-1 Isolation erfolgte aus unbehandelten LNCaP und PC3-Zellen nach o.g. Protokoll.

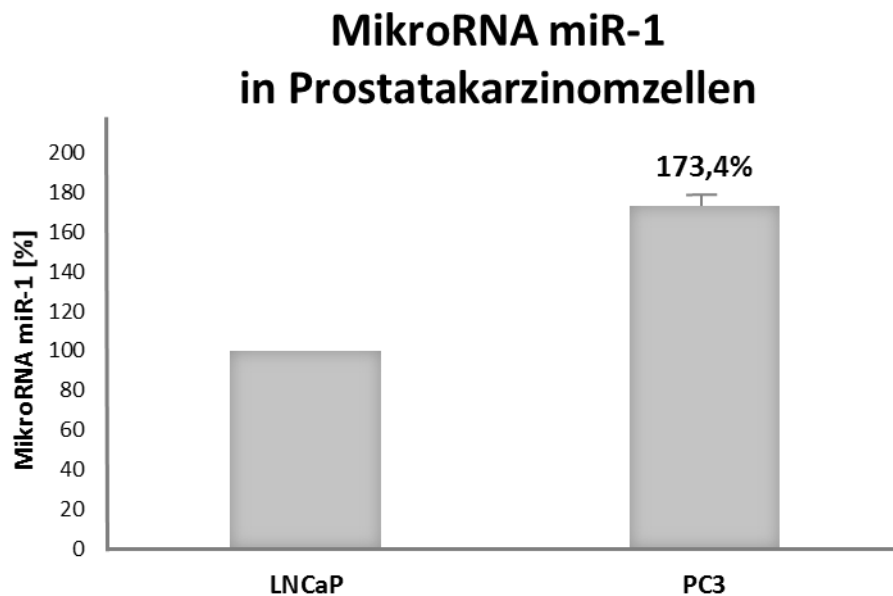


Abbildung 14: Quantifizierung der miR-1 in LNCaP und PC3-Zellen

Zum Nachweis wurde ein spezifischer miR-Primer verwendet. Als Referenz RNA wurde U6 verwendet. *miR-1 = MikroRNA 1*

In den Androgen-unabhängigen PC3-Zellen mit geringem endogenen HSP27 Level zeigte sich im Vergleich zu den Androgen-abhängigen LNCaP-Zellen mit hohem endogenen HSP27 Level eine deutlich höhere miR-1-Rate (173,4%) (Abbildung 14). Hieraus ergab sich eine hypothetischer modulatorischer Einfluss von HSP27 auf die miR-1, und somit auf den AR-Regelkreis.

4.4. Interaktion der MikroRNA miR-1 und des HSP27

Zur Detektion einer möglichen Interaktion der miR-1 und dem HSP27 erfolgte der miR-1-Nachweis in der HSP27 stabil überexprimierenden PC3-HSP27-Zelllinie.

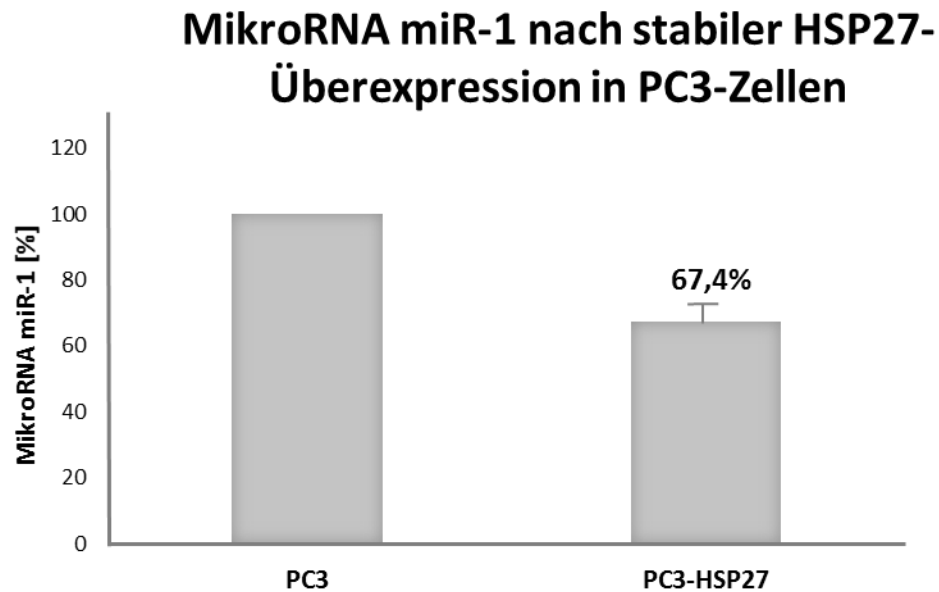


Abbildung 15: Quantifizierung der miR-1 in PC3 und PC3-HSP27-Zellen

Zum Nachweis wurde ein spezifischer miR-Primer verwendet. Als Referenz RNA wurde U6 verwendet. *miR-1* = *MikroRNA miR-1*

In den PC3-HSP27-Zellen (67,4%) zeigte sich eine deutlich geringere miR-1-Rate im Vergleich zu unbehandelten PC3-Zellen (Abbildung 15). Gleiches zeigte sich auch nach transienter HSP27-Überexpression in PC3-Zellen (Daten nicht gezeigt).

5. Diskussion

Im Rahmen der Tumorgenese entwickeln Tumorzellen diverse Strategien, um sich sowohl vor körpereigenen Abwehrmechanismen als auch medikamentösen Therapien zu schützen. Hierzu bewirken sie eine Veränderung ihres intra- und extrazellulären Mikromilieus, um sich dieser „Stresssituation“ zu entziehen⁷⁶. HSPs sind wichtige Faktoren, um Zellen vor einer Vielzahl potentieller Stressoren zu schützen und gelten daher als wichtige Mediatoren der Zellvitalität⁷⁷.

Der regulatorische Einfluss des HSP27 wurde weitläufig untersucht. In neurogenen „Alterskrankheiten“ wie Alzheimer oder Parkinson ist eine gesteigerte Expression mit der Ausprägung einer mildereren klinischen Symptomatik vergesellschaftet⁷⁸⁻⁸². In Abhängigkeit des untersuchten malignen Tumorgewebes zeigt sich jedoch ein sehr heterogenes Wirkspektrum. Während die Expression des HSP27 beim Ösophageal-Ca mit einer Verbesserung der Prognose korreliert, scheint sie in hormonabhängigen Tumoren wie dem Mamma-Ca (MCa) eher mit einem aggressiveren Tumorverhalten und geringerem Gesamtüberleben einher zu gehen^{83,84}. Auf Grund der gemeinsamen Zugehörigkeit des PCa und MCa zur Klasse der hormonabhängigen Tumore sind vor allem Untersuchungen im MCa interessant. Hier konnte, wie auch im PCa, eine deutliche HSP27-Überexpression nachgewiesen werden^{84,85}. Zusätzlich zeigte sich eine positive Korrelation mit dem Östrogen- (ER) als auch dem Progesteron-Rezeptorstatus (PR)⁸⁶. Dies liegt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Auch hier konnte eine positive Korrelation zwischen dem HSP27 und dem zentralen Hormonrezeptor, dem AR, gezeigt werden. Während in der AR-negativen PC3-Linie nur eine sehr geringe HSP27-Expression detektierbar war, zeigte sich in der Androgen-sensitiven LNCaP-Linie eine deutlich höhere Nachweisrate. Diese Korrelation konnte auch in anderen Versuchen bestätigt werden⁸⁷. Eine frühere Versuchsreihe zeigte hingegen eine höhere HSP27-Expression in PC3 im Vergleich zu LNCaP-Zellen⁸⁸. Mögliche Erklärungen für diese gegensätzlichen Ergebnisse sind die Verwendung unterschiedlicher Zell-Subpopulationen oder abweichende Zellkulturbedingungen. Einen wichtigen Einfluss scheint hierbei vor allem das Zellalter (Passagealter) zu haben. PCa-Zellen hohen Passagealters (über 80 Passagen ohne zusätzliche Manipulation) wiesen im Vergleich zu kurzpassagierten (unter 33 Passagen) eine deutlich höhere HSP27-Expression

auf⁸⁹. Dies kann einerseits Folge der vermehrten mechanischen Beanspruchung durch den Passageprozess an sich oder den erhöhten Bedarf an Chaperonen bedingt durch Zellalterungsprozesses sein. Da diese positive Korrelation zwischen der HSP27-Expressionsrate und fortschreitendem Zellalter bereits in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden konnte, wurden die Zellen im Rahmen dieser Arbeit nach maximal 25 Passagen verworfen⁹⁰.

Zur Charakterisierung möglicher regulatorischer Zusammenhänge zwischen dem HSP27 und dem AR wurden Knock-Down-Experimente in LNCaP-Zellen durchgeführt. Hier zeigte sich ein signifikanter Abfall des nachweisbaren AR-Proteins nach siRNA-vermitteltem HSP27-Knock-Down. Ursächlich hierfür könnte ein gesteigerter proteosomaler AR-Proteinabbau sein. Unterstützt wird diese Vermutung durch den Nachweis einer gesteigerten proteosomalen Aktivität in MCa-Zellen nach HSP27-Inhibition⁹¹. Der HSP-Knock-Down bewirkte eine gesteigerte Synthese des Proteasomenaktivators *Prohibitin*⁹¹. Dieses wiederum ist ein hochpotenter Repressor des Östrogen-Rezeptors (ER)⁹². Interessanterweise konnte diese repressorische Wirkung auch in Bezug auf den AR in PCa-Zellen nachgewiesen werden. Eine vermehrte *Prohibitin*-Expression führte zu einer AR-Repression, wohingegen eine Inhibition mit einer gesteigerten AR-Aktivität assoziiert war^{93,94}. Dies unterstreicht die Vermutung einer HSP27-vermittelten AR-Regulation über proteosomale Abbauege. Bewiesen wurde diese Hypothese in einer Versuchsreihe, welche durch Verwendung des Proteosomen-Inhibitors *MG-132*, den HSP27-Knock-Down-induzierten AR-Abbau unterdrücken konnte⁹⁵. Darüber hinaus konnte ein vermehrter AR-Abbau nach HSP27-vermittelter Ubiquitination gezeigt werden^{95,96}. HSP27-Silencing führte zu einer erhöhten Aktivität der *Ubiquitin E3 Ligase (Mdm2)*. Dieses Enzym bewirkte eine „Ubiquitin-Markierung“ des AR und somit ebenfalls einen gesteigerten proteosomalen Abbau^{95,96}.

