

„ Wenn du die Frage kennst, weißt du schon die Hälfte“
Herbert Boyer

Aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
(Direktor Univ.- Prof. Dr. rer. nat. habil. Elke Krüger)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema: FRET-Interaktionsstudie zum Androgenrezeptor in Prostatakarzinomzellen

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des akademischen
Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der
Universitätsmedizin

der
Universität Greifswald
2019

vorgelegt von:
Robby Bernd, Langbecker
geb. am: 24.10.1988
in: Neubrandenburg

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Walther

2. Gutachter: Prof. Dr. Georgios Scheiner-Bobis

Ort, Raum: Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Seminarraum J 02.17

Tag der Disputation: 12.12.2019

Inhalt

I Inhaltsverzeichnis

II Abbildungsverzeichnis

III Abkürzungsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Anatomie und Histologie der Prostata	1
1.2 Das Prostatakarzinom	3
1.3 Tumorproteinfamilie D52	6
1.4 Androgenrezeptor	7
1.5 Peroxiredoxin 1 (Prdx1)	9
2. Materialien und Methoden	11
2.1 Materialien	11
2.1.1 Geräte	11
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	12
2.1.3 Chemikalien	13
2.1.4 Gebrauchsfertige Materialien	14
2.1.5 Vektoren und rekombinante Plasmide	16
2.1.6 Oligonukleotide	19
2.1.7 Antikörper	19
2.1.8 Software	20
2.2 Methoden	20
2.2.1. Zellkultur und Bakterienkultur	20
2.2.2 Klonierung	24
2.2.3 Transfektion von eukaryotischen Zellen	31
2.2.4 Proteingewinnung und -bestimmung	31
2.2.5 Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen	36
3. Ergebnisse	39
3.1. Kontrollspaltung der klonierten Vektoren	39
3.2. Expression von AR-DNL-full, PC1 und Prdx1 nach Transfektion in LNCaP-Zellen	40
3.3 Endogene Expression und Translokation von AR und PC1 in LNCaP-Zellen in Abhängigkeit vom Medium	41
3.4 Proteinexpression nach Transfektion von AR und PC1 in STM/CTM	42
3.5 Endogene Proteinexpression und Translokation von PC1 und AR in CT-Medium mit und ohne synthetischem Androgen-Agonisten R1881 (\pm H)	43
3.6 Kolokalisationsberechnungen von transfizierten LNCaP-Zellen	43
3.7 Kolokalisationsanalyse von transfizierten LNCaP- und PC-3-Zellen mittels FRET-Methode	47
3.8. Kolokalisationsanalyse von transfizierten PC-3-Zellen mittels FRET-Methode	55
3.9. FACS-FRET Analysen von transfizierten LNCaP-Zellen	57
4. Diskussion	61
5. Zusammenfassung	70
6. Literaturverzeichnis	71
8. Danksagung	82

II Abbildungsverzeichnis

1. A) Lagebeziehung der Prostata; B) Histologisches Bild der Prostata
2. Zonengliederung der Prostata
3. Interaktionen zwischen Stroma- und Epithelzellen in der Prostata
4. Prävalenz der Krebserkrankungen
5. Schematische Darstellung der PIN
6. TPD52 Isoformen
7. Mechanismus der AR-Wirkungsweise
8. Schematischer Aufbau eines *Western-Blots*
9. Funktionsweise von FRET
10. Grundprinzip des Bleichens
11. Kontrollspaltung der AR-DNL Konstrukte
12. Kontrollspaltung der AR-full Konstrukte
13. *Western-Blot* transfizierter LNCaP-Zellen
14. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der endogenen Expression von AR und PC1 in LNCaP-Zellen
15. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von AR und PC1 transfizierten LNCaP-Zellen
16. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von LNCaP-Zellen im CTM (+/-H)
17. Kolokalisationsberechnungen von transfizierten LNCaP-Zellen (CFP-C-AR-DNL + YFP-N-PC1)
18. Kolokalisationsberechnungen von transfizierten LNCaP-Zellen (CFP-C-Prdx1 + YFP-N-PC1)
19. Positivkontrolle der FRET-Analyse
20. Negativ-Kontrolle der FRET-Analyse
21. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kotransfizierten LNCaP-Zellen mit CFP-C-AR-DNL und YFP-N-PC1
22. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kotransfizierten LNCaP-Zellen mit CFP-C-AR-DNL und YFP-N-PC1
23. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kotransfizierten LNCaP-Zellen mit CFP-C-AR-full und YFP-N-PC1 in STM mit Hormon
24. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kotransfizierten LNCaP-Zellen mit CFP-C-Prdx1 und YFP-N-PC1 in STM mit Hormon
25. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kotransfizierten LNCaP-Zellen mit CFP-C-Prdx1 und YFP-N-PC1 in STM mit Hormon
26. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kotransfizierten PC-3-Zellen mit CFP-C-AR-full und YFP-N-PC1 in CTM ohne Hormon
27. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kotransfizierten PC-3-Zellen mit CFP-C-AR-full und YFP-N-PC1 in CTM ohne Hormon
28. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kotransfizierten PC-3-Zellen mit CFP-C-AR-full und YFP-N-PC1 in CTM mit Hormon
29. FACS-FRET Analyse von transfizierten LNCaP-Zellen mit CFP-C-AR-full und YFP-N-PC1
30. FACS-FRET Analyse von transfizierten LNCaP-Zellen mit CFP-C-Prdx1 und YFP-N-PC1

III Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>A. bidest</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
AK	Antikörper
AR-full	(<i>full length</i>) Androgenrezeptor
AR-DNL	Androgenrezeptor N-terminal verkürzt
ARE	<i>androgen response element</i>
AS	Aminosäure
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOH	Ethanol
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
FACS	<i>fluorescence assisted cell sorter</i>
FCS	fötales Kalberserum
x g	x Fallbeschleunigung
h.i.	Hitze inaktiviert
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Hsp	Hitzeschockprotein
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KGF	<i>keratinocyte growth factor</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
neg. K.	Negativkontrolle
NP40	<i>Nonidet-P40</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCa	Prostatakarzinom
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	para-Formaldehyd
PIN	prostatistische intraepitheliale Neoplasie
Pkt.	Punkt
pos.	Positiv
pos. K.	Positivkontrolle
Prdx1	Peroxiredoxin-1
PrLZ	<i>prostate leucin zipper</i>
PSA	Prostataspezifisches Antigen
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RKI	Robert-Koch Institut
RT	Raumtemperatur
RNA	ribonucleic acid
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA Puffer
TPD52	Tumorprotein D52
TV	Transkriptvariante
UV	ultraviolett

1. Einleitung

1.1 Anatomie und Histologie der Prostata

Die Prostata (Vorsteherdrüse) ist eine kastaniengroße, unpaare, akzessorische Geschlechtsdrüse des männlichen Genitaltraktes. Sie liegt *subperitoneal* vor dem *Rectum* und oberhalb des *Diaphragma urogenitale*. An der Basis besitzt sie Kontakt zur Harnblase, während die Spitze durch den Levatorspalt ragt (Ulfig, 2005). Die Ampulle des Rektums liegt ihrer *Facies posterior* an und ist nur durch die Denonvillier-Faszie von ihr getrennt. Über das *Ligamentum puboprostaticum* ist die

Facies anterior am Schambein fixiert. Eine Lappengliederung des Organs besteht eigentlich nicht, dennoch ist eine Einteilung in *Lobus dexter* und *sinister* in Hinblick auf die Zuordnung der digital-rektalen Untersuchungsbefunde sinnvoll. Der erste Abschnitt (*Pars prostatica*) der *Urethra* verläuft durch die Prostata. Vom hinteren oberen Rand aus dringen die *Ductus ejaculatorii* in das Organ ein und münden im Bereich des *Colliculus seminalis* (Samenhügel) in die *Urethra* (Benninghoff *et al.*, 2007). Die Prostata ist von einer derben fibroelastischen Kapsel umgeben und besitzt 30-50 *tubuloalveoläre* Einzeldrüsen welche von einem stark ausgebildeten fibromuskulärem Stroma umschlossen sind. Die Hauptbestandteile dieses Stromas sind vor allem glatte

Muskelzellen, Endothelzellen und Fibrozyten. Über 15-30 Ausführungsgänge (*Ductuli prostatici*) münden die Drüsenschläuche im Bereich des *Colliculus seminales* in die *Urethra* ein (Ulfig, 2005). Das zweireihige Drüsenepithel variiert je nach Aktivitätszustand zwischen prismatisch in aktiven Drüsen bis kubisch oder sogar flach in weniger aktiven Drüsen. Im basalen Bereich der Epithelschicht finden sich Stammzellen, auch Basalzellen genannt, aus

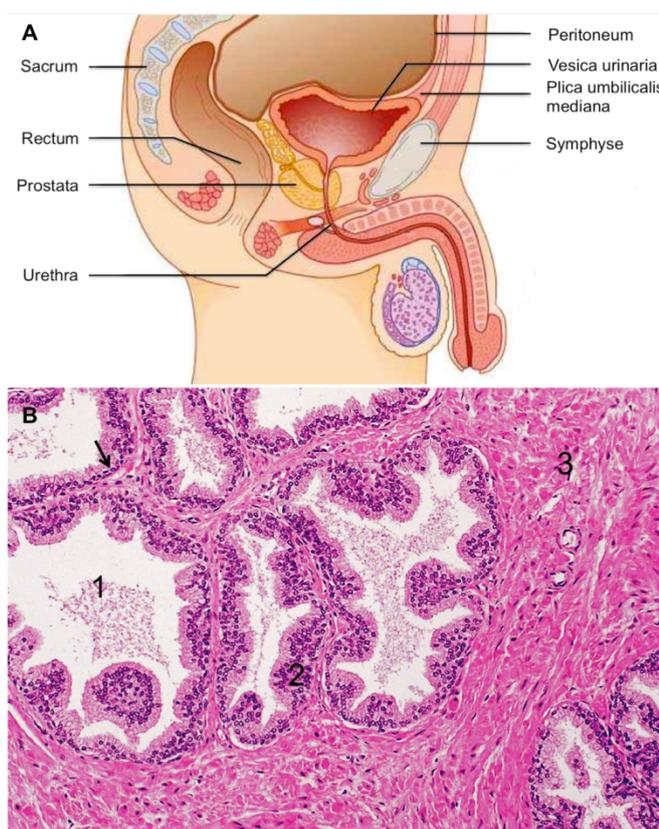


Abb. 1: **A:** Lagebeziehung der Prostata in der Beckenhöhle. Modifiziert nach (Sökeland und Rübgen, 2007). **B:** Histologisches Bild der Prostata. Die Abb. zeigt die Drüsenlumen (1) umgeben vom Stroma (3). Die Morphologie des Epithels reicht von einschichtig isoprismatisch (→) bis mehrreihig isoprismatisch (2) (Welsch und Deller, 2006).

Die Prostata ist von einer derben fibroelastischen Kapsel umgeben und besitzt 30-50 *tubuloalveoläre* Einzeldrüsen welche von einem stark ausgebildeten fibromuskulärem Stroma umschlossen sind. Die Hauptbestandteile dieses Stromas sind vor allem glatte Muskelzellen, Endothelzellen und Fibrozyten. Über 15-30 Ausführungsgänge (*Ductuli prostatici*) münden die Drüsenschläuche im Bereich des *Colliculus seminales* in die *Urethra* ein (Ulfig, 2005). Das zweireihige Drüsenepithel variiert je nach Aktivitätszustand zwischen prismatisch in aktiven Drüsen bis kubisch oder sogar flach in weniger aktiven Drüsen. Im basalen Bereich der Epithelschicht finden sich Stammzellen, auch Basalzellen genannt, aus

denen sich das gesamte Epithelgewebe regenerieren kann, sowie neuroendokrine Zellen, die unter anderem Serotonin produzieren, was zur Kontraktion der glatten Muskelzellen beiträgt (Abb. 1). An der Epitheloberfläche liegen die luminalen sekretorisch aktiven Zellen der Prostata (Welsch und Deller, 2006). Das Sekret ist dünnflüssig, farblos, sauer (pH 6,4) und bildet ca. 15-30% der Samenflüssigkeit. Es setzt sich hauptsächlich aus Zitronensäure, saurer Phosphatase, Prostaglandinen, Proteasen, Immunglobulinen, Zink und dem Polyamin Spermin zusammen (Benninghoff *et al.*, 2007). Die Proteasen sorgen physiologischerweise für eine Verflüssigung des Ejakulats, wobei das prostataspezifische Antigen (PSA) klinisch besonders relevant ist. PSA ist eine Serin-Protease, die für die Diagnostik von Prostataerkrankungen (z.B. Prostatakarzinom) besonders wichtig ist (Welsch und Deller, 2006). Das Enzym spaltet Semenogelin-1 und sorgt so für eine Verflüssigung des Samenkoagulum. Heute ist der Plasma-PSA-Wert einer der wichtigsten Marker in der Diagnostik des Prostatakarzinoms. Die Drüse wird in 3 Zonen eingeteilt. Diese Zonen sind

die periurethrale Zone (die *Urethra* umgebend), die Innenzone und die periphere Zone, welche die größte ist (Abb. 2) (Welsch und Deller, 2006). Die Zonengliederung ist klinisch wichtig, da die benigne Prostatahyperplasie in der Innenzone entsteht während das Prostatakarzinom in den Außenzone lokalisiert ist (Benninghoff *et al.*, 2007). Sowohl die Epithelzellen als auch die Stromazellen (glatte Muskelzellen, Fibrozyten, Endothelzellen) sind

hormonsensitiv und unterliegen einem engen Zusammenspiel (Abb. 3). Ihr Wachstum und ihre Aktivität sind damit von endogenen Geschlechtshormonen wie dem Testosteron abhängig. Beide Zelltypen exprimieren Androgenrezeptoren (AR), jedoch besitzen nur die Stromazellen eine 5α -Reduktase, welche die aktive Form des Testosterons, das Dihydrotestosteron (DHT), bilden (Welsch und Deller, 2006). Gerade während der Pubertät sorgt das Testosteron für ein Wachstum der Prostata und vermittelt im adulten Organ die Aufrechterhaltung der Epithelzellfunktion.

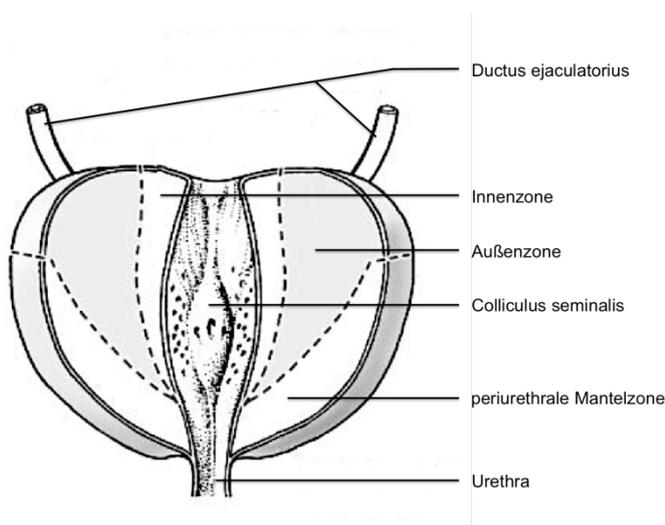


Abb. 2: Zonengliederung der Prostata, modifiziert nach T.H. Schiebler, „Anatomie“ (Schiebler und Korf, 2007).

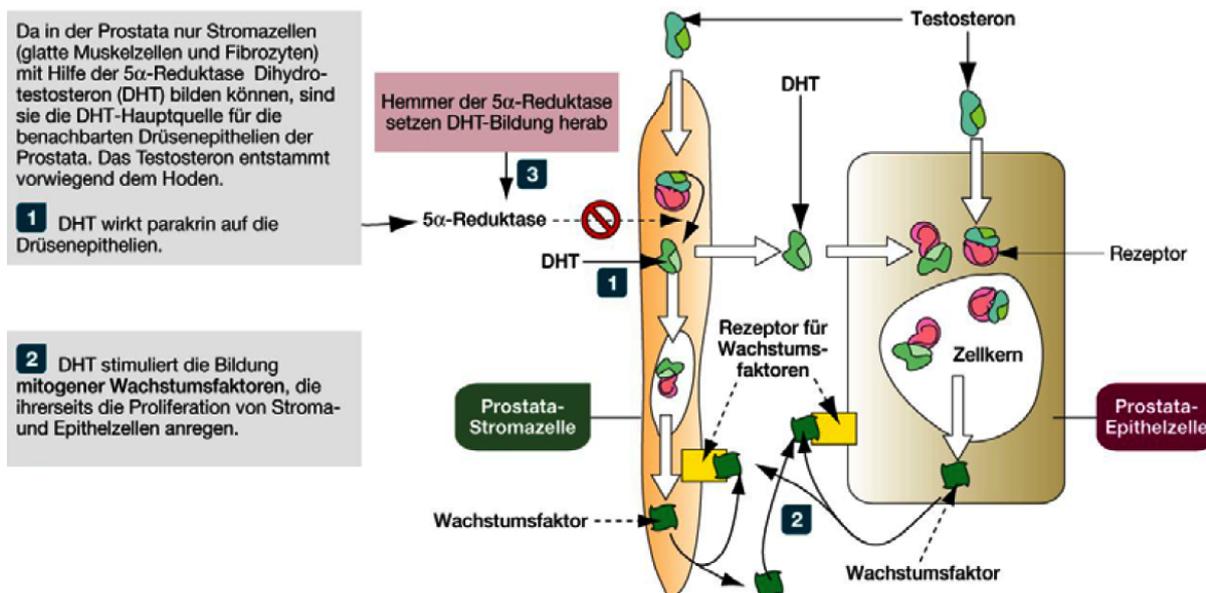


Abb. 3: Interaktion zwischen Stroma- und Epithelzellen in der Prostata modifiziert nach U. Welsch „Sobotta Lehrbuch Histologie“ (Welsch und Deller, 2006).

1.2 Das Prostatakarzinom

Epidemiologie

Das Prostatakarzinom (PCa) ist die zweithäufigste Krebserkrankungen bei Männern weltweit (WHO, 2012) und weist eine ausgeprägte Abhängigkeit von Alter, ethnischer und geografischer Herkunft auf (Parkin *et al.*, 2005). Die Zahl der Neuerkrankungen lag in den letzten Jahren auf einem annähernd konstant hohen Niveau und wird für 2018 auf 60.700 geschätzt. Damit ist das PCa in Deutschland sogar die häufigste Krebserkrankung und mit 13.704 Sterbefällen die zweithäufigste Krebstodesursache (Abb. 4) beim Mann (Robert-Koch-Institut). Angesichts der steigenden Lebenserwartung stellt das PCa in den Industrienationen ein gesundheitliches Problem dar. Die höchste Inzidenz liegt in der Gruppe der über 65-jährigen Männer. In dieser Altersschicht erkrankt einer von 7 Männern. Das Risiko ist damit ca. 20fach höher als bei den 50-54-jährigen. Auffällig ist dabei, dass die Inzidenz des latenten Prostatakrebses weltweit annähernd gleich ist. Bei etwa 60% der 80-jährigen Männer finden sich mikrofokale Krebsstadien, jedoch ist die klinische Manifestation regional sehr verschieden (Parkin *et al.*, 2005). Entsprechend konnte in Autopsiestudien gezeigt werden, dass 42% aller Männer in der 5. Lebensdekade und 64% der Männer in der 7. Lebensdekade ein PCa besitzen. Diese große Diskrepanz zwischen Inzidenz und Prävalenz ist bei keiner anderen malignen Tumorentität so ausgeprägt wie beim PCa (Sakr *et al.*, 1994). Die geringste Prävalenz findet sich im asiatischen Raum während die höchste Prävalenz vor allem in Nordamerika und Nordeuropa liegt. Besonders die US-Amerikaner

afrikanischer Herkunft besitzen eine doppelt so hohe Inzidenz und Mortalität wie weiße Amerikaner und haben damit global gesehen die höchste Inzidenz und Mortalitätsrate (Parkin *et al.*, 2005). Dies alles deutet darauf hin, dass die Entstehung des PCa ein multifaktorieller Prozess ist bei dem neben genetischen Faktoren auch Umwelteinflüsse wie z.B. Ernährungs- und Lebensgewohnheiten als Tumorpromotoren fungieren können (Crawford, 2003, Sugimura, 2000, Thompson, 2007, Zeigler-Johnson *et al.*, 2008).

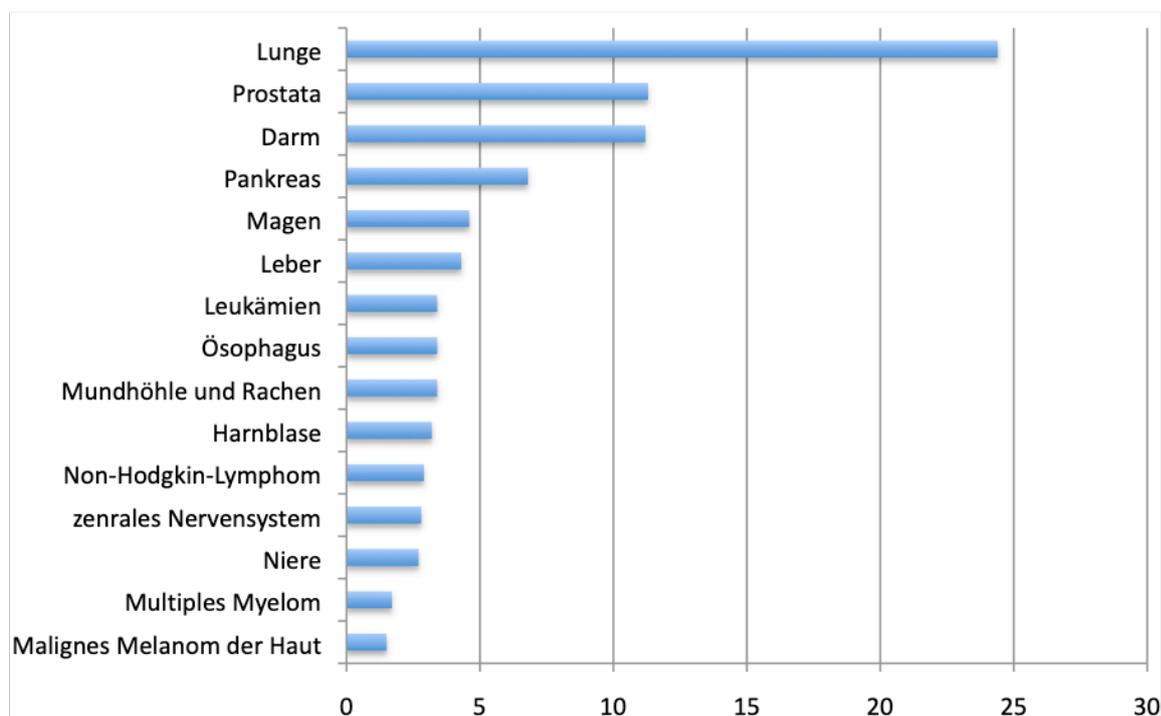


Abb. 4: Prävalenz der Krebserkrankungen im Jahr 2012 in der BRD. Angaben in Prozent (Robert-Koch-Institut).