Zur Untersuchung der funktionellen Aktivität des AR als Transkriptionsfaktor diente die Detektion von PSA-mRNA, da PSA zu den AR-abhängigen Genen zählt⁹⁷. Im klinischen Alltag dient es u.a. zur Verlaufskontrolle nach radikaler Prostatovesikulektomie¹⁰. In Korrelation zur erniedrigten AR-Proteinexpression, zeigte sich auch eine signifikante Reduktion der PSA-mRNA-Transkripte nach

HSP27-Knock-Down in LNCaP-Zellen. Dies spricht dafür, dass die funktionelle Aktivität des AR direkt durch das HSP27 modifizierbar ist. Für eine korrekte AR-Funktion ist, wie oben beschrieben, u.a. eine HSP27 abhängige AR-Dimerisierung, Translokation in den Nukleus sowie zinkfinger-vermittelte Bindung an AREs der DNA nötig. Dies erlaubt den Rückschluss auf eine HSP27-assoziierte nukleare Translokations- sowie ARE-Bindungsfähigkeit des AR. Diese Hypothese konnte in einer anderen Studie bestätigt werden⁹⁵. Später zeigte sich, dass dies durch eine HSP27-abhängige Aktivität der Protein-Kinase-1 bedingt zu sein scheint⁹⁸.

Neben diesen Mechanismen kann die Transkriptionsaktivität des AR durch verschiedene Co-Regulatoren modifiziert werden⁹⁶. Diese beeinflussen u.a. seine DNA-Bindungskapazität. Bis zum heutigen Tag wurden bereits über 150 solcher AR-Co-Regulatorproteine identifiziert⁹⁹. Ihre Wirkung entfaltet sich beispielsweise durch Histonmodifikationen im Rahmen von Methylierungsprozessen. Zu den im PCa überexprimierten Co-Regulatoren gehören u.a. die Mitglieder der Steroid-Rezeptor-Coaktivator-Familie (SRC 1-3)¹⁰⁰. Diese sind in der Lage, die AR-Aktivität zu steigern. Ihre Wirkung entfalten sie u.a. über eine Epidermal-growth-factor-Rezeptor (EGFR)-abhängige Signalkaskade¹⁰¹. Da in PCa-Zellen eine positive Co-Regulation zwischen dem HSP27 und dem EGF zu bestehen scheint, ist eine Beteiligung an diesem co-regulatorischen Regelkreis denkbar¹⁰². Darüber hinaus ist möglicherweise schon die Chaperonfunktion des HSP27 an sich wichtig für die Stabilität einiger Co-Regulatoren.

Eine weitere Beeinflussung der transkriptionellen Aktivität des AR kann auf post-translationaler Ebene durch Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung oder Methylierung erfolgen¹⁰³. In den meisten Studien wurde meist nur eine dieser Veränderungen auf die AR-Funktion untersucht. Es ist jedoch davon auszugehen, dass alle Prozesse auch parallel ablaufen können und sich dadurch gegenseitig beeinflussen. Die Rolle des HSP27 innerhalb dieser post-translationalen Modifikation ist noch nicht abschließend geklärt. Eine Beteiligung des HSP27 an Ubiquitinierungsprozessen ist jedoch wie oben beschrieben möglich.

Interessanterweise konnte nach HSP27-Knock-Down in LNCaP-Zellen neben der verringerten AR-Proteinexpression und Transkriptionsaktivität auch eine signifikant niedrigere AR-mRNA-Rate detektiert werden. Ein möglicher Grund dafür könnte ein verstärkter mRNA-Abbau durch die fehlende Wirkung HSP27-abhängiger mRNA-Stabilisatoren sein. Diese Wirkung kann u.a. durch die Interaktion mit Proteinen aus der Familie der RNA-Bindungsproteine (RBP) entstehen. RBPs sind Proteine, die durch bisher nicht vollständig verstandene Mechanismen zur Stabilisierung oder Destabilisierung der mRNA beitragen und so die Genexpression verstärken oder hemmen können¹⁰⁴. Oftmals, aber nicht immer, binden solche RBPs über spezifische Sequenzmotive an ihre Ziel-mRNA¹⁰⁵. Ein typisches Bindemotiv sind sogenannte AU-reiche-Bereiche der mRNA (AURE) (=RNA-Abschnitte, die besonders viele A/U Nukleotide enthalten, meist AUUUA)¹⁰⁶. Mindestens 8% der humanen Gene codieren für mRNAs, die solche AUREs enthalten¹⁰⁴. Hierzu gehört auch der AR¹⁰⁷. RBPs des AR sind u.a. das *human-antigen-R* (HuR) und der *AU-rich-binding factor-1* (AUF1)¹⁰⁷. Während HuR eher eine stabilisierende Wirkung auf die AR-mRNA zu haben scheint, wirkt AUF1 destabilisierend¹⁰⁸. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass es über eine HSP27-abhängige Signalkaskade (p38 MAP kinase→MK2→Hsp27→β-TrCP→AUF1) zu einem verstärkten Abbau des AUF1 kommt¹⁰⁹. Dies resultierte in einer gesteigerten mRNA-Stabilität. Daher könnte die hier gezeigte niedrigere AR-mRNA-Nachweisrate eventuell Folge eines vermehrten proteosomalen Abbaus, bedingt durch eine verstärkte AUF1-assoziierte mRNA-Instabilität durch fehlende HSP27-Wirkung sein. Interessanterweise können AUF1 und HuR sowohl simultan als auch kompetitiv an AUREs des AR binden¹¹⁰. Daher bewirkt der fehlende Abbau des AUF1 eventuell zusätzlich eine Verdrängung des HuR aus seiner AURE-Bindung, wodurch die destabilisierende Wirkung noch gesteigert wird. Diese Ergebnisse legen eine direkte Beeinflussbarkeit des AR durch das HSP27 nahe.

Um dies weiter zu prüfen, wurden vice-versa Experimente in PC3-Zellen durchgeführt. Nach erfolgreicher HSP27-Überexpression konnte in AR-negativen PC3-Zellen ein signifikanter Anstieg der AR-mRNA gemessen werden. Trotz des Nachweises einer gesteigerten Transkription konnte jedoch weder ein AR-Protein noch eine Steigerung der transkriptionellen Aktivität in Form von PSA-

Transkripten detektiert werden. Zum Ausschluss einer zeitabhängigen HSP27-AR-Regulation erfolgte die Etablierung einer stabilen PC3-HSP27-Zelllinie, welche HSP27 permanent überexprimiert. Auch in dieser war unabhängig von der Passageanzahl lediglich ein Anstieg der AR-mRNA-Rate nachweisbar. Mögliche Erklärungen für dieses Phänomen liegen beispielsweise in einer fehlenden oder nicht vollständigen Funktionalität des HSP27 begründet. Diese ist u.a. von seinem Phosphorylierungszustand an den 3 Serinresten (15, 78 und 82) bzw. Threonin 143 abhängig und wird in vivo durch verschiedene Kinasen (MAPK, Akt, MK2, u.a.) reguliert¹¹¹. Qi et al. konnten zeigen, dass für die Aktivierung des „pro-survival“ SRC→Akt→ERK-Signalweges der HSP27-Phosphorylierungsstatus (P-HSP27) entscheidend ist¹¹². Während es unter Verwendung einer phosphorylierten HSP27-Ser-78/82-Mutante zur Aktivierung der Signalkaskade kam, blieb dies unter der HSP27-Ser15-Mutante aus¹¹². Auch die Interaktion des HSP27 mit dem AR erfordert eine Phosphorylierung der Serine 78/82⁹⁵. Im Gegensatz dazu tritt die o.g. Beeinflussung der RBPs erst nach Phosphorylierung aller 3 Serinreste in Kraft¹⁰⁹. In den hier durchgeführten Überexpressionsversuchen wurde lediglich ein modifizierter HSP27-Vektor, jedoch keine Phosphomutante verwendet. Daher mag die endogene Erhöhung des modifizierten HSP27 zwar ausreichend für eine Steigerung der AR-mRNA-Synthese sein, jedoch nicht für eine anschließende Translation, da hierfür benötigte Co-Faktoren nur durch das P-HSP27 induziert werden können. Darüber hinaus ist besonders interessant, dass die Phosphorylierung der Serinreste 78/82 in einer AR und p38-abhängigen Weise gesteuert werden kann⁹⁵. Dies erlaubt die Vermutung, dass in PC3-Zellen dieser HSP27-Aktivierungsschritt auf Grund des fehlenden ARs nicht erfolgen und somit auch keine Protein-Co-Regulation in Kraft treten kann. Ebenfalls denkbar ist, dass PC3-Zellen im Laufe ihrer Entwicklung zusätzliche AR-inhibierender Signalkaskaden generiert haben. Zur Klärung des Phosphorylierungsstatus erfolgten einige Versuche, welche jedoch mangels geeigneter Phosphorylierungs-spezifischer Antikörper eingestellt werden mussten. Zur weiteren Überprüfung dieser Phosphorylierungs-Hypothese wäre eine Versuchsreproduktion unter Verwendung etablierter HSP27-Phosphomuten denkbar.