Pathogenese, *Grading* und Therapieoptionen

Alle Zonen der Prostata weisen kleine Drüsen und Drüsenausgänge auf, welche mit Epithel ausgekleidet sind. In 98% der Fälle ist eine krankhafte Veränderung und die unkontrollierte Vermehrung dieses Drüsenepithels Ausgangspunkt für ein PCa. Die periphere Zone ist mit 90% häufigster Entstehungsort, nur in seltenen Fällen entsteht ein PCa in der zentralen Zone (Graefen, 2010). Vorläufer dieses Karzinoms ist häufig eine prostatiche intraepitheliale Neoplasie (PIN, Abb. 3) (Sanchez-Chapado *et al.*, 2003). Bei der PIN handelt es sich um eine echte, nicht invasive Präkanzerose mit intraduktalen Epitheldysplasien (Abb. 5). Mikroskopisch proliferiert das Epithel und weist zumeist ein wellenartiges, seltener kribriiformes oder papilläres Wachstumsmuster auf, welches zusätzlich zelluläre Atypien zeigt. In ca. 5 – 10% der Prostatahyperplasien sowie in 50 – 70% der Prostatakarzinome konnte eine PIN histologisch nachgewiesen werden (Mikuz und Kristiansen, 2012). Dabei kann nicht bestimmt werden, ob der Ursprung des PCa in den Basal- oder Luminalzellen liegt (De Marzo *et al.*, 1998). Fest steht jedoch, dass bei einer PIN die Basalzellen ihre proliferativen

Eigenschaften verlieren, während die sekretorischen Luminalzellen eine gesteigerte Proliferationsrate aufweisen (Bonkhoff und Remberger, 1998). In 85% der Fälle entsteht ein Prostatakarzinom als direkte Folge einer schweren PIN (Sanchez-Chapado *et al.*, 2003).

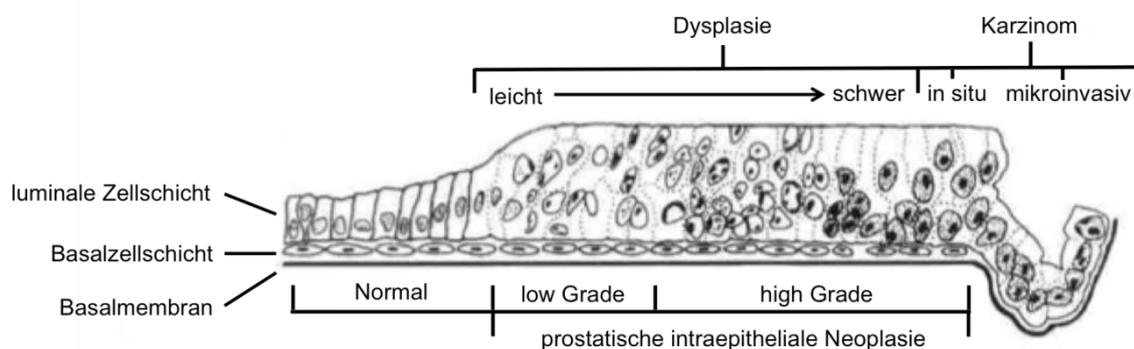


Abb. 5: Schematische Darstellung der prostaticen intraepithelialen Neoplasie. Kennzeichnend ist die Zunahme der Zelltypen mit dem Schweregrad der PIN modifiziert nach Foster und Bostwick „*Pathology of the prostate*“ (Foster und Bostwick, 1998)

Das Alter ist für die Entstehung der wichtigste Risikofaktor. Während vor der 4. Lebensdekade das PCa eine Rarität ist, steigt die Prävalenz im Alter fast logarithmisch an und gipfelt im 8. Dezennium (Jemal *et al.*, 2004). Autopsische Serienschnitte von über 90-Jährigen ergaben eine Karzinomprävalenz von 70-90% (Mikuz und Kristiansen, 2012). Eine mögliche Ursache für die Entstehung des Tumors liegt wahrscheinlich in dem veränderten Verhältnis von Steroidhormonen im Alter (Testosteron sinkt, Östrogen steigt). Ein Hinweis dafür ist die Tatsache, dass Männer die vor der Pubertät kastriert wurden, im Laufe ihres Lebens weder an einem PCa noch an einem Prostataadenom erkranken (Welsch und Deller, 2006). Zudem konnte in randomisierten prospektiven Studien gezeigt werden, dass die Gabe von Finsterid (5- α -Reduktasehemmer, führt zur Reduzierung von DHT) in einem Zeitraum von 7 Jahren die Prävalenz des PCa um 25% gesenkt hat, was ebenfalls auf eine Hormonabhängigkeit der Karzinogenese hindeutet (Higgins und Thompson, 2004, Thompson *et al.*, 2006, Thompson *et al.*, 2004). Das klassische Adenokarzinom der Prostata zeigt große Unterschiede im Wachstumsmuster der Drüsen (pluriformes Karzinom). Daher etablierte sich für das *Grading* die Variante nach Gleason (Mikuz und Kristiansen, 2012). Die Bewertung basiert auf einem rein histomorphologischen Bild und beschreibt in 5 Stufen die durch den histologischen Architekturverlust bedingte Dedifferenzierung des PCa. Durch die verschiedenen Wachstumsmuster wird ein *Score* aus dem primären (vorherrschenden) und sekundären (zweithäufigsten) Muster ermittelt. Bei einem einheitlichen Muster wird der Wert verdoppelt. Dieses *Grading* korreliert am signifikantesten mit dem klinischen Verlauf und ist daher heute einer der wichtigsten Prognoseparameter und essentiell für die Therapieplanung (Rübben, 2009). Die heutigen Therapiemöglichkeiten reichen von einer OP (Prostatektomie) über Strahlentherapie (permanente *seed*-Implantation oder perkutane Bestrahlung) bis hin

zur Chemotherapie im fortgeschrittenen Stadium. Durch den Zusammenhang des Tumorwachstums in Abhängigkeit von Androgen ergibt sich die Möglichkeit einer Androgenentzugstherapie (Steuber *et al.*, 2010). Dies kann zum einen über eine Orchiektomie oder zum anderen über die Gabe von Androgenrezeptorantagonisten z.B. Flutamid erfolgen. Trotz Therapie proliferiert bei vielen Patienten der Tumor nach 12-18 Monaten weiter. Diesen Zustand bezeichnet man als kastrationsresistentes PCa. Die Tumorzellen sind in der Lage sich auch ohne Androgen zu vermehren. Der genaue Mechanismus dieser Entwicklung ist noch ungeklärt (Miyamoto H. *et al.*, 2004), immunhistochemische Untersuchungen aber zeigten, dass der Androgenrezeptor (AR) und seine Zielgene (z.B. PSA) exprimiert werden, was darauf hindeutet, dass die AR-Signalkaskade weiterhin intakt ist (Chen C. D. *et al.*, 2004, Niu *et al.*, 2010).

1.3 Tumorproteinfamilie D52

Durch *Screening*verfahren auf überexprimierte Proteine in Mammakarzinomzellen wurde vor 23 Jahren das Tumorprotein D52 (TPD52) erstmals detektiert (Byrne *et al.*, 1995). Durch weitere Untersuchungen fand man Proteine mit ausgeprägten Homologien, die alle zur Tumorproteinfamilie D52 gezählt werden (Boutros *et al.*, 2004). Hierzu gehören neben dem D52 mindestens 3 weitere Vertreter: TPD53 (TPD52-like1), TPD54 (TPD52-like2) und TPD55 (TPD52-like-3) (Boutros *et al.*, 2004, Cao *et al.*, 2006). Das TPD52-Gen befindet sich auf dem Chromosom 8q21 (Byrne *et al.*, 1998) und es zeigte sich, dass diese Sequenz in zahlreichen anderen Tumoren wie Osteosarkom (Tarkkanen *et al.*, 1995), Blasenkarzinom (Kallioniemi *et al.*, 1995) und dem Prostatakarzinom amplifiziert ist (Cher *et al.*, 1994). Alle diese Vertreter weisen strukturell eine *coiled-coil*-Domäne von 50 Aminosäuren auf (Byrne *et al.*, 1998, Proux *et al.*, 1996, Proux-Gillardeaux *et al.*, 2003), sowie am N- und C-Terminus eine PEST-Sequenz (Prolin, Glutamat, Serin, Threonin) (Byrne *et al.*, 1996, Nourse *et al.*, 1998). Die *coiled-coil*-Domäne ist vor allem wichtig für die Interaktion mit homologen und heterologen *D52-like* Proteinen (Byrne *et al.*, 1998, Proux *et al.*, 1996, Proux-Gillardeaux *et al.*, 2003), während die PEST-Sequenz für die Regulation der Proteinstabilität von Bedeutung ist (Byrne *et al.*, 1996, Nourse *et al.*, 1998). Alle Proteine können durch alternatives Spleißen in verschiedenen Isoformen vorliegen (Boutros *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2009), allein vom TPD52 sind 8 verschiedene Isoformen bekannt (UniProtKB), wobei sich die Mehrheit der Studien mit der Isoform 2 (NCBI-Nomenklatur Transkriptvariante 3) und der Isoform 1 (NCBI-Nomenklatur Transkriptvariante 1) befasst hat. Beide unterscheiden sich strukturell durch einen verlängerten N-Terminus der Isoform 1 (Wang *et al.*, 2004). Neben einer *coiled-coil* Domäne (*Prostate-Leucin-Zipper*, PrLZ) finden sich im TPD52-IF1 kanonische Serin- und Threoninsequenzen, die phosphoryliert werden können (Li *et al.*,

2013). Die Isoform 3 (TPD52-IF3) kommt in fast allen Gewebearten des Menschen vor, z.B. Pankreas, Niere, Gehirn, Prostata und Darm (Chen S. L. *et al.*, 1996). Die Isoform 1 (TPD-IF1) hingegen konnte vor allem im Prostatagewebe, sekretorischen Drüsen und in geringen Mengen auch im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 2004). Insbesondere in der PIN und im PCa konnte eine Überexpression der Isoform 1 nachgewiesen werden, beim PCa sogar eine Genamplifikation in 67% der Zellen. Im Gegensatz dazu liegt das Expressionslevel im gesunden Prostatagewebe und in der BPH auf einem niedrigen Niveau (Wang *et al.*, 2004). Die genaue Funktion und Rolle von PrLZ in den Tumorzellen konnte noch nicht geklärt werden, Untersuchungen an LNCaP-Zellen zeigten jedoch, dass eine Überexpression des PrLZ zu einer vermehrten Akt-Kinaseaktivität führt, welche Einfluss auf den Akt/PKB-Signalweg hat. Der Akt/PKB-Signalweg besitzt eine zentrale Funktion bei der Regulation der Zellproliferation und -differenzierung und trägt damit zur Progression und Entwicklung von Neoplasien bei (Ayala *et al.*, 2004, Lattouf *et al.*, 2006). Im Zuge der PrLZ-Überexpression kommt es ebenfalls zu einem Anstieg des Bcl-2-Levels. Das Protein Bcl-2 führt zur Verhinderung der Apoptosevorgänge in Zellen (Zhang *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2009). Speziell beim PCa zeigen Studien, dass die Isoform 1 des TPD52 in der Lage ist, mit dem Androgenrezeptor zu interagieren und somit Einfluss auf die Entwicklung des PCa zu nehmen (Li *et al.*, 2013).

```

TPD52 TV1      MDCREM DLYEDYQSPF DFDAGVNKSY LYLSPSGNSS PPGSPTLQKF
TPD52 TV3      -----
----- GLLRTDPVPE EGEDVAATIS ATETLSEEEQ EELRRELAKV
MDRGEQ GLLRTDPVPE EGEDVAATIS ATETLSEEEQ EELRRELAKV
      EEEIQTLSQV LAAKEKHLAE IKRKLGINSL QELKQNIAKG
      EEEIQTLSQV LAAKEKHLAE IKRKLGINSL QELKQNIAKG
      WQDVTATSAY KKTSETLSQA GQKASAAFSS VGSVITKKLE
      WQDVTATSAY KKTSETLSQA GQKASAAFSS VGSVITKKLE
      DVKNSPTFKS FEEKVENLKS KVGGTKPAGG DFGEVLNSAA
      DVKNSPTFKS FEEKVENLKS KVGGTKPAGG DFGEVLNSAA
      NASATTTEPL PEKTQESL
      NASATTTEPL PEKTQESL

```

Abb. 6: TPD52-Isoformen (National Center for Biotechnology Information). Zugriffsschlüssel für die verwendeten Proteinsequenzen: TPD52-TV1: NP_001020423.1, TPD52-TV3: NP_005070.1

1.4 Androgenrezeptor

Der Androgenrezeptor (AR) ist Mitglied der Steroidrezeptor Superfamilie (Chang C. S. *et al.*, 1988, Evans, 1988) und vermittelt als intrazellulärer Rezeptor die Androgenwirkung durch die Transkription spezifischer Gene. Er fördert das Wachstum, die Entwicklung sowie Differenzierung der Prostata (Culig *et al.*, 1998) und wird hauptsächlich von den luminalen sekretorischen Zellen und zum Teil auch in den Basalzellen exprimiert. Über das

Vorhandensein des AR in Stromazellen, gibt es unterschiedliche Meinungen. Manche Untersuchungen zeigen, dass der AR kaum in den Stromazellen histochemisch nachweisbar ist (Sar *et al.*, 1990). Anderer Literatur zufolge wird der AR sowohl in den Epithelzellen als auch in den Stromazellen exprimiert (Welsch und Deller, 2006). Das Gen befindet sich auf dem X-Chromosom Xq12 und umfasst ca. 90kb (Wieacker *et al.*, 1987). Es besteht aus 8 Exons und kann durch alternatives Spleißen zu zwei verschiedenen mRNA-Molekülen prozessiert werden, was zu zwei verschiedenen Isoformen führt (Lubahn *et al.*, 1988). Das Protein ist bei einem Molekulargewicht von rund 98,8 kDa aus 917 Aminosäuren aufgebaut (Brinkmann *et al.*, 1989). Es enthält 4 verschiedene funktionelle Domänen (Cude *et al.*, 1999): 1. die aminoternale Transaktivierungsdomäne (TAD), 2. die DNA-Bindungsdomäne (DBD), 3. die *hinge*-Region und 4. die carboxyterminale Ligandenbindungsdomäne (LBD), wobei letztere und die DNA-Bindungsdomäne hoch konservierte Strukturen darstellen (Quigley *et al.*, 1995). In Abwesenheit des Liganden bildet der AR im Zytoplasma einen inaktiven Komplex aus verschiedenen Proteinen wie z.B. HSP70 und HSP90 (Fang *et al.*, 1996). Die Abb. 7 zeigt schematisch den AR vermittelten Signalweg in der Zelle. Das in die Zelle diffundierte Testosteron wird über die 5 α -Reduktase zu Dihydrotestosteron (DHT) reduziert. Durch Bindung von Dihydrotestosteron (DHT) an die LBD des AR kommt es zur Dissoziation des Proteinkomplexes (Beato *et al.*, 1996, Veldscholte *et al.*, 1990b, Zhou *et al.*, 1994). Diese Interaktion führt zu einer Konformationsänderung des AR, wodurch sich an die Kernlokalisationssequenz (NLS) Importin- α bindet und der AR in den Kern transloziert (Jenster *et al.*, 1991). Im Nukleus kommt es zur Ausbildung von Homodimeren des AR (Beato *et al.*, 1996, Veldscholte *et al.*, 1990b, Zhou *et al.*, 1994) welche mittels der DBD und ihren zwei Zinkfingermotiven an palindromische DNA-Sequenzen binden. Diese Sequenzen sind *androgen-response-elements* (ARE) und bilden zusammen mit dem AR einen DNA-Proteinkomplex (Beato *et al.*, 1996, Suzuki *et al.*, 2003, Ueda *et al.*, 2002). Im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren und Proteinen vermittelt die TAD die Transkription der Zielgene.

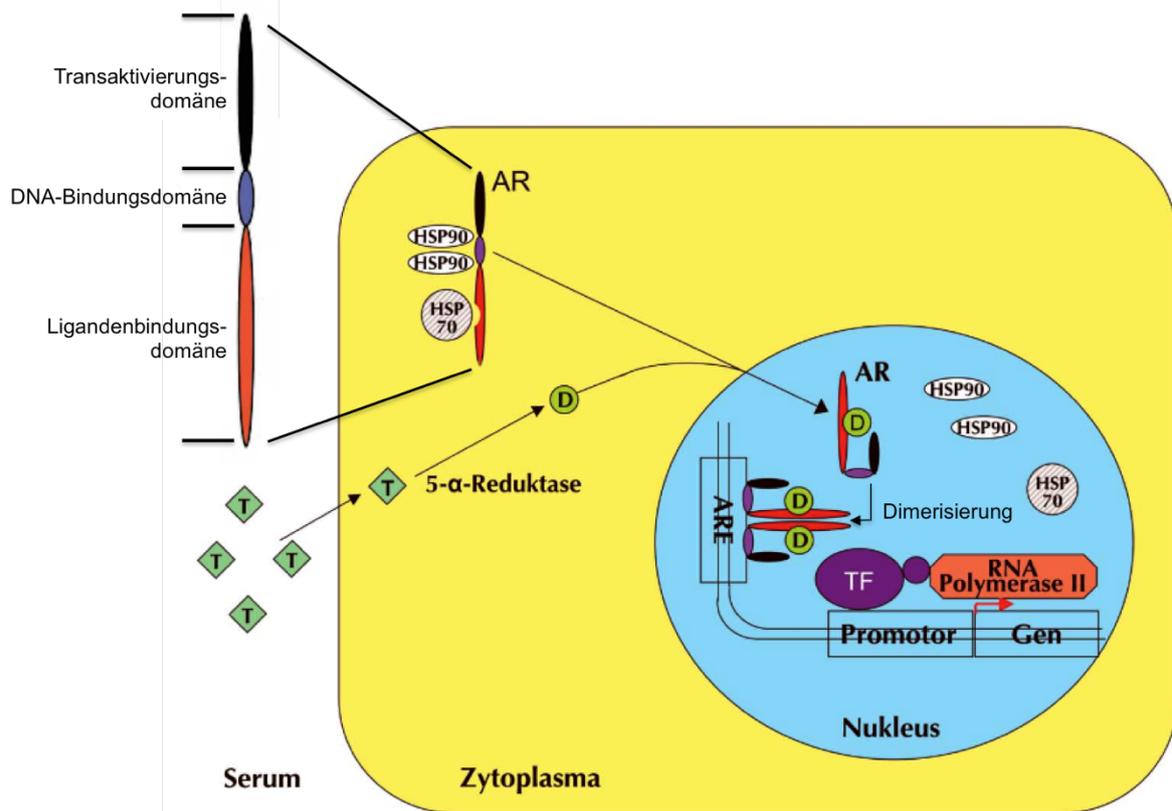


Abb. 7: Mechanismus der AR-Wirkungsweise und Signalkaskade. T: Testosteron; D: Dihydrotestosteron; HSP: Hitzeschock-Protein; ARE: *androgen-response element*; TF: Komplex aus verschiedenen Transkriptionsfaktoren (Trapman *et al.*, 1988).

1.5 Peroxiredoxin 1 (Prdx1)

Peroxiredoxine sind eine Proteinfamilie von 22-27kDa großen, nicht selenhaltigen Peroxidasen, welche in der Klasse der Säugetiere in 6 Isoformen vorkommen (Rhee, 2006, Rhee *et al.*, 2005). Diese Isoformen werden basierend auf der Anzahl der konservierten Cysteinreste und der katalytischen Mechanismen in die Subklassen 2-Cystein (Prdx1-4), 2-Cystein atypisch (Prdx5) und 1-Cystein (Prdx6) unterteilt (Rhee *et al.*, 2001). Prdx1 als Vertreter der 2-Cystein Untergruppe besitzt einen konservierten Cysteinrest am N-Terminus (Cys⁵²) sowie am C-Terminus (Cys¹⁷³) (Neumann *et al.*, 2009) und ist hauptsächlich im Zytosol der Zelle lokalisiert (Hirotsu *et al.*, 1999). Prdx1 sowie Thioredoxin sind wichtige endogene Antioxidantien und schützen die Zellen vor oxidativer Schädigung durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (Fujii und Ikeda, 2002, Netto und Antunes, 2016, Rhee *et al.*, 2005). Weiterhin reguliert Prdx1 mehrere ROS (*Reactive Oxygen Species*)-abhängige Signalwege und ist so ein Schlüsselprotein in der Balance zwischen Apoptose und Zellüberleben (Ishii *et al.*, 2012, Neumann *et al.*, 2009). Über Oxidation des N-terminalen Cysteins baut Prdx1 entsprechende Peroxide ab, wodurch es zur Bildung von intermolekularen Disulfidverbindungen zwischen dem Cys⁵² und Cys¹⁷³ kommt (Neumann *et*