Zelluläre Signalkaskaden werden neben direkten Proteininteraktion über vielzählige weitere Mechanismen und Mediatoren gesteuert. Ein möglicher Mediator o.g. Kaskaden ist die Gruppe der MikroRNAs. Da MikroRNAs keine Kodierungsfunktion besitzen, beruht ihre Regulationsfunktion am ehesten auf der Beeinflussung der Stabilität und Translation anderer RNA-Moleküle mittels sogenannter „Gen-Silencing-Prozesse“¹¹⁶. Im Gegensatz zu den HSPs, welche erstmals 1962 durch Ritossa et al. untersucht wurden, befinden sich MikroRNAs erst seit Kurzem im Fokus der Wissenschaft¹¹¹. Ihre Funktion auf den Urogenitaltrakt ist daher noch weitgehend ungeklärt. Durch ihre unterschiedliche Expression in malignen Geweben und einfache Detektion haben sie jedoch bereits Einzug in die Tumormarkerforschung des Urothel-Ca gehalten¹¹³. Im PCa können sie über die Modulation des PTEN→AKT-Signalwegs möglicherweise die Entstehung eines CRPC beeinflussen¹¹⁴. Der kürzliche Nachweis einer Interaktion der MikroRNA miR-1 mit HSPs und folgender pro-apoptotischen Zellantwort, machte diese MikroRNA zum weiteren Zieltarget dieser Arbeit¹²⁷. Zu Beginn der Versuchsreihe lagen nach unserem Wissen noch keine Daten über die Interaktion der miR-1 mit dem HSP27 oder dem AR in PCa-Zellen vor. Überraschenderweise zeigte sich eine deutlich höhere miR-1-Expressionsrate in PC3 im Vergleich zu LNCaP-Zellen. Dies erlaubte die Vermutung einer negativen Korrelation zwischen dem HSP27 bzw. dem AR und der miR-1 und somit möglicher Co-Regulation der HSP27-AR-Interaktion. Zur weiteren Untersuchung dieser Hypothese wurde die miR-1-Rate in der stabilen PC3-HSP27-Zelllinie bestimmt. Hier zeigte sich eine deutlich geringere Anzahl an miR-1-Transkripten als in PC3-Zellen. Das gleiche Ergebnis konnte nach transienter HSP27-Überexpression in PC3-Zellen detektiert werden, was für eine HSP27-vermittelte Modulierbarkeit der miR-1 spricht. Dies unterstreicht die Vermutung einer negativen-Korrelation zwischen dem HSP27 und der miR-1 und macht diese MikroRNA zum potentiellen Co-Regulator der HSP27-AR-Interaktion. So könnte beispielsweise die miR-1 am AR-Gensilencing in PC3-Zellen und damit an der Androgen-AR-Signalkaskade beteiligt sein. Ob, und wenn ja, wie dies der Fall ist, muss durch weitere Versuchsreihen untersucht werden.

Für andere MikroRNAs konnte dies bereits aufgezeigt werden. Die miR125b verfügt über ein Androgen-Response-Element und kann so ein Androgen-

unabhängiges PCa-Zellwachstum begünstigen¹¹⁵. Auf Grund der verstärkten Expression der miR-1 in den Androgen-unabhängig wachsenden PC3-Zellen, scheint daher eine ähnliche Regulation denkbar. Eine Überexpression der miR21 in LNCaP-Zellen bewirkte eine Verschiebung des Proliferationsverhaltens hin zum Androgen-unabhängigen Wachstum¹¹⁶. Auf Grund des miR-1-Expressionsmusters (niedrig in Androgen-abhängigen LNCaP, hoch in Androgen-unabhängigen PC3) ist auch eine derartige Wirkweise denkbar. Ähnlich wie das HSP27 ist die miR27 in die Regulation des Prohibitins und somit proteosomale Abbaumechanismen involviert¹¹⁷. Eine Androgen-stimulierte miR27-Überexpression in LNCaP-Zellen führte über eine gesteigerte Prohibitin-Hemmung zu einem verminderten AR-Abbau¹¹⁷. Der Einfluss der miR-1 auf Prohibitin ist ungeklärt. Basierend auf o.g. Zusammenhang zwischen dem HSP27 und Prohibitin erlaubt die miR-1-Expressionsrate daher die Vermutung einer Beteiligung an diesem Regelkreis durch eine direkte Prohibitin-verstärkende Wirkung oder fehlende Prohibitin-Hemmung durch Beeinflussung der HSP27-Expression. Daher wäre es beispielsweise wissenswert, wie sich eine miR-1-Inhibition bzw. Überexpression auf die Expression des HSP27 sowie den AR auswirkt und ob nach simultaner HSP27-Überexpression und miR-1-Inhibition eventuell wieder ein AR-Protein in PC3-Zellen nachweisbar ist. Hierzu werden weitere Versuchsreihen folgen.

Parallel zur in vitro-basierten Erforschung HSP27-vermittelter Signalkaskaden wurde sein in vivo Einfluss beleuchtet. Hier zeigte sich, dass eine vermehrte Expression mit einer gesteigerten Progressions- sowie Metastasierungsneigung einherging¹¹⁸⁻¹²¹. Die höchste Expressionsrate war in Patienten mit metastasiertem PCa nachweisbar¹²²⁻¹²⁴. Diese Invasions-fördernde Wirkung liegt beispielsweise in einer verstärkten Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2) nach HSP27-Überexpression begründet¹²⁵. Alternativ konnte dies auch für MKK4 (MEK4) bzw. p38 MAPK assoziierte Signalwege gezeigt werden^{126,127}. Darüber hinaus konnte eine Interaktion mit Aktin, einem zentralen Strukturprotein des Zytoskeletts, nachgewiesen werden¹²⁸. HSP27 übt unter Stressbedingungen einen stabilisierenden Effekt auf das Aktinzytoskelett aus, kann aber als sogenanntes „Capping-Protein“ auch die Aktinpolymerisation beeinflussen^{129,130}. Dies ist wichtig für das zelluläre Remodelling und ermöglicht hierdurch Zelladhäsions- oder ablöseprozesse. Auf Grund der Assoziation mit einem

aggressiveren Tumorverhalten gilt es als unabhängiger Prädiktor eines schlechteren klinischen Outcomes^{131,132}.

Von großer Bedeutung für den klinischen Alltag ist die Entstehung von Resistenzmechanismen gegen medikamentöse Therapien. Es konnte gezeigt werden, dass das HSP27 mit verschiedenen Schlüsselstrukturen apoptotischer Signalwege interagieren kann^{119,133}. Resistenzmechanismen gegen Chemotherapeutika können beispielsweise über eine HSP27-vermittelte Hemmung des Cytochrom C und der Procaspase 9 oder veränderter Topoisomeres II Aktivität entstehen^{134,135}. Die Entstehung der Kastrationsresistenz ist jedoch nach wie vor nicht abschließend geklärt. Aktuell werden sowohl Androgen-abhängige als auch -unabhängige Mechanismen diskutiert. Zu den Androgen-abhängigen zählen u.a. Amplifikationen, Mutationen, und Isoformen des AR.

AR-Amplifikationen konnten in bis zu 80% der CRPC-Zellen nachgewiesen werden, wohingegen dieses Phänomen in hormonnaiven PCa-Zellen sehr selten ist¹³⁶⁻¹³⁸. Sie sind eventuell Folge eines gesteigerten Selektionsdruckes unter laufender ADT und bewirken durch eine Hypersensitivität der Zellen gegenüber sehr geringen Androgenspiegeln einen weiteren Tumorprogress^{139,140}.

Neben Amplifikationen können auch Mutationen innerhalb des AR-Genes auftreten. Für verschiedene Punktmutationen konnte eine gesteigerte AR-Sensitivität nachgewiesen werden¹⁴¹⁻¹⁴⁹. Auch der Austausch einer einzigen Aminosäure innerhalb der 5-alpha-Reduktase bewirkt bereits eine massive Zunahme ihrer Aktivität, wodurch es zu einem höheren DHT-Angebot bei niedrigem Testosteronlevel kommen kann^{150,151}.

Darüber hinaus konnten verschiedene AR-Isoformen identifiziert werden¹⁵²⁻¹⁵⁷. Dies sind Splice-Varianten des AR, welche durch einen Verlust der LBD konstitutiv aktiv sein können. Ihre genaue Bedeutung ist allerdings noch nicht abschließend geklärt. Bei Patienten mit metastasierten Tumoren konnte jedoch eine deutlich höhere Anzahl solcher Isoformen nachgewiesen werden¹⁵⁸. Zusätzlich scheinen sie die Entstehung der Kastrationsresistenz zu fördern und sind daher mit einer schlechteren Prognose assoziiert¹⁵⁹. Am Besten erforscht ist bisher die ARV7-Variante. Diese besitzt keine LBD und ist daher konstitutiv aktiv^{154,160}. Sie kann so sowohl AR-abhängige als auch -unabhängige Gene beeinflussen^{142,148}. Die

ARV8-Variante hingegen besitzt keine DBD und verbleibt deshalb im Zytoplasma¹⁵⁷. Hier begünstigt sie die Phosphorylierung des AR und so dessen Aktivität¹⁵⁷.

Neben Veränderungen im AR selbst, konnte auch eine veränderte Expression von AR-Co-Aktivatoren bzw. Repressoren in Patienten nachgewiesen werden¹⁶¹⁻¹⁷¹. Interessanterweise konnte u.a. die in vitro gezeigte HSP27 vermittelte Interaktion des AR mit der Steroid-Rezeptor-Coaktivator-Familie (SRC 1-3) (siehe oben) auch in vivo bestätigt werden¹⁶⁷.