al., 2009). Im Zuge der Oxidation konvertiert Prdx1 unter Stressbedingungen vom Peroxidase-Enzym zum Chaperon und kann auch als solches fungieren (Jang *et al.*, 2004, Moon *et al.*, 2005). Die oxidierte Form kann über verschiedene Mechanismen wieder in die aktive Form umgewandelt werden (Neumann *et al.*, 2009). Prdx1 wurde erstmals als antioxidatives Enzym beschrieben, jedoch ist die genaue Rolle im Gleichgewicht zwischen Oxidation-Reduktion in der Zelle weiterhin unklar (Jang *et al.*, 2004, Moon *et al.*, 2005). Zusätzlich zur Peroxidase- und Chaperonfunktion ist Prdx1 in der Lage, die Zytotoxizität von NK-Zellen zu verstärken sowie Onkogene wie c-Myc und c-Abl zu supprimieren (Mu *et al.*, 2002, Shau *et al.*, 1993, Wen und Van Etten, 1997). Das Protein c-Abl spielt eine bedeutende Rolle beim induzierten Zelltod durch oxidativen Stress und ist gleichzeitig ein *upstream*-Effektor für den JNK und p38 MAPK-Signalweg (Ishii *et al.*, 2012, Neumann und Fang, 2007). Frühere Studien zeigten des Weiteren eine erhöhte Expression von Prdx1 in verschiedenen Krebsentitäten wie Mamma-, Ösophagus-, Lungen- und Prostatakarzinomen (Deng *et al.*, 2005, Karihtala *et al.*, 2003, Ren *et al.*, 2013, Riddell *et al.*, 2011). Durch die direkte Assoziation mit Transkriptionsfaktoren wie NF κ B und dem AR unterdrückt das Enzym den Tumorzelltod und wird dadurch auch als Onkogen angesehen (Chhipa *et al.*, 2009, Hansen *et al.*, 2007). Diese Assoziation zeigt sich ebenfalls in der gesteigerten AR-Aktivität bei Prdx1-überexprimierenden Prostatakrebszellen unter hypoxischen Bedingungen sowie in einer verminderten AR-Aktivität bei Prdx1-*knock-out*-Zellen, was zu einer verringerten Wachstumsrate von AR-abhängigen Prostatakrebszellen führt (Park *et al.*, 2007). Untersuchungen ergaben überdies, dass die gesteigerte AR-Aktivität, auf eine erhöhte, Prdx1-vermittelte Affinität des AR's zum DHT zurückzuführen ist (Chhipa *et al.*, 2009). Dieser Zusammenhang äußert sich ebenfalls in Versuchen mit Prdx1 überexprimierenden LNCaP-Zellen. Die Behandlung dieser Zellen mit Finasterid (5 α -Reduktase-Inhibitor) in Kombination mit einem Prdx1 *knock-down* führte zu einer verstärkteren AR-abhängigen Wachstumshemmung als die singuläre Behandlung mit Finasterid (Wu *et al.*, 2011). So könnte dem Prdx1 vielleicht in Zukunft eine bedeutende Rolle im Zusammenhang der Entwicklung neuer Strategien zur Verbesserung der anti-Androgenen Therapie beim Prostata-Ca zukommen (Parmigiani *et al.*, 2008, Schultz *et al.*, 2010, Shiota *et al.*, 2008).

Aus früheren Greifswalder Arbeiten weiß man, dass PrLZ (Klein, 2013) sowie Prdx1 (Ummanni, 2008) in der Lage sind, mit dem AR zu interagieren. Darüber hinaus ist bekannt, dass sowohl PrLZ (Li *et al.*, 2013) als auch Prdx1 (Chhipa *et al.*, 2009) in kastrationsresistenten PCa-Zellen hoch exprimiert vorliegt. Als mögliche Partner, die den AR aktivieren können, war es Ziel in der vorliegenden Arbeit Kolokalisationen zwischen PrLZ und Prdx1 sowie PrLZ und AR in verschiedenen Zellkompartimenten nachzuweisen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Absorptionsplattenreader	infinite M200 Tecan, Crailsheim
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Block-Thermostat	BT1 und QBT4 Grant Instruments, Cambridgeshire GB
Einfrierbox	Thermo Scientific, Schwerte
Eismaschine	KF85 MIGEL ice line, Mailand I
Elektronikrührer	Variomag Monotherm mini H+P Labortechnik AG, Oberschleisheim
Elektrophoresekammer horizontal & Zubehör (Kämme, Gießstand, Gelträger)	Armin Baack, Schwerin
Elektrophoresekammer vertikal & Zubehör (Kämme, Glasplatten, Dichtungsgummis)	Biometra, Göttingen
FACSAria™	BD Biosciences, Heidelberg
Feinwaage	MC1 Analytic AC210S Sartorius, Göttingen
Folienschweißgerät	Folio Severin, Sundern
Gel Imager	Intas, Göttingen
Laminarbox Safe 2020	Thermo Scientific, Schwerte
Mastercycler gradient und personal	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop DMI6000	Leica, Wetzlar
Mikroskop IX81	Olympus, Hamburg
Mikrowelle	Severin, Sundern
Milli-Q ^R -Anlage Millipore	Merck Millipore, Billerica USA
pH-Meter „Five Easy“	Mettler Toledo, Giesen
Pipeto [®] , elektronische Pipettierhilfe	Vitlab, Großostheim
Pipetten	Biohit, Helsinki FN Eppendorf, Hamburg
Pumpe	Laborbedarf Erich Wiegand GmbH, Hamburg
Rollinkubator	RM5 Karl Hecht KG, Sondheim
Röntgenkassete CURIX	AGFA, Mortsel
Rotilabo [®] -Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Scanner ViewPix 1100	Biostep GmbH, Jahnsdorf
Schüttelinkubator Innova™ 4330	New Brunswick Scientific, Wesseling-Berzdorf
Semi-Dry Blotter	Armin Baack, Schwerin
Spectrophotometer NanoDrop 2000c	Thermo Scientific, Schwerte
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
UV- Lampe VL- 6MC	Itf Labortechnik, Wasserburg
Vortexer	LabDancer VWR, Darmstadt
Vortexer	Mono-Mixer Sarstedt, Nümbrecht
Waage PT1200	Sartorius, Göttingen
Waage, Analysewaage BP160P	Sartorius, Göttingen
Wasserbad WiseCircu®	Witeg, Wertheim
Wipp-Schüttler	GFL, Burgwedel
	Uniequip, Planegg
Zellinkubator Autoflow CO2	NuAire, Plymouth GB
Water Jacketed	
Zentrifuge „Microstar 17R“	VWR, Darmstadt

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

13ml-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
15ml-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
50ml-Falcon®	BD Biosciences, Heidelberg
96 Well-PCR-Platten	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
96 Well-Mikrotiterplatte	Greiner, Frickenhausen
Einmalküvetten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Filterpapier	Whatman GmbH, Dassel
Handschuhe	Sterling Nitrile Kimberly- Clark, Koblenz
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Microtouch Nitra-Tex Nitrilhandschuhe	Ansell Healthcare, Brüssel B
Pasteur-Pipetten Glas 150mm, 230mm	VWR International, Darmstadt
PCR SoftTube 0,2ml	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Petrishalen 10cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
10, 100, 200, 1000µl	
Pipettenspitzen ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht
10, 100, 1000, 5000µl	

PROTRAN® Nitrocellulose-Transfer-Membran	Whatman GmbH, Dassel
Röntgenfilme	CAE, Hamburg
Serologische Pipetten steril 2, 5, 10, 25ml	Sarstedt, Nümbrecht
Transferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflasche 75cm ²	Greiner Bio-One, Solingen
Zellkulturflasche 25cm ²	Greiner Bio-One, Solingen
Zellkulturplatten 6, 12, 24, 48, 96 Well	Greiner Bio-One, Solingen
Zellkulturschalen 35, 60, 100mm	Sarstedt, Nümbrecht
Zell-Schaber	TPP, Trasadingen CH

2.1.3 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Bromphenolblau	Feinchemie K.-H. Kallies KG, Sebnitz
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
CHAPS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Complete™ Mini Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DAPI	Sigma-Aldrich, München
DEPC	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DHT	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DMSO	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DMSO steril AppliChem GmbH, Darmstadt	
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Universitätsapotheke Greifswald
Ethanol, vergällt	Universitätsapotheke Greifswald
Formaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Glycerol 87%	FERAK Laborat GmbH, Berlin
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Guanidinium-Hydrochlorid	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumchlorid	FERAK, Laborat GmbH, Berlin
Kaliumdihydrogenphosphat	Reanal, Budapest H
Kanamycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
LB-Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
LB-Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ligationspuffer (10x)	Fermentas-Thermo Scientific, Schwerte
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Mowiol	EMD Bioscience, La Jolla USA
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nonidet® P-40	Sigma-Aldrich, München
o-Phosphorsäure 85%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ponceau S	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
R1881	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure, rauchend	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tetracyclin-Hydrochlorid	Roche diagnostics, Mannheim
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tween-20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

2.1.4 Gebrauchsfertige Materialien

Lösungen

Accutase®	BioWest SAS, Nuaille
Acrylamidlösung Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DMEM low glucose (1g/l) mit Glutamin	PAA Laboratories, Pasching A
Dulbecco's PBS, steril	Invitrogen, Darmstadt
Entwickler G153A, B	AGFA, Mortsel
Fetales Kälberserum	Invitrogen, Darmstadt

Fibronektin (<i>human</i>)	BD Biosciences, Bedford USA
Fixierer	AGFA, Mortsel
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Thermo Scientific, Schwerte
JetPEI® DNA transfection reagent	Polyplus transfection, Illkirch
Kollagen I (<i>rat tail</i>)	Corning®, Bedford USA
Natriumchlorid-Lösung 0,9%	B. Braun, Melsungen
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Schwerte
Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x)	PAA Laboratories, Pasching A
peqFECT DNA transfection reagent	peqlab, Erlangen
RedSafe IntRON	Biotechnology, Seongnam KOR
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Schwerte
Roti®-Blot A	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti®-Block	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti®-Blot K	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RPMI1640	PAN™ Biotech, Aidenbach
TriFast™	Peqlab, Erlangen
Trypsin-EDTA (10x)	PAA Laboratories

Enzyme

<i>DpnI</i>	New England Biolabs, Frankfurt am Main; Fermentas-Thermo Scientific, Schwerte
Phusion-Polymerase + Puffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Taq-Polymerase + Puffer	Analytic Jena AG, Jena
T4-DNA Ligase	Promega, Madison USA
<i>Bam</i> HI + Puffer	Fermentas-Thermo Scientific, Schwerte New England Biolabs, Frankfurt am Main
<i>Xho</i> I + Puffer	Fermentas-Thermo Scientific, Schwerte New England Biolabs, Frankfurt am Main

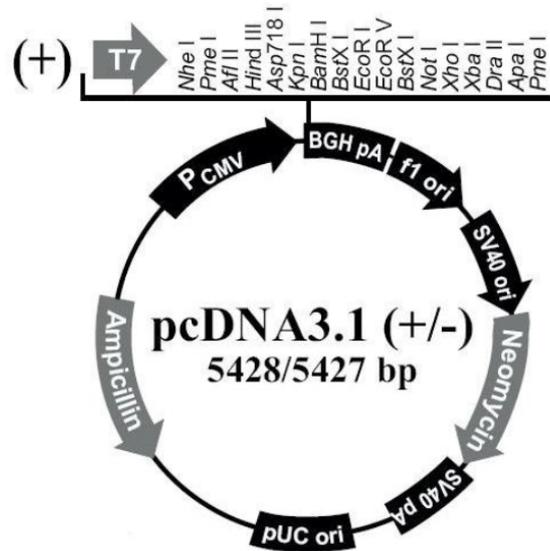
Kits

NucleoBond® Xtra Midiprep Kit	Macherey-Nagel, Duren
PeqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Super Signal® West Dura	Thermo Fisher Scientific, Bonn

2.1.5 Vektoren und rekombinante Plasmide

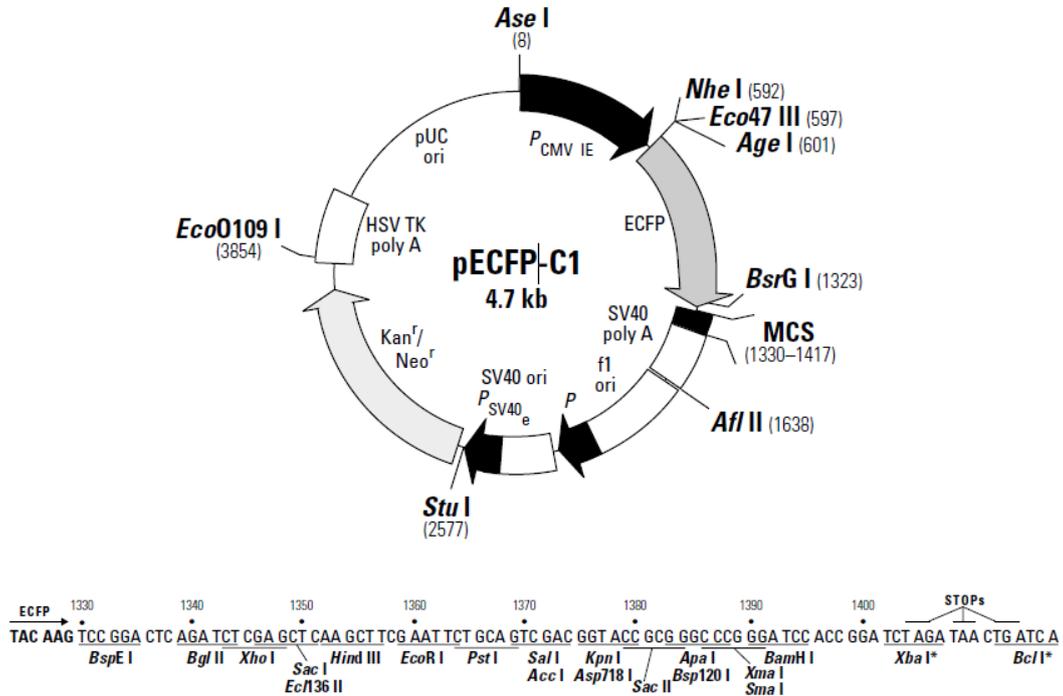
pcDNA-3.1(+)

Vektor zur stabilen oder transienten Expression in Säugerzellen, enthält CMV-Promotor und Resistenzkassetten für Ampicillin und Neomycin (Invitrogen, Darmstadt).



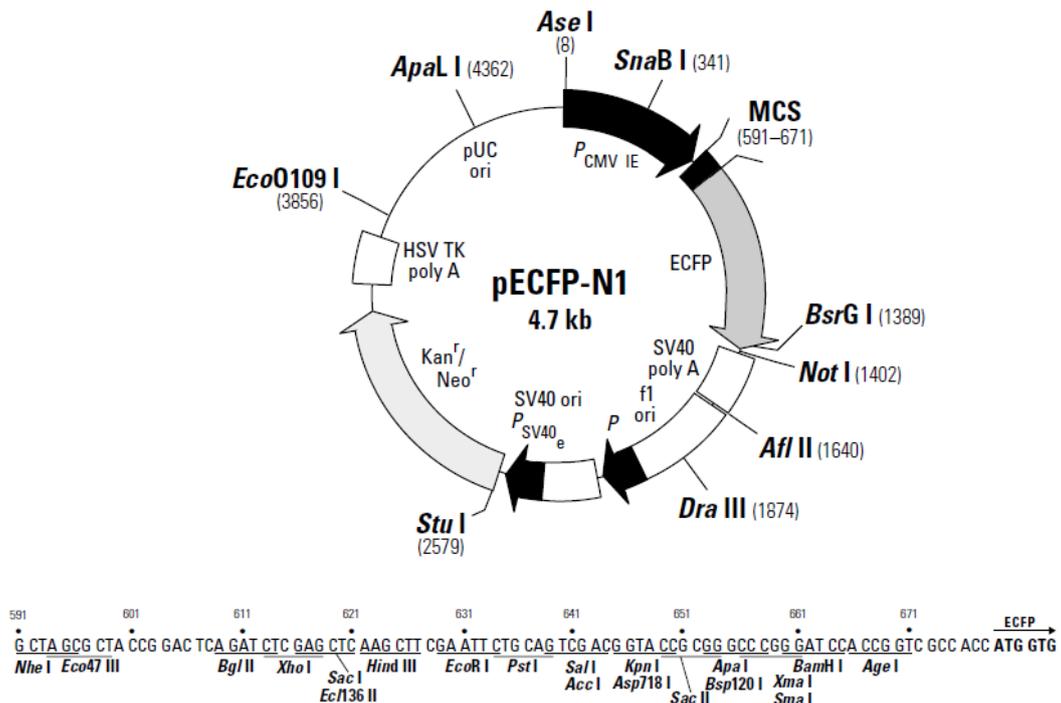
pECFP-C1

Vektor zur Expression in Säugerzellen für Fluoreszenzanalysen. Enthält Sequenz für ECFP, CMV-Promotor und Resistenzkassette für Kanamycin und Neomycin.



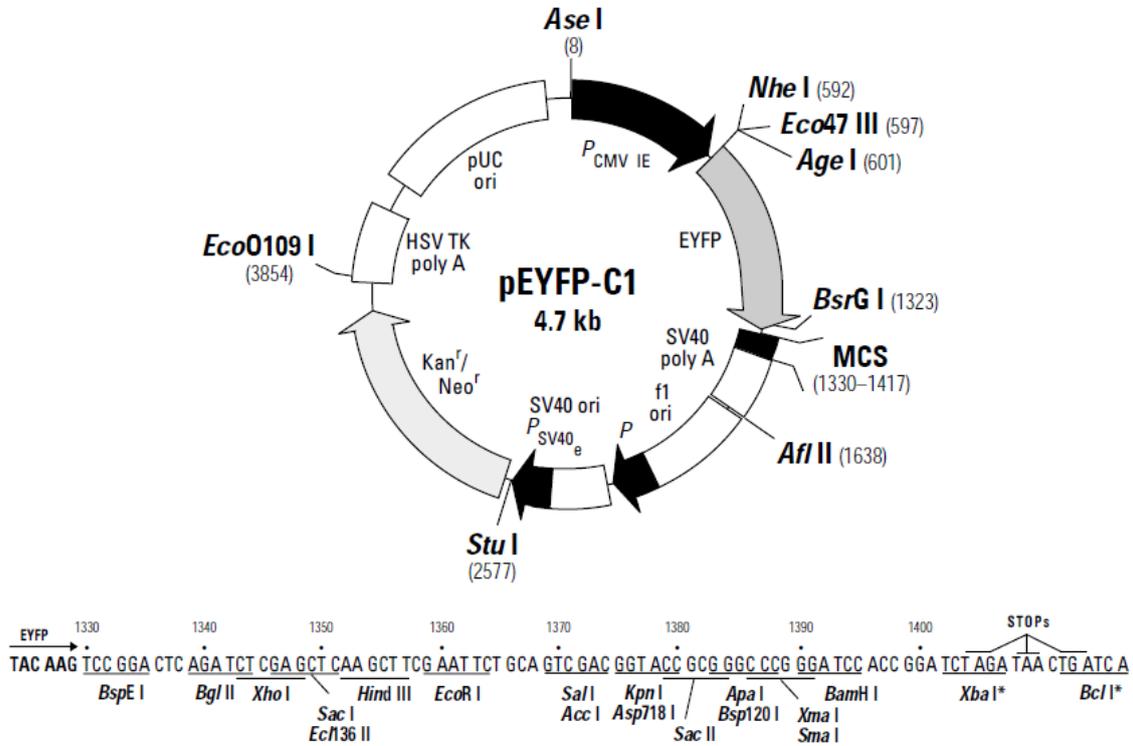
pECFP-N1

Vektor zur Expression in Säugerzellen für Fluoreszenzanalysen. Enthält Sequenz für ECFP, CMV-Promotor und Resistenzkassette für Kanamycin und Neomycin.



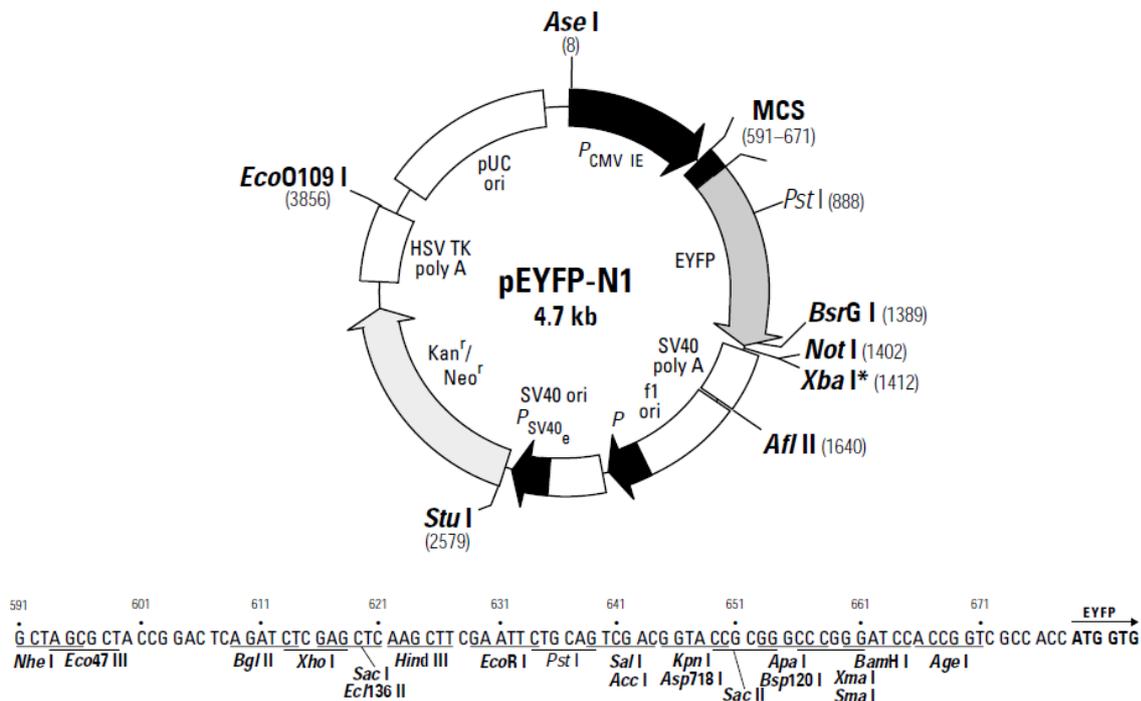
pEYFP-C1

Vektor zur Expression in Säugerzellen für Fluoreszenzanalysen. Enthält Sequenz für EYFP, CMV-Promotor und Resistenzkassette für Kanamycin und Neomycin.



pEYFP-N1

Vektor zur Expression in Säugerzellen für Fluoreszenzanalysen. Enthält Sequenz für EYFP, CMV-Promotor und Resistenzkassette für Kanamycin und Neomycin.