Zu den Androgen-unabhängigen alternativen Regelkreisen gehören, neben vielen anderen, die Wachstumsfaktor vermittelten Signalwege^{172,177}. Wachstumsfaktoren (*growth factors*) sind eine große Gruppe von Proteinen, die als „Signal-Übermittler“ fungieren. Ihre Wirkweise ist individuell verschieden. Der *Epidermal Growth Factor Rezeptor* (EGFR) kann zur AR-Stabilität und dessen Aktivierung beitragen und so ein Androgen-unabhängiges Wachstum fördern¹⁷⁸⁻¹⁸². Der *Insulin-like-growth-factor-1-Rezeptor* (IGF-1R) und der *Interleukin-6 Rezeptor* (IL-6R) kontrollieren einige für das Zellüberleben wichtige Signalkaskaden, wie den P13K→AKT- oder MAP-Kinaseweg, und wirken so wachstumsfördernd^{183,184}. Andere, wie der *Insulin-like growth factor* (IGF) oder der *Keratinocyten-Wachstumsfaktor* (KGF), können direkt an den AR binden und so aktivieren^{176,185}. Im CRPC spielt vor allem der Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) eine wichtige Rolle. Seine Expression steht in Korrelation zu einem höheren PCa-Erkrankungsrisiko, höherem Tumorstadium und vermehrter Progressionsneigung¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Bemerkenswerterweise konnte gezeigt werden, dass es nach HSP27-Überexpression zu einer gesteigerten IGF-1-vermittelten Phosphorylierung von ERK, p90RSK sowie AKT kommt¹⁸⁹. Dies bewirkte eine Stabilisierung des Bad/14-3-3-Komplexes und somit eine geringere Apoptose¹⁸⁹.

Die zunehmende Evidenz, die Ergebnisse dieser Arbeit eingeschlossen, dass HSP27 durch die Beteiligung an Androgen-abhängigen als auch -unabhängigen Signalkaskaden an der CRPC-Genese beteiligt zu sein scheint, machte es zum Ansatzpunkt pharmakologischer Entwicklungen.

Apatorsen (OGX-427 (OncoGenex Pharmaceuticals, Bothell, WA, USA)) ist ein HSP27-Inhibitor der 1x wöchentlich intravenös verabreicht wird. Die erhoffte Wirkweise dieses Pharmakons liegt in einer Durchbrechung der zellulären Abwehrmechanismen des CRPC und somit Überwindung der Therapieresistenz. Im Mausmodell war die Verwendung von OGX-427 mit einer Reduktion der Tumormetastasierung assoziiert¹⁹⁰. In der anschließenden Phase I Studie konnte eine Reduktion der zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) nachgewiesen werden¹⁹¹. Aktuell befindet sich *Apatorsen* in einer Phase II Studie (NCT01120470) in Kombination mit Prednisolon. Zielstellung ist eine Progressionsfreiheit in mind. 20% der Fälle. Eingeschlossen wurden 74 Patienten. Die vorläufigen Ergebnisse scheinen vielversprechend. Bisher zeigte sich ein Therapiebenefit in Bezug auf die Progressionsfreiheit (nach 12 Wochen: 71% im OGX-427 vs. 31% im Kontrollarm), des PSA-Abfalls (um mindestens 50%: 41% vs 20%) sowie Reduktion der CTCs¹⁹². Die Kombination aus OGX-427-Prednisolon-Abirateron wird gegenwärtig in einer anderen Phase II Studie getestet (NCT01681433).

Dies unterstreicht die essentiellen Funktionen von HSP27 als möglichem Vermittler in der CRPC-Genese. Über welche weiteren Signalkaskaden es seine Wirkung entfaltet, und ob sich sein Einsatz im klinischen Alltag bewährt, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Darüber hinaus bietet die weitere Charakterisierung der miR-1 als möglichem Co-Regulator der HSP27-AR-Signalkaskade oder potentiell eigenständigem Interakteur der CRPC-Genese Ansatzpunkt für weitere spannende Versuchsreihen.

Es sei angemerkt, dass die Eigenschaften des hier verwendeten Tumorzellmodells nicht zwingend mit den *in vivo* Tumoreigenschaften übereinstimmen müssen. Dies liegt u.a. in der Uniformität der Zelllinien begründet. Wichtige Tumoreigenschaften wie die Interaktion verschiedener Zellsubpopulationen (im PCa beispielsweise Epithelzellen, Fibroblasten und neuroendokrine Zellen) sowie endokrinologische oder immunologische Prozesse eines Gesamtorganismus können nicht abgebildet werden. Dennoch haben sich Tumorzellmodelle über Jahre in der Erforschung grundlegender Karzinomeigenschaften bewährt und finden auch im PCa weitläufig Verwendung.

6. Zusammenfassung

Der Androgen-Rezeptor ist zentraler Regulator der PCa-Zelle und maßgeblich an der Entwicklung eines kastrationsresistenten Tumorstadiums beteiligt. Daher sollten mögliche Interaktionspartner der Androgen-Rezeptor-Achse identifiziert und deren regulatorischer Einfluss untersucht werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte einerseits eine positive Korrelation zwischen dem AR und dem HSP27 in PCa-Zellen als auch eine direkte Beeinflussbarkeit des AR durch das HSP27 gezeigt werden. In den Androgen-abhängigen LNCaP-Zellen war ein höheres endogenes HSP27-Level als in den Androgen-unabhängigen PC3-Zellen nachweisbar. Ein gezielter HSP27-Knock-Down in LNCaP-Zellen führte zu einer signifikanten Reduktion der AR-mRNA als auch des AR-Proteins. Darüber hinaus zeigte sich eine Reduktion der transkriptionellen Aktivität des AR in Form einer verringerten Anzahl an PSA-Transkripten. In Übereinstimmung damit führte eine HSP27-Überexpression in PC3-Zellen zu einer Re-Expression der AR-mRNA, obgleich kein funktionelles AR-Protein nachweisbar war. Auch die transkriptionelle Aktivität blieb unbeeinflusst.

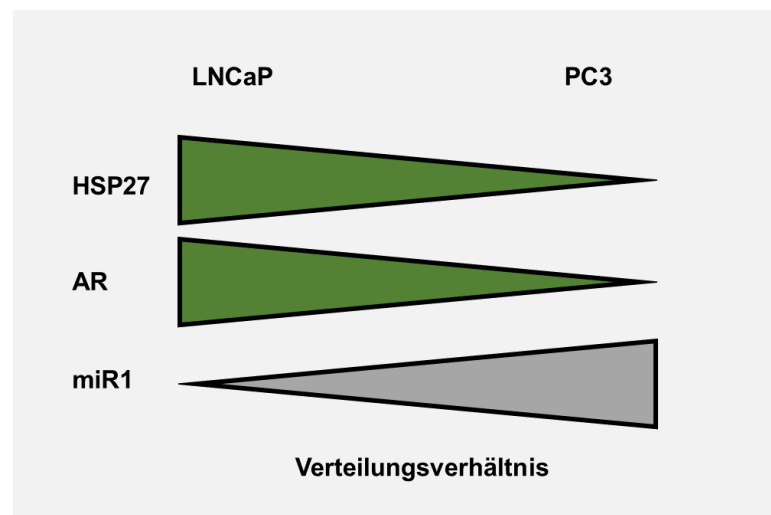


Abbildung 16: vereinfachte schematische Darstellung des Verteilungsverhältnisses des AR, des HSP27 und der miR-1 in LNCaP und PC3-Zellen

AR = Androgen-Rezeptor; HSP27 = Hitzeschockprotein 27; miR-1 = MikroRNA miR-1

Als potentieller Modulator dieser AR-HSP27-Interaktion konnte die MikroRNA miR-1 identifiziert werden. Diese stand in negativer Korrelation zum AR und dem HSP27 in den verwendeten PCa-Zelllinien (Abbildung 16). So konnte in LNCaP-Zellen mit hohem endogenen HSP27-Level eine niedrigere miR-1-Nachweisrate als in den weniger HSP27 exprimierenden PC3-Zellen nachgewiesen werden. Ein Beleg für die direkte Interaktion des HSP27 mit der miR-1 ist die Tatsache, dass in PC3-HSP27-Zellen eine deutlich niedrige miR-1-Expression als in PC3-Zellen nachweisbar war.

Abschließend bestätigen diese Daten die direkte Beteiligung des HSP27 und der miR-1 an der AR-Signalkaskade und die direkte Beeinflussbarkeit des AR durch HSP27. Dies unterstreicht die potentielle pharmakologische Einsatzfähigkeit beider Targets in der Therapie des Prostatakarzinoms.

7. Veröffentlichungen im Rahmen der Dissertation

Paper:

Stope MB, **Schubert T**, Staar D, Rönna C, Streitbörgel A, Kroeger N, Kubisch C, Zimmermann U, Walther R, Burchardt M. (2012): *Effect of the heat shock protein HSP27 on androgen receptor expression and function in prostate cancer cells*. World J Urol. 30(3):327-31.

Stope MB, Stender C, **Schubert T**, Peters S, Weiss M, Ziegler P, Zimmermann U, Walther R, Burchardt M. (2014): *Heat-shock protein HSPB1 attenuates microRNA miR-1 expression thereby restoring oncogenic pathways in prostate cancer cells*. Anticancer Res. 34(7):3475-80.