2.1.6 Oligonukleotide

Primer für die Amplifikation des *full-length* Androgenrezeptors (AR-f) und des N-terminal verkürzten Androgenrezeptors (AR-DNL):

Primer für pEYFP/ECFP-C1:

hAR-f-YFP-C- <i>Xho</i> I-for	5'- GCTACTCGAGCTATGGAAGTGCAGTTAGGGCTG -3'
hAR-DNL-YFP-C- <i>Xho</i> I-for	5'- GCTACTCGAGCTCAGAAGACCTGCCTGATCTG -3'
hAR-YFP- <i>Xho</i> I-for	5'- GCTACTCGAGCTCAGAAGACCTGCCTGATCTG -3'
hAR-YFP-C- <i>Bam</i> HI-rev	5'- CACTTGGATCCTCACTGGGTGTGGAAATAGATGG -3'

Primer für pEYFP / ECFP-N1:

hAR-f-YFP-N- <i>Xho</i> I-for	5'- GCTACTCGAGACCATGGAAGTGCAGTTAGGGCTG -3'
hAR-DNL-YFP-N- <i>Xho</i> I-for	5'- GCTACTCGAGACCATGCAGAAGACCTGCCTGATCTG -3'
hAR-YFP- <i>Xho</i> I-for	5'- GCTACTCGAGACCATGCAGAAGACCTGCCTGATCTG -3'
hAR-YFP-N- <i>Bam</i> HI-rev	5'- CACTTGGATCCTGGGTGTGGAAATAGATGG -3'

Primer für die Mutagenese:

ARmut-for	5'- GTGGAGATGAAGCTTCTGGGTGTCACTATGGAGC -3'
ARmut-rev	5'- GCTCCATAGTGACACCCAGAAGCTTCATCTCCAC -3'

2.1.7 Antikörper

Primärantikörper:

Anti-AR (Kaninchen)	Millipore, Billerica, USA
Anti-AR (Kaninchen)	Epitomics, Burlingame USA
Anti-GFP (Maus)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-PrLZ (Kaninchen)	IMBM, Greifswald
Anti-Prdx1 (Maus)	AbFrontier, Seoul

Sekundär-Antikörper:

anti-Kaninchen IgG-HRP	Cell Signaling, Frankfurt/Main
anti-Maus IgG-HRP	Cell Signaling, Frankfurt/Main
anti-Maus Cy TM 2-gekoppelt	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen Cy TM 3-gekoppelt	Dianova, Hamburg

2.1.8 Software

ImageJ National Institute of Health	Bethesda USA
ViewPixControl	Biostep GmbH, Jahnsdorf

2.2 Methoden**2.2.1. Zellkultur und Bakterienkultur****Kultivierung von LNCaP-Zellen**

Für die Experimente wurden die Zellen in Kulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ in 75cm²-Flaschen kultiviert und zweimal pro Woche passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5ml PBS gewaschen, um sie anschließend mit 2ml Trypsin für 3min bei 37°C abzulösen. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe von 10ml Kulturmedium herabgesetzt und die Zellen dabei in Suspension gebracht. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1500rpm für 5min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit Kulturmedium resuspendiert. Die benötigte Zellmenge wurde anteilig im Verhältnis 1:4 bis 1:5 in eine neue Zellkulturflasche mit 20ml Kulturmedium gegeben. Für Versuche unter Androgen-Ablationsbedingungen erfolgte bis zur Zentrifugation das Passagieren analog wie oben beschrieben, mit Ausnahme, dass das Zellpellet mit androgenfreiem Medium resuspendiert wurde. Dieses Medium beinhaltet mit Aktivkohle gefiltertes Serum, wodurch Steroidhormone entfernt wurden. Die Kultivierung der Zellen in diesem Medium konnte je nach Notwendigkeit von unterschiedlicher Dauer sein, mussten jedoch trotzdem zweimal in der Woche passagiert werden. Sollten Stimulationsversuche mit Androgenen durchgeführt werden, wurde je nach Versuch die benötigte Menge an DHT oder synthetischem Androgen (R1881) zum Medium hinzugefügt.

Aussähen und Fixierung von Zellen

Für die FRET-Analysen mussten Zellen ausgesät, transfiziert und fixiert werden. Hierzu wurden LNCaP-Zellen auf Deckgläschen gebracht, welche zuvor in 6-Well Platten platziert wurden. Zum besseren Anwachsen der Zellen wurden die Deckgläschen vorher mit Kollagen I oder Fibronectin beschichtet. Auf jedes Deckgläschen wurden ca. 100µl der Beschichtungslösung aufgetragen, 30min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend abgenommen. Anschließend wurden ca. 50.000-100.000 Zellen auf die Deckgläschen pipettiert und 10min inkubiert, damit die Zellen sich auf der Glasoberfläche absetzen konnten. Im nächsten Schritt wurden die restlichen 2,5ml Medium dazugegeben. Nach der Kultivierung erfolgte die Fixierung der Zellen. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten auf einer Metallplatte die in Eis eingebettet war und alle verwendeten Lösungen waren eisgekühlt (Ausnahme: Medium zum Eindecken). Um die Zellen zu fixieren wurde das Medium abgenommen und danach die Zellen 2-3x kurz mit 1x PBS gewaschen. Die anschließende Fixierung erfolgte über 30min mit 4% PFA. Nach dem Absaugen des PFA wurde die Zellen 3x 5min mit 1x PBS gewaschen. Abschließend wurden die Deckgläschen mit den Zellen nach unten zeigend auf einen Objektträger mit einem Tropfen *Mowiol* eingedeckt.

Zelllinien LNCaP (DSMZ, Braunschweig), HEK293 (DSMZ, Braunschweig)
 Kulturmedium HEK293: DMEM *low glucose* (1g/l) + Glutamin, 10% h.i. FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin (100 x),
 Kulturmedium LNCaP: RPMI 1640 Medium mit Phenolrot, + Glutamin, + 2 g/l NaHCO₃, 20% h.i. FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin (100 x)
 Kulturmedium LNCaP (Adrogen-Ablation) RPMI 1640 ohne Phenolrot, + Glutamin, + 2g/l NaHCO₃, 10% *charcoal-treated* FCS, 1% Penicillin/Streptomycin
 R1881: 1µM in DMSO; DHT: 1µM in Ethanol
 Trypsin (2x): 10x Trypsin im Verhältnis 1:5 in EDTA
 1x PBS: 137mM NaCl, 12,6mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 2,68mM KCl, 1,76mM KH₂PO₄ in A. bidest
 Kollagen I Lösung: 0,15ml Kollagenlösung (3,34mg/ml) in 10ml 0,02N Essigsäure
 Fibronectin-Lösung: 0,25ml Fibronectin-Lösung (1mg/ml) in 10ml PBS
 PFA-Lösung: 4% v/v p-Formaldehyd, 1 Tropfen 4M NaOH-Lösung, in 1x PBS
 Mowiol: 2,4g Mowiol, 6g Glycerol, 6ml A.bidest, 12ml 0,2M Tris, pH 8,5

Anzucht von *Escherichia coli* (E. coli) XL-1 blue

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in LB-Medium, welches je nach Resistenzkassette des transformierten Plasmides mit Kanamycin oder Ampicilin versetzt wurde. Ebenfalls wurde Tetracyclin wegen der chromosomalen Resistenz des verwendeten Bakterienstammes *E.coli* XL1-blue hinzu gegeben. In ein steriles 13ml Röhrchen wurden 3ml LB-Medium gegeben und dieses mit einem Klon einer Agarplatte oder der Bakteriensuspension einer Glycerolkultur versetzt. Anschließend wurde der Ansatz für 12-16h bei 37°C und 250rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Zur Isolation der Plasmide wurden entsprechende Isolationskits verwendet. Für eine größere Menge an Plasmiden wurde eine 3ml Vorkultur (wie oben

beschrieben) angesetzt, aus der im Verhältnis 1:1000 ein Erlenmeyerkolben mit 100ml LB-Medium (+ Antibiotika) angeimpft und anschließend unter denselben Bedingungen inkubiert wurde.

Transformation in kompetente *E. coli XL-1 blue*

Die zur Verfügung gestellten hitzeschockkompetenten Bakterien (100µl pro Transformation) mussten auf Eis auftauen und wurden mit 3-5ng des Plasmides versetzt.

Es folgte eine 30min Inkubation auf Eis, mit anschließendem Hitzeschock für 45s bei 42°C. Nach dem Hitzeschock wurden dem Ansatz 800µl LB-Medium zugesetzt und der gesamte Ansatz in ein steriles 13ml Röhrchen überführt um 1h bei 37°C im Schüttler zu inkubieren. In der Zwischenzeit wurde flüssiger LB-Agar mit Tetracyclin und Ampicilin versetzt und 20ml Agar in eine Petrischale gegossen. Die *E.coli*-Suspension wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und 3min bei 3000rpm zentrifugiert, der Überstand bis auf 100µl verworfen und das Pellet in mit dem restlichen Medium resuspendiert. Auf die vorbereiteten Agarplatten wurde die Bakteriensuspension ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der transformierte Vektor enthält eine bestimmte Antibiotikaresistenzkassette und der verwendete *E.coli-XL1-blue* Stamm eine chromosomale Tetracyclinresistenz. Durch die Resistenzen und Antibiotikazusätze wurde sichergestellt, dass die gewachsenen Kolonien das Plasmid aufgenommen haben und so die gewünschten Klone selektieren konnte. Die Gewinnung einzelner Kolonien erfolgte mit einer desinfizierten Pipette und aufgesetzter 100µl Spitze, welche in ein steriles Röhrchen mit 3ml LB-Medium überführt wurden um anschließend über Nacht bei 37°C zu inkubieren. Durch das exponentielle Wachstum der Bakterien wurde der Vektor angereichert und konnte isoliert werden.

Ausstreichen von Bakterien

Um Bakterien zu selektieren und kurzfristig aufzubewahren, wurden diese auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Dazu wurde der flüssige Agar wie oben beschrieben mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und ca. 20ml LB-Agar in eine 10cm Petrischale gegossen. Nach dem Aushärten des Agars, wurden entweder ca. 100µl Bakteriensuspension mit einem abgeflamten Drigalskispatel ausplattiert oder mit einer Impföse die Kultur auf die Platten gebracht. Die bestrichenen Platten mussten anschließend für 12-16h bei 37°C in den Brutschrank und waren danach für ca. 4 Wochen bei 4°C haltbar.

Anlegen von Glycerolkulturen

Zum Konservieren von Bakterienklonen für einen längeren Zeitraum wurden Glycerolkulturen angelegt. Hierzu wurden in ein Kryoröhrchen 400µl LB-Medium, 400µl Bakteriensuspension und 200µl Glycerol gegeben, resuspendiert und anschließend kurz in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte dann bei -80°C.