Poster:

Schubert T, Staar D, Rönna C, Dobkowitz L, Tanovic´ E, Kubisch C, Zimmermann U, Walther R, Burchardt M, Stope MB

Hitzeschockprotein 27 als Modulator der Prostatakarzinom- Progression

- 3. Symposium „Urologische Forschung der DGU“, 2011 Jena

8. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
A	Adenosin
A. bidest	Aqua bidestillata, doppelt destilliertes Wasser
ad	bis zu
ADT	Antiandrogene Therapie
AF-1 + AF-2	Liganden-unabhängige Transkriptionsaktivierungseinheit
AR	Androgen-Rezeptor
ARE	Androgen-Rezeptor Response Elements
ATP	Adenosintriphosphat
AUF1	AU-rich-binding factor-1
AURE	RNA-Abschnitte die besonders viele A/U Nukleotide enthalten
BCa	Blasenkrebs
BPH	Benige Prostatahyperplasie
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1- propansulfonat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRPC	kastrationsresistentes Prostatakarzinom
CTC	zirkulierende Tumorzellen
Da	Dalton
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHEA	Dehydroepiandrosteron

DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Exon
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal-growth-factor-Rezeptor
ER	Östrogen-Rezeptor
et al.	und andere
FCS	Fetales Kälberserum
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
g	Gramm
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone, Gonadotropin freisetzendes Hormon
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HSP	Hitzeschockprotein
HSP27	Hitzeschockprotein 27
HuR	Human-antigen-R
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
ISUP	International Society of Urological Pathology
k	Kilo
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LH	Luteinisierendes Hormon
LNCaP	Prostatakarzinom-zelllinie isoliert aus Lymphknotenmetastasen

M	molar
m	Milli-
MCa	Mammakarzinom
min	Minute(n)
miR-1	MikroRNA miR-1
MOPS	3-morpholinopropansulfonsäure
mPCa	metastasiertes Prostatakarzinom
mRNA	messenger RNA, Boten-Ribonukleinsäure
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NLS	Kernlokalisationssequenz
NTD	N-terminale Domäne
P	Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PC-3	Androgen unabhängige Prostatakarzinomzelllinie
PCa	Prostatakrebs
PCR	Polymerasekettenreaktion
Ponceau S	3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(sulfo-phenylazo)phenylazo]-2,7-naphthalindisulfonsäure
PR	Progesteron-Rezeptor
PSA	Prostata-spezifisches-Antigen
RIPA-Puffer	Radioimmunopräzipitationsassay-Puffer
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPLP0	Ribosomales Protein P0
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI-Medium	Roswell-Park-Memorial-Institute-Medium
rt	real time
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SBG	Sexualhormon-bindende Globulin
SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard error of the mean
siRNA	Small interfering RNA

SRC1-3	Steroid-Rezeptor-Coaktivator-Familie
T	Thymidin
TH	Threonin
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat
TAU	Transkriptionsaktivierungseinheit
TBS	Tris buffered saline, Tris gepufferte Salzlösung
TBS-T	TBS mit 0,1 % Tween 20
TURP	Transurethrale Resektion der Prostata
USA	United States of America
UV	Ultra violett

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „*Regulation des Androgen-Rezeptors und der MikroRNA miR-1 durch das Hitzeschockprotein HSP27 in Prostatakarzinomzellen*“ selbstständig verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, habe ich in jedem Fall durch Angabe der Quelle, als Entlehnung kenntlich gemacht. Die hier beschriebenen Methoden sind von mir selbstständig ausgeführt worden und die erhobenen Daten nach bestem Wissen und Gewissen ausgewertet worden.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden. Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Tübingen, den

Tina Schubert

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Tina Schubert
 Geburtsdatum: 18.10.1985
 Geburtsort: Rodewisch
 Nationalität: Deutsch

Schulbildung:

2008 - 2014 Ernst-Moritz-Arndt Universität, Greifswald
 1996 - 2004 Johann-Heinrich-Pestalozzi Gymnasium, Rodewisch
 1992 - 1996 Friedrich-Schiller Grundschule, Rodewisch

Beruflicher Werdegang:

Seit 2015 Facharztausbildung am Universitätsklinikum Tübingen,
 Abteilung für Urologie

2013 Ausbildung im praktischen Jahr:
Urologie: Columbia University, Department of Urology,
 New York Presbyterian Hospital, USA
Chirurgie: Klinikum Bogenhausen, München
Innere Medizin: Klinikum Bogenhausen, München

2013 Forschungsaufenthalt am Weill Cornell Medical
 Campus New York Presbyterian Hospital, USA

2008 – 2014 Humanmedizinstudium Ernst-Moritz-Arndt Universität,
 Greifswald

2007 - 2008 Ausbildung zur MTA in der Gemeinschaftspraxis
 Zollmann & Kollegen, Jena

2007 Medizinisches Pflegepraktikum, Universitätsklinikum
 Jena Abteilung für Urologie, Jena

2005 - 2006 Operationspflegehelferin in der Gemeinschaftspraxis
 Ullmann & Kollegen, Erfurt

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen aufrichtigen Dank allen nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsarbeit niemals möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt vor allem Herrn Professor M. Burchardt für die Überlassung des Themas, persönliche Betreuung sowie fachliche Kompetenz und Unterstützung auch nach Beendigung dieser Arbeit. Die Zusammenarbeit mit Ihnen war Ausgangspunkt für meinen beruflichen Werdegang und wäre ohne Ihre Unterstützung niemals möglich gewesen. Die zahlreichen Gespräche werden mir immer als bereichernder und konstruktiver Austausch in Erinnerung bleiben. Dafür möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken.

Nicht weniger dankbar bin ich Herrn Professor R. Walther für all seine fachlichen Ratschläge, stetige Inspiration für neue Projekte und vor allem menschliche Kompetenz. Die regelmäßigen produktiven Treffen bei Kaffee und Keksen sowie die jährliche Grillfeier werde ich stets in wertvoller Erinnerung behalten.

Kaum in Worte zu fassen ist die Dankbarkeit, welche ich Herrn Dr. M. Stope aussprechen möchte. Durch seine tägliche Betreuung im Labor bis zu später Stunde hat er maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Allein seiner Geduld und fachlichen Expertise ist es zu verdanken, dass all diese Daten erhoben und in verwertbare Form gebracht werden konnten. Eine bessere Betreuung kann man sich als Doktorand nicht wünschen.

Auch Frau A. Brandenburg gilt mein tiefster Dank, da sie stets mit der nötigen Strenge auf die sachgemäße Ausführung der Versuche geachtet hat, ohne dass dabei der Spaß an der Arbeit verloren ging. All deine Unterstützung werde ich dir nie vergessen. Du bist die beste TA, die ich hätte haben können

Ein großer Dank gilt auch alle anderen Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Forschungslabors, welche durch viele kleine Hilfestellungen zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Maßgeblich verantwortlich für mein seelisches Wohl während meiner Laborarbeit waren meine guten Freunde Christoph Aderkast, Stefan Liedtke, Sarah Kreuz und Steven Drahn. Ich danke euch sehr für all die produktiven und schönen Stunden, die wunderbaren gemeinsamen Frühstücke sowie unzähligen Wochenenden und Nächte im Labor. Dank eurer Unterstützung ist es gelungen, alle Widerstände und Misserfolge mit einem Lächeln zu ertragen und letztlich zu überwinden. Besonders dir, lieber Christoph, danke ich für deine aufrichtige Freundschaft. Du bist ein ganz wunderbarer Mensch.

Meiner besten Freundin Angelika Schmeißer danke ich für all ihr Verständnis dafür, dass ich mehr Zeit mit Prostatazellen als mit ihr verbracht habe und sie es mir nie übel genommen hat. Ich danke dir für jede Sekunde deiner Zeit, in der du tröstende Worte für mich gefunden hast, wenn etwas nicht geklappt hat. Ich danke dir, dass du immer an meiner Seite bist.

Abschließend danke ich meiner Familie, die mich immer unterstützt und ermutigt hat, obwohl meine Liebe und Leidenschaft für die Urologie sicher nicht leicht zu verstehen ist. Vor allem meinen Eltern und meinem Opa danke ich für ihren unendlichen Glauben an mich und möchte Ihnen daher diese Arbeit aus tiefstem Herzen widmen.

“Thanks to all my personal giants for bringing me all this way”

Tina Schubert

12. Literaturverzeichnis

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014
2. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013
3. Humphrey PA. Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. *Histopathology*. 2012
4. R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal Cancer statistics, 2016 *CA Cancer J Clin* 2016
5. Statistisches Bundesamt (2014) Krebsdaten des Prostakzinoms. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden
6. Statistisches Bundesamt (2002) Kosten nach Krankheitsarten. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden
7. Cronin P, Kirkbride B, Bang A, Parkinson B, Smith D, Haywood P. Long-term health care costs for patients with prostate cancer: A population-wide longitudinal study in New South Wales, Australia. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2016
8. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA; Grading Committee. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol*. 2016
9. Epstein JI, Pizov G, Walsh P.C, Correlation of pathologic findings with progression after radical retropubic prostatectomy. *Cancer*1993
10. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, Schmid HP, Van der Kwast T, Wiegel T, Zattoni F, Heidenreich A. EAU guidelines on

- prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol*. 2011
11. Samaratunga H, Delahunt B, Gianduzzo T, Coughlin G, Duffy D, LeFevre I, Johannsen S, Egevad L, Yaxley J. The prognostic significance of the 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for prostate cancer. *Pathology*. 2015
 12. Vamsi P, Rajen G, Kate P, Ximing JY. Neuroendocrine differentiation of prostate cancer: a review, *Am J Clin Exp Urol*. 2014
 13. Studer UE, Hauri D, Hanselmann S, et al. Immediate versus deferred hormonal treatment for patients with prostate cancer who are not suitable for curative local treatment: results of the randomized trial SAKK 08/88. *J Clin Oncol* 2004
 14. Gakis G, Boorjian SA, Briganti A, Joniau S, Karazanashvili G, Karnes RJ, Mattei A, Shariat SF, Stenzl A, Wirth M, Stief CG. The role of radical prostatectomy and lymph node dissection in lymph node-positive prostate cancer: a systematic review of the literature. *Eur Urol*. 2014
 15. Helpap B., Köllermann, J. Undifferentiated carcinoma of the prostate with small cell features: immunohistochemical subtyping and reflections on histogenesis. *Virchows Arch*. 1999
 16. Helpap, B., Köllermann, J. and Oehler, U. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinomas: histogenesis, biology, clinical relevance, and future therapeutical perspectives. *Urol Int*. 1999
 17. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, Cumberbatch MG, De Santis M, Fossati N, Gross T, Henry AM, Joniau S, Lam TB, Mason MD, Matveev V, Moldovan PC, van den Bergh RC, Van den Broeck T, van der Poel HG, van der Kwast TH, Rouvière O, Schoots IG, Wiegel T, Cornford P. EAU-

- ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol*. 2016
18. Lindzey J, Kumar MV, Grossman M, et al. Molecular mechanisms of androgen action. *Vitam Horm* 1994
19. Shaneyfelt T, Husein R, Bublely G, Mantzoros CS. Hormonal predictors of prostate cancer: a meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2000
20. Heinlein CA1, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev*. 2004
21. Lorente D, Mateo J, Zafeiriou Z, Smith AD, Sandhu S, Ferraldeschi R, de Bono JS. Switching and withdrawing hormonal agents for castration-resistant prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2015
22. Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, el-Awady MK, Wilson EM, French FS 1995 Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev* 1995
23. Lumbroso S, Lobaccaro JM, Vial C, Sassolas G, Ollagnon B, Belon C, Pouget J, Sultan C 1997 Molecular analysis of the androgen receptor gene in Kennedy's disease. Report of two families and review of the literature. *Horm Medline* 1997
24. Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Dahl D, Brufsky A, Talcott J, Hennekens CH, Kantoff PW 1997 The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci* 1997
25. Prescott J, Coetzee GA 2006 Molecular chaperones throughout the life cycle of the androgen receptor. *Cancer Lett* 2006
26. Arun A. Azad, Amina Zoubeydi, Martin E. Gleave, Kim N. Chi. Targeting heat shock proteins in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Nature Reviews Urology* 2015

27. Albany C, Hahn NM. Heat shock and other apoptosis-related proteins as therapeutic targets in prostate cancer. *Asian J Androl.* 2014
28. Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA Cancer J Clin* 1972
29. Wassersug RJ1, Johnson TW. Modern-day eunuchs: motivations for and consequences of contemporary castration. *Perspect Biol Med.* 2007
30. Morote, J., et al. Individual variations of serum testosterone in patients with prostate cancer receiving androgen deprivation therapy. *BJU Int,* 2009
31. Pickles, T., et al. Incomplete testosterone suppression with luteinizing hormone-releasing hormone agonists: does it happen and does it matter? *BJU Int,* 2012
32. Klotz, L., et al. MP74-01 Nadir Testosterone on ADT predicts for time to castrate resistant progression: A secondary analysis of the PR-7 intermittent vs continuous ADT trial. *J Urol.* 2014
33. Crawford ED, Hou AH. The role of LHRH antagonists in the treatment of prostate cancer. *Oncology (Williston Park)* 2009
34. Grossmann M, Cheung AS, Zajac JD. Androgens and prostate cancer; pathogenesis and deprivation therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013
35. Harris WP, Mostaghel EA, Nelson PS, et al. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat Clin Pract Urol* 2009
36. Armandari I, Hamid AR, Verhaegh G, Jack Schalken J, Intratumoral steroidogenesis in castration-resistant prostate cancer: a target for therapy. *Prostate Int.* 2014

37. Sharifi N. corresponding Mechanisms of Androgen Receptor Activation in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Endocrinology*. 2013
38. Stein MN, Goodin S, DiPaola RS, Abiraterone in Prostate Cancer: a new angle to an old problem, *Clin Cancer Res*. 2013
39. Bono JS et al. Abiraterone and Increased Survival in Metastatic Prostate Cancer, *N Engl J Med*. 2011
40. Ryan et al., Randomized Phase 3 Trial of Abiraterone Acetate in Men with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer and No Prior Chemotherapy, *N Engl J Med* 2014
41. Schalken J, Fitzpatrick M; Enzalutamide: targeting the androgen signalling pathway in metastatic castration-resistant prostate cancer, *BJU Int*. 2016
42. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin ME, Sternberg CN, Miller K, de Wit R, Mulders P, Chi KN, Shore ND, Armstrong AJ, Flaig TW, Fléchon A, Mainwaring P, Fleming M, Hainsworth JD, Hirmand M, Selby B, Seely L, de Bono JS; Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med*. 2012
43. Cookson MS, Roth BJ, Dahm P, et al. Castration-resistant prostate cancer: AUA Guideline. *J Urol* 2013
44. Hobisch A, Culig Z, Radmayr C, Bartsch G, Klocker H, et al. (1995) Distant metastases from prostatic carcinoma express androgen receptor protein. *Cancer Res* 1995
45. Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, Tanner M, Keinänen R, Palmberg C, Palotie A, Tammela T, Isola J, Kallioniemi OP. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet*. 1995.

46. Liu W, Xie CC, Zhu Y, et al. Homozygous deletions and recurrent amplifications implicate new genes involved in prostate cancer. *Neoplasia* 2008
47. Heemers HV, Tindall DJ. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev* 2007
48. Mohler JL, Gregory CW, Ford OH 3rd, et al. The androgen axis in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2004
49. Montgomery RB, Mostaghel EA, Vessella R, et al. Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. *Cancer Res* 2008
50. Lindquist S and Craig EA: The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1998.
51. Le Bret T, Watson RW and Fitzpatrick JM: Heat shock proteins: their role in urological tumours. *J Urolog* 2003
52. Khalil AA, Kabapy NF, Deraz SF and Smith C: Heat shock proteins in oncology: diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochim Biophys Acta* 2011
53. Jego G, Hazoumé A, Seigneuric R and Garrido C: Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett.* 2013
54. Li Z, Srivastava P. Heat-shock proteins. *Curr Protoc Immunol.* 2004
55. Li Z, Zhao X, Wei Y. Regulation of apoptotic signal transduction pathways by the heat shock proteins. *Sci China C Life Sci.* 2004
56. Ciocca D.R., Calderwood S. K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones.* 2005

57. So A., Hadaschik B, Sowery R, Gleave M. The Role of Stress Proteins in Prostate Cancer. *Curr Genomics*. 2007
58. Katsogiannou M, Andrieu C, Rocchi P, Heat shock protein 27 phosphorylation state is associated with cancer progression, *Front Genet*. 2014
59. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993
60. Ludwig N, Leidinger P, Becker K, Backes C, Fehlmann T, Pallasch C, Rheinheimer S, Meder B, Stähler C, Meese E, Keller A. Distribution of miRNA1 expression across human tissues. *Nucleic Acids Res*. 2016
61. Filipowicz W1, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008
62. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007
63. Wienholds E, Plasterk RH. MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett*. 2005
64. Han C, Yu Z, Duan Z, Kan Q. Role of microRNA-1 in human cancer and its therapeutic potentials. *Biomed Res Int*. 2014
65. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005
66. He L, He X, Lim LP, de SE, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007
67. Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, Dang CV, Thomas-Tikhonenko A, Mendell JT. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat. Genet*. 2008

68. Thieu W, Tilki D, deVere White RW, Evans CP. The role of microRNA in castration-resistant prostate cancer. *Urol Oncol*. 2014
69. Hudson RS, Yi M, Esposito D, Watkins SK, Hurwitz AA, Yfantis HG, Lee DH, Borin JF, Naslund MJ, Alexander RB, Dorsey TH, Stephens RM, Croce CM, MicroRNA-1 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in human prostate cancer. *Nucleic Acids Res*. 2012
70. Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H, Chen G, Wang Z. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med*. 2007
71. Nasser MW, Datta J, Nuovo G, Kutay H, Motiwala T, Majumder S, Wang B, Suster S, Jacob ST, Ghoshal K. Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *J. Biol. Chem*. 2008
72. Chao Hu, Shi-Qiang Shen, Zhong-Hui Cui, Zu-Bing Chen, and Wei Li. Effect of microRNA-1 on hepatocellular carcinoma tumor endothelial cells. *World J Gastroenterol*. 2015
73. Xu C, Lu Y, Pan Z, Chu W, Luo X, Lin H, Xiao J, Shan H, Wang Z, Yang B. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J Cell Sci*. 2007
74. Lim DJ, Liu XL, Sutkowski DM, Braun EJ, Lee C, Kozlowski JM. Growth of an androgen-sensitive human prostate cancer cell line, LNCaP, in nude mice. *Prostate*. 1993
75. Ben-Josef E, Yang SY, Ji TH, Bidart JM, Garde SV, Chopra DP, Porter AT, Tang DG. Hormone-refractory prostate cancer cells express functional follicle-stimulating hormone receptor (FSHR). *J Urol*. 1999

76. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 2013
77. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones.* 2005
78. Tóth ME, Szegedi V, Varga E, Juhász G, Horváth J, Borbély E, Csibrány B, Alföldi R, Lénárt N, Penke B, Sántha M. Overexpression of Hsp27 ameliorates symptoms of Alzheimer's disease in APP/PS1 mice. *Cell Stress Chaperones.* 2013
79. Zourlidou A, Payne Smith MD, Latchman DS. HSP27 but not HSP70 has a potent protective effect against alpha-synuclein-induced cell death in mammalian neuronal cells. *Parkinson: J Neurochem.* 2004
80. Lemieux P, Oesterreich S, Lawrence JA, Steeg PS, Hilsenbeck SG, Harvey JM, Fuqua SA. The small heat shock protein hsp27 increases invasiveness but decreases motility of breast cancer cells. *Invasion Metastasis.* 1997
81. Langdon SP, Rabiasz GJ, Hirst GL, King RJ, Hawkins RA, Smyth JF, Miller WR. Expression of the heat shock protein HSP27 in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 1995
82. Morino M, Tsuzuki T, Ishikawa Y, Shirakami T, Yoshimura M, Kiyosuke Y, Matsunaga K, Yoshikumi C, Saijo N. Specific expression of HSP27 in human tumor cell lines in vitro. *In Vivo.* 1997
83. Wang XW, Shi XH, Tong YS, Cao XF. The Prognostic Impact of Heat Shock Proteins Expression in Patients with Esophageal Cancer: A Meta-Analysis. *Yonsei Med J.* 2015

84. Conroy, Sasieni, Amin, Wang, Smith, Fentiman. Antibodies to heat-shock protein 27 are associated with improved survival in patients with breast cancer. *British Journal of Cancer* 1998
85. Bubendorf, Kolmer, Kononen, Koivisto, Mousses, Chen. Hormone therapy failure in human prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissue microarrays. *Journal of National Cancer Institute* 1999
86. Oesterreich S, Hilsenbeck SG, Ciocca DR, Allred DC, Clark GM, Chamness GC, Osborne CK, Fuqua SA. The small heat shock protein HSP27 is not an independent prognostic marker in axillary lymph node-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 1996
87. Zoubeydi A, Zardan A, Beraldi E, Fazli E, Sowery R, Rennie P, Nelson C, Gleave M. Cooperative interactions between androgen receptor (AR) and heat-shock protein 27 facilitate AR transcriptional activity. *Cancer Res* 2007
88. Cornford PA, Dodson AR, Parsons KF, Desmond AD, Woolfenden A, Fordham M, Neoptolemos JP, Ke Y, Foster CS. Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res.* 2000
89. Kim SS, Cho HJ, Kang JY, Kang HK, Yoo TK. Inhibition of androgen receptor expression with small interfering RNA enhances cancer cell apoptosis by suppressing survival factors in androgen insensitive, late stage LNCaP cells. *ScientificWorldJournal.* 2013
90. Tower J. Hsps and Aging. *Trends Endocrinol Metab.* 2009 Jul; 20(5) 10.1016
91. Nagaraja GM1, Kaur P, Neumann W, Asea EE, Bausero MA, Multhoff G, Asea A. Silencing hsp25/hsp27 gene expression augments proteasome activity and increases CD8+ T cell-mediated tumor killing and memory responses *Cancer Prev Res (Phila).* 2012

92. He B, Feng Q, Mukherjee A, Lonard DM, DeMayo FJ, Katzenellenbogen BS, Lydon JP, O'Malley BW. A repressive role for prohibitin in estrogen signaling. *Mol Endocrinol.* 2008
93. Dart DA, Brooke GN, Sita-Lumsden A, Waxman J, Bevan CL. Reducing prohibitin increases histone acetylation, and promotes androgen independence in prostate tumours by increasing androgen receptor activation by adrenal androgens. *Oncogene.* 2012
94. Gamble SC, Chotai D, Odontiadis M, Dart DA, Brooke GN, Powell SM, Reebye V, Varela-Carver A, Kawano Y, Waxman J, Bevan CL. Prohibitin, a protein downregulated by androgens, represses androgen receptor activity. *Oncogene.* 2007
95. Zoubeidi A, Zardan A, Beraldi E, Fazli L, Sowery R, Rennie P, Nelson C, Gleave M. Cooperative interactions between androgen receptor (AR) and heat-shock protein 27 facilitate AR transcriptional activity. *Cancer Res.* 2007
96. Linn DE, Yang X, Xie Y, Alfano A, Deshmukh D, Wang X, Shimelis H, Chen H, Li W, Xu K, Chen M, Qiu Y. Differential regulation of androgen receptor by PIM-1 kinases via phosphorylation-dependent recruitment of distinct ubiquitin E3 ligases. *J Biol Chem.* 2012
97. Jia L, Coetzee GA. Androgen receptor-dependent PSA expression in androgen-independent prostate cancer cells does not involve androgen receptor occupancy of the PSA locus. *Cancer Res.* 2005
98. Hassan S, Biswas MH, Zhang C, Du C, Balaji KC. Heat shock protein 27 mediates repression of androgen receptor function by protein kinase D1 in prostate cancer cells. *Oncogene.* 2009
99. Matsumoto T, Sakari M, Okada M, Yokoyama A, Takahashi S, Kouzmenko A, Kato S. The androgen receptor in health and disease. *Annu Rev Physiol.* 2013

100. Zhou HJ, Yan J, Luo W, Ayala G, Lin SH, Erdem H, Ittmann M, Tsai SY, Tsai MJ. SRC-3 is required for prostate cancer cell proliferation and survival. *Cancer Res.* 2005
101. Tatarov O, Edwards J. The Role of Src Family Kinases in Prostate Cancer . *Transl Oncogenomics.* 2007
102. Cordonnier T, Bishop JL, Shiota M, Nip KM, Thaper D, Vahid S, Heroux D, Gleave M, Zoubeidi A. Hsp27 regulates EGF/ β -catenin mediated epithelial to mesenchymal transition in prostate cancer. *Int J Cancer.* 2015
103. Coffey K, Robson CN. Regulation of the androgen receptor by post-translational modifications. *J Endocrinol.* 2012
104. Gerstberger S, Hafner M, Tuschl T. A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet.* 2014
105. Jacobsen A, Wen J, Marks DS, Krogh A. Signatures of RNA binding proteins globally coupled to effective microRNA target sites. *Genome Res.* 2010
106. Chen CY, Shyu AB. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci.* 1995
107. Wilce JA, Leedman PJ, Wilce MC. RNA-binding proteins that target the androgen receptor mRNA. *IUBMB Life.* 2002
108. Barker A, Epis MR, Porter CJ, Hopkins BR, Wilce MC, Wilce JA, Giles KM, Leedman PJ. Sequence requirements for RNA binding by HuR and AUF1. *J Biochem.* 2012
109. Li ML, Defren J, Brewer G. Hsp27 and F-box protein β -TrCP promote degradation of mRNA decay factor AUF1. *Mol Cell Biol.* 2013
110. David PS, Tanveer R, Port JD. FRET-detectable interactions between the ARE binding proteins, HuR and p37AUF1. *RNA.* 2007

111. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1995
112. Qi S, Xin Y, Qi Z, Xu M, Diao Y, Lan L, Luo L, Yin Z. HSP27 phosphorylation modulates TRAIL-induced activation of Src-Akt/ERK signaling through interaction with β -arrestin2. *Cell Signal*. 2014
113. Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, Warnecke JM, Sczakiel G. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol*. 2010
114. Tian L, Fang YX, Xue JL, Chen JZ. Four microRNAs promote prostate cell proliferation with regulation of PTEN and its downstream signals in vitro. *PLoS One*. 2013
115. Shi X-B, Xue L, Ma A-H, Tepper CG, Kung H-J, White RW. miR-125b promotes growth of prostate cancer xenograft tumor through targeting Pro-apoptotic genes. *Prostate*. 2011
116. Ribas J, Ni X, Haffner M, Wentzel EA, Salmasi AH, Chowdhury WH, Kudrolli TA, Yegnasubramanian S, Luo J, Rodriguez R, Mendell JT, Lupold SE. miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. *Cancer Res*. 2009
117. Fletcher CE, Dart DA, Sita-Lumsden A, Cheng H, Rennie PS, Bevan CL. Androgen-regulated processing of the oncomir MiR-27a, which targets prohibitin in prostate cancer. *Hum Mol Genet*. 2012
118. Rocchi P, So A, Kojima S, Signaevsky M, Beraldi E, et al. (2004) Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2004

119. Vidyasagar A, Wilson A. Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012
120. Zoubeidi A, Gleave M. Small heat shock proteins in cancer therapy and prognosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012
121. Shiota M, Bishop JL, Nip KM, Zardan A, Takeuchi A, Cordonnier T, Beraldi E, Bazov J, Fazli L, Chi K, Gleave M, Zoubeidi A. Hsp27 regulates epithelial mesenchymal transition, metastasis, and circulating tumor cells in prostate cancer. *Cancer Res*. 2013
122. Rocchi P, Beraldi E, Ettinger S, Fazli L, Vessella RL, Nelson C and Gleave M. Increased Hsp27 after androgen ablation facilitates androgen-independent progression in prostate cancer via signal transducers and activators of transcription 3-mediated suppression of apoptosis. *Cancer research*. 2005
123. Rocchi P, So A, Kojima S, Signaevsky M, Beraldi E, Fazli L, Hurtado-Coll A, Yamanaka K and Gleave M. Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer research*. 2004
124. Morino M, Tsuzuki T, Ishikawa Y, Shirakami T, Yoshimura M, Kiyosuke Y, Matsunaga K, Yoshikumi C and Saijo N. Specific expression of HSP27 in human tumor cell lines in vitro. *In vivo*. 1997
125. Voll EA, Ogden IM, Pavese JM, Huang X, Xu L, Jovanovic BD, Bergan RC. Heat shock protein 27 regulates human prostate cancer cell motility and metastatic progression. *Oncotarget*. 2014
126. Xu L, Chen S and Bergan RC. MAPKAPK2 and HSP27 are downstream effectors of p38 MAP kinase-mediated matrix metalloproteinase type 2 activation and cell invasion in human prostate cancer. *Oncogene*. 2006

127. Xu L and Bergan RC. Genistein inhibits matrix metalloproteinase type 2 activation and prostate cancer cell invasion by blocking the transforming growth factor beta-mediated activation of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2-27-kDa heat shock protein pathway. *Molecular pharmacology*. 2006
128. Doshi BM, Hightower LE, Lee J. The role of Hsp27 and actin in the regulation of movement in human cancer cells responding to heat shock. *Cell Stress Chaperones*. 2009
129. Voll EA, Ogden IM, Pavese JM, Huang X, Xu L, Jovanovic BD, Bergan RC. Heat shock protein 27 regulates human prostate cancer cell motility and metastatic progression. *Oncotarget*. 2014
130. Cordonnier T, Bishop JL, Shiota M, Nip KM, Thaper D, Vahid S, Heroux D, Gleave M, Zoubeidi A. Hsp27 regulates EGF/ β -catenin mediated epithelial to mesenchymal transition in prostate cancer. *Int J Cancer*. 2015
131. Cornford PA, Dodson AR, Parsons KF, Desmond AD, Woolfenden A, Fordham M, Neoptolemos JP, Ke Y and Foster CS. Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res*. 2000
132. Foster CS, Dodson AR, Ambrosine L, Fisher G, Moller H, Clark J, Attard G, De-Bono J, Scardino P, Reuter VE, Cooper CS, Berney DM and Cuzick J. Hsp-27 expression at diagnosis predicts poor clinical outcome in prostate cancer independent of ETS-gene rearrangement. *British journal of cancer*. 2009
133. Concannon CG, Gorman AM, Samali A. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis*. 2003

134. Hansen RK, Parra I, Lemieux P, Oesterreich S, Hilsenbeck SG. Hsp27 overexpression inhibits doxorubicin-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2000
135. Gibbons NB, Watson RW, Coffey RN, Brady HP, Fitzpatrick JM. Heatshock proteins inhibit induction of prostate cancer cell apoptosis. *Prostate* 2001
136. Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, et al. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* 1995
137. 37. Liu W, Xie CC, Zhu Y, et al. Homozygous deletions and recurrent amplifications implicate new genes involved in prostate cancer. *Neoplasia* 2008
138. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 2010
139. Gregory CW, Johnson RT, Jr, Mohler JL, et al. Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen. *Cancer Res* 2001
140. Chen Y, Sawyers CL, Scher HI.. Targeting the androgen receptor pathway in prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2008
141. Dehm SM, Schmidt LJ, Heemers HV, et al. Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res* 2008
142. Suzuki H, Akakura K, Komiya A, et al. Codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancer: relation to antiandrogen withdrawal syndrome. *Prostate* 1996

143. van de Wijngaart DJ, Molier M, Lusher SJ, et al. Systematic structure-function analysis of androgen receptor Leu701 mutants explains the properties of the prostate cancer mutant L701H. *J Biol Chem* 2010
144. Hara T, Kouno J, Nakamura K, et al. Possible role of adaptive mutation in resistance to antiandrogen in prostate cancer cells. *Prostate* 2005
145. Steketee K, Timmerman L, Ziel-van der Made AC, et al. Broadened ligand responsiveness of androgen receptor mutants obtained by random amino acid substitution of H874 and mutation hot spot T877 in prostate cancer. *Int J Cancer* 2002
146. Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, et al. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutat* 2012
147. Thompson J, Saatcioglu F, Janne OA, et al. Disrupted amino- and carboxyl-terminal interactions of the androgen receptor are linked to androgen insensitivity. *Mol Endocrinol* 2001
148. Gottlieb B, Beitel LK, Wu JH, et al. The androgen receptor gene mutations database (ARDB): 2004 update. *Hum Mutat* 2004
149. Sack JS, Kish KF, Wang C, et al. Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001
150. Scariano JK, Treat E, Alba F, et al. The SRD5A2 V89L polymorphism is associated with severity of disease in men with early onset prostate cancer. *Prostate* 2008
151. Makridakis NM, di Salle E, Reichardt JK.. Biochemical and pharmacogenetic dissection of human steroid 5 alpha-reductase type II. *Pharmacogenetics* 2000

152. Dehm SM, Tindall DJ.. Alternatively spliced androgen receptor variants. *Endocr Relat Cancer* 2011
153. Guo Z, Yang X, Sun F, et al. A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res* 2009
154. Hu R, Dunn TA, Wei S, et al. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2009
155. Sun S, Sprenger CC, Vessella RL, et al. Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *J Clin Invest* 2010
156. Hörnberg E, Ylitalo EB, Crnalic S, et al. Expression of androgen receptor splice variants in prostate cancer bone metastases is associated with castration-resistance and short survival. *PLoS One* 2011
157. Yang X, Guo Z, Sun F, et al. Novel membrane-associated androgen receptor splice variant potentiates proliferative and survival responses in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2011
158. Dehm SM, Schmidt LJ, Heemers HV, et al. Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res* 2008
159. Haile S, Sadar MD. Androgen receptor and its splice variants in prostate cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2011
160. Leibrand CR, Price DK, Figg WD. Androgen receptor splice variant 7 (AR-V7) and drug efficacy in castration-resistant prostate cancer: Biomarker for treatment selection exclusion or inclusion? *Cancer Biol Ther.* 2016

161. Heemers HV, Tindall DJ.. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev* 2007
162. Wolf IM, Heitzer MD, Grubisha M, et al. Coactivators and nuclear receptor transactivation. *J Cell Biochem* 2008
163. Hermanson O, Glass CK, Rosenfeld MG.. Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends Endocrinol Metab* 2002
164. Agoulnik IU, Weigel NL.. Androgen receptor coactivators and prostate cancer. *Adv Exp Med Biol* 2008
165. Ni L, Yang CS, Gioeli D, et al. FKBP51 promotes assembly of the Hsp90 chaperone complex and regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Mol Cell Biol* 2010
166. Wang Q, Carroll JS, Brown M.. Spatial and temporal recruitment of androgen receptor and its coactivators involves chromosomal looping and polymerase tracking. *Mol Cell* 2005
167. Xu J, Wu RC, O'Malley BW.. Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. *Nat Rev Cancer* 2009
168. Ueda T, Mawji NR, Bruchofsky N, et al. Ligand-independent activation of the androgen receptor by interleukin-6 and the role of steroid receptor coactivator-1 in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2002
169. Chung AC, Zhou S, Liao L, et al. Genetic ablation of the amplified-in-breast cancer 1 inhibits spontaneous prostate cancer progression in mice. *Cancer Res* 2007
170. Debes JD, Schmidt LJ, Huang H, et al. p300 mediates androgen-independent transactivation of the androgen receptor by interleukin 6. *Cancer Res* 2002

171. Wissmann M, Yin N, Muller JM, et al. Cooperative demethylation by JMJD2C and LSD1 promotes androgen receptor-dependent gene expression. *Nat Cell Biol* 2007
172. Chang KH, Ercole CE, Sharifi N.. Androgen metabolism in prostate cancer: from molecular mechanisms to clinical consequences. *Br J Cancer* 2014
173. Sharifi N. Minireview: Androgen metabolism in castration-resistant prostate cancer. *Mol Endocrinol* 2013
174. Fukami M, Homma K, Hasegawa T, Ogata T. Backdoor pathway for dihydrotestosterone biosynthesis: implications for normal and abnormal human sex development. *Dev Dyn.* 2013
175. Yepuru M, Wu Z, Kulkarni A, et al. Steroidogenic enzyme AKR1C3 is a novel androgen receptor-selective coactivator that promotes prostate cancer growth. *Clin Cancer Res* 2013
176. Russell PJ, Bennett S, Stricker P. Growth factor involvement in progression of prostate cancer. *Clin Chem.* 1998
177. Nishi N, Oya H, Matsumoto K, Nakamura T, Miyanaka H, Wada F. Changes in gene expression of growth factors and their receptors during castration-induced involution and androgen-induced regrowth of rat prostates. *Prostate* 1996
178. Cohen DW, Simak R, Fair WR, Melded J, Scher HI, Cordon-Cardo C. Expression of transforming growth factor-alpha and the epidermal growth factor receptor in human prostatic tissue. *J Urol* 1994
179. Hiramatsu M, Kashimata M, Minami N, Sato A, Murayama M. Androgenic regulation of epidermal growth factor in the mouse ventral prostate. *Biochem Int* 1988

180. Jarrad DF, Blitz BF, Smith RC, Patai BL, Rukstalis DB. Effects of epidermal growth factor on prostate cancer line PC-3 growth and invasion. *Prostate* 1994
181. Fowler JE, Tau LK, Ghosh L. Epidermal growth factor and prostatic carcinoma: an immunohistochemical study. *J Urol* 1988
182. Glynne-Jones E, Goddard L, Harper ME. Comparative analysis of mRNA and protein expression for epidermal growth factor receptor and ligands relative to the proliferative index in human prostate tissue. *Hum Pathol* 1996
183. Yang Y, Chisholm GD, Habib FK. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha concentrations in BPH and cancer of the prostate: their relationship with tissue androgen levels. *Oncogene*. 2010
184. Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Trapman J, Hittmair A, et al. Androgen receptor activation in prostatic tumour cell lines by a insulin-like growth factor-1, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res* 1994
185. Rojas A1, Liu G, Coleman I, Nelson PS, Zhang M, Dash R, Fisher PB, Plymate SR, Wu JD. IL-6 promotes prostate tumorigenesis and progression through autocrine cross-activation of IGF-IR. *Oncogene*. 2011
186. Craft N, Shostak Y, Carey M, Sawyers CL. A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nat Med*. 1999
187. Wolk A, Mantzoros CS, Andersson SO, et al. Insulin-like growth factor 1 and prostate cancer risk: a population-based, case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 1998

188. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, et al. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science*. 1998
189. Zoubeidi A, Zardan A, Wiedmann RM, Locke J, Beraldi E, Fazli L, Gleave ME. Hsp27 promotes insulin-like growth factor-I survival signaling in prostate cancer via p90Rsk-dependent phosphorylation and inactivation of BAD. *Cancer Res*. 2010
190. Lamoureux F, Thomas C, Yin MJ, Fazli L, Zoubeidi A, Gleave ME. Suppression of heat shock protein 27 using OGX-427 induces endoplasmic reticulum stress and potentiates heat shock protein 90 inhibitors to delay castrate-resistant prostate cancer. *Eur Urol*. 2014
191. Shiota M, Bishop JL, Nip KM, Zardan A, Takeuchi A, Cordonnier T, Beraldi E, Bazov J, Fazli L, Chi K, Gleave M, Zoubeidi A. Hsp27 regulates epithelial mesenchymal transition, metastasis, and circulating tumor cells in prostate cancer. *Cancer Res*. 2013
192. Chi KN, Yu EY, Jacobs C, Bazov J, Kollmannsberger C, Higano CS, Mukherjee SD, Gleave ME, Stewart PS, Hotte SJ. A phase I dose-escalation study of apatorsen (OGX-427), an antisense inhibitor targeting heat shock protein 27 (Hsp27), in patients with castration-resistant prostate cancer and other advanced cancers. *Ann Oncol*. 2016