LB-Medium: 0,5% w/v Hefeextrakt, 1% w/v Trypton, 85mM NaCl in A. bidest, autoklaviert

Antibiotika: Ampicillin 50µg/ml, Kanamycin 30µg/ml, Tetracyclin 12µg/ml

E. coli XL1 Blue: Rec A1 end A1 gyr A96 thi-1 hsdR17 supE44 rel A1 lac [F pro AB lacIqZΔM 15 Tn10 (Tetr)]
(Stratagene, Amsterdam)

2.2.2 Klonierung

Das exponentielle Wachstum von Bakterien ermöglicht es, transformierte Vektoren schnell anzureichern und damit verbunden bestimmte DNA-Fragmente in ausreichenden Mengen zu generieren. Dazu wird das gewünschte DNA-Fragment in einen Vektor eingefügt und dieser Vektor in *E. coli* transformiert. Der folgende Abschnitt beschreibt, wie die cDNA-Sequenz des Androgenrezeptors (AR) und eine N-terminal verkürzte Variante (AR-DNL) in die Vektoren pECFP-C1, pECFP-N1, pEYFP-C1, pEYFP-N1 kloniert wurde. Die Verwendung des Inserts (hAR) als Wildtyp für die Klonierung mit den Fluoreszenzvektoren war im bereits vorhandenen Plasmid (pcDNA3.1(+)-hAR) aufgrund einer Punktmutation nicht möglich. Deshalb musste das vorhandene Plasmid zuvor durch eine gezielte Mutagenese zum Wildtyp korrigiert werden. Die Korrektur der Mutation und Amplifikation des DNA-Fragments wurde mit Hilfe der PCR und den entsprechend gewählten *Primern* durchgeführt. In Tab. 1 ist die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und in Tab. 2 das PCR-Programm abgebildet. Die Degradierung der methylierten *template*-DNA erfolgte mittels Verdau durch das Enzym *DpnI*. Die Tab. 3 zeigt die Zusammensetzung des Verdauansatzes. Um die amplifizierte Fragmentgröße zu kontrollieren, wurde mit 5µl des Verdauansatzes eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt (siehe Agarose-gelelektrophorese). Zur Anreicherung des Plasmides, wurden 20µl des PCR-Produktes in kompetente *E. coli* transformiert (siehe Transformation von Bakterien, oben, S. 22). Die Plasmidisolierung erfolgte nach dem Protokoll des *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit 1* von peqlab oder nach dem Protokoll *NucleoBond® Xtra Midi* von MACHEREY-NAGEL. Im Anschluss der Isolation wurde mit dem *NanoDrop* die Plasmidkonzentrationen bestimmt. Eine Kontrollspaltung des Vektors pcDNA3.1(+)-hAR-wt diente zur Überprüfung der Insertgröße und Schnittstellen (siehe Kontrollspaltung des Vektors). Die sich anschließende Bestätigung der erfolgreichen Mutagenese erfolgte durch Sequenzierung des Vektors durch die Firma Seqlab (Göttingen). Mit diesem Vektor wurde im nächsten Schritt die hAR-f- und hAR-DNL-Sequenz mit einer weiteren PCR vervielfältigt (siehe PCR zur Amplifikation). Mittels Agarosegelelektrophorese erfolgte eine Kontrolle der PCR-Produkte, welche anschließend aufgereinigt wurden. Dafür wurde der *QIAquick® PCR Purification Kit* von QIAGEN nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Sequenzen hAR-f und hAR-DNL wurden zur Vorbereitung für die Ligation mit den Enzymen *XhoI* und *BamHI* geschnitten (siehe Restriktionsspaltung der PCR-Amplifikate S. 28). Eine Agarosegelelektrophorese diente zur Kontrolle des Restriktionsverdaus. Wurden in diesem Gel mehrere Banden gesehen, konnte der Ansatz nicht komplett weiterverwendet werden. Es folgte dann mit dem gesamten verbliebenen Ansatz eine weitere Agarosegelelektrophorese.

Aus dem entstandenen Gel wurde das richtige PCR-Produkt (anhand der Größe) aus dem Gel nach dem Protokoll des *QIAquick® Gel Extraction Kit* von Qiagen isoliert und abschließend mit den Zielvektoren (ECFP/EYFP) ligiert (siehe Ligation S. 29). Die neu generierten Vektoren wurden in kompetente *E. coli XL1-blue* transformiert und auf Agarplatten ausgestrichen (siehe Ausstreichen von Bakterien S 22). Die entstandenen Klone wurden isoliert und in LB-Medium aufgenommen (siehe Anzucht von *E. coli* S. 21). Die Überprüfung der Klone erfolgte wie im Abschnitt „PCR zur Testung positiver Klone S. 29“ beschrieben mit Hilfe einer PCR. Hierzu wurde ein nur 176bp großer Teil des Inserts amplifiziert und mittels Agarosegelelektrophorese nachgewiesen. In LB-Medium wurden dann, wie oben beschrieben, alle positiven Klone angereichert und anschließend die Plasmide isoliert. Die Sequenzierung der Inserts erfolgte wieder durch die Firma SeqLab (Göttingen). Die PrLZ-Konstrukte, welche für die FRET-Analysen notwendig sind, wurden zur Verfügung gestellt, weshalb hier keine Klonierungsarbeiten notwendig waren. Bei der Bezeichnung der Konstrukte wird alternativ zum PrLZ das Synonym PC1 verwendet.

Tab. 1: Zusammensetzung des PCR-Mutageneseansatzes

50ng	Plasmid- <i>template</i> pcDNA3.1(+)-hAR
10µl	5x <i>Phusion GC Puffer</i>
3µl	10mM dNTP
2µl	10µM <i>Primer-forward</i>
2µl	10µM <i>Primer-revers</i>
0,5µl	<i>Phusion-Polymerase</i>
1,5µl	DMSO
ad. 50µl	A. bidest

Tab. 2: PCR-Mutagenese-Programm für den Thermocycler

Schritt	Vorgang	Temperatur	Zeit
1	Initiale Denaturierung	95°C	60s
2	Denaturierung	95°C	50s
3	<i>Annealing</i> der <i>Primer</i>	58°C	50s
4	<i>Elongation</i>	68°C	10min
5		Wdh. Schritt 2-4	18x
6	Finale <i>Elongation</i>	68°C	15min
7	Kühlung	10°C	∞

Tab. 3: Ansatz für *DpnI* Verdau (40µl Ansatz)

25µl	PCR-Produkt
4µl	10x Puffer (FastDigest-Fermentas)
4µl	10x BSA
0,5µl	<i>DpnI</i> (FastDigest-Fermentas)
6,5µl	A. bidest
Inkubation 1h bei 37°C	

Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet. Die Auftrennung der Größe nach ermöglicht es ebenfalls bestimmte Fragmente aus dem Gel auszuschneiden und diese aufzureinigen. Der zunächst feste Agar wird erhitzt und verflüssigt. Der flüssige Agar wird mit der interkalierenden Substanz *RedSafe*TM versetzt, welche unter UV-Licht die Nukleinsäuren sichtbar macht. Der Agar wird in einen Gelträger gegossen und ein Kamm eingesetzt. Die aufzutragenden Proben wurden mit 1/6 6x *Loading-Dye* versetzt. Nach dem das Gel polymerisiert war, wurde der Gelträger in die Laufkammer überführt und diese mit 1x TAE gefüllt, der Kamm entfernt und die Proben aufgetragen. Um nach der Auftrennung die Fragmentgröße bestimmen zu können, wurde eine Spur mit 7µl *GeneRuler*TM *DNA Ladder Mix* aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80V. Anschließend konnten unter UV-Licht der Wellenlänge 312nm die Nukleinsäuren sichtbar gemacht werden.

Agarosegel (0,8%/1%/1,5%): 0,4/0,5/0,75g Agarose in 50ml 1x TAE aufgekocht, 8µl *RedSafe*TM
 1x TAE: 40mM Tris, 1,26mM EDTA, 0,114% v/v Essigsäure in A. bidest
 6x Saccharose-Stopper: 120mM EDTA, 15% Saccharose, 0,15% Bromphenolblau

Kontrollspaltung vom Vektor pcDNA3.1(+)-hAR-wt

Zur Kontrolle der Insertgröße sowie zur Überprüfung der Schnittstellen wurde eine Kontrollspaltung des Plasmides pcDNA3.1(+)-hAR-wt durchgeführt. In Tab. 4 ist die Zusammensetzung des Ansatzes abgebildet, der 1h bei 37°C inkubiert und danach in einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt wurde.

Tab. 4: Pipettierschema für die Kontrollspaltung vom isolierten pcDNA3.1(+)-hAR-wt Vektor

2µl	10x Enzym-Puffer (FastDigest-Fermentas)
0,5µl	<i>Bam</i> HI (FastDigest-Fermentas)
0,5µl	<i>Xho</i> I (FastDigest-Fermentas)
500ng	Plasmid-DNA
ad 20µl	A.bidest

PCR zur Amplifikation (AR-f und AR-DNL)

Mittels PCR wurden die Sequenzen hAR-f und hAR-DNL vervielfältigt, um sie anschließend in die EYFP/ECFP-Vektoren einzufügen. Für die PCR waren verschiedene Primer notwendig, da die Fusion der hAR-Proteinsequenzen sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus der ECFP- bzw. EYFP-Proteine erfolgte. Die Tab. 5 zeigt das Pipettierschema für die PCR-Ansätze zur Amplifikation der AR-f- und AR-DNL-Sequenz und in Tab. 6 ist die genaue *Primer*-Bezeichnung für die jeweiligen Konstrukte gelistet, in Tab. 7 wiederum das PCR-Programm aufgeführt, für die PCR wurden jeweils 50µl Ansätze verwendet.

Tab. 5: PCR-Ansatz für Amplifikation AR-f und AR-DNL für Klonierung in pEYFP-N1/pECFP-N1/pEYFP-C1/pECFP-C1

30,5µl	A.bidest
10µl	5x Phusion-GC-Puffer
1µl	10mM dNTP-Mix
2,5µl	10µM <i>Primer-for</i>
2,5µl	10µM <i>Primer-rev</i>
6ng	pcDNA3.1(+)-hAR-wt
0,5µl	Phusion-Polymerase

Tab. 6: Liste der *Primer* für die Amplifikation von AR-f und AR-DNL

Fusion	Benötigte Primer
AR-DNL in pEYFP-N1/pECFP-N1	<i>hAR-DNL-YFP-N-for</i> <i>hAR-YFP-N-BamHI-rev</i>
AR-DNL in pEYFP-C1/pECFP-C1	<i>hAR-DNL-YFP-C-for</i> <i>hAR-YFP-C-BamHI-rev</i>
AR-f in pEYFP-N1/pECFP-N1	<i>hAR-f-YFP-N-for</i> <i>hAR-YFP-N-BamHI-rev</i>
AR-f in pEYFP-C1/pECFP-C1	<i>hAR-f-YFP-C-for</i> <i>hAR-YFP-C-BamHI-rev</i>

Tab. 7: PCR-Programm zur Amplifikation der AR-f- und AR-DNL-Konstrukte für die Klonierung

Schritt	Vorgang	Temperatur	Zeit
1	Initiale Denaturierung	98°C	30s
2	Denaturierung	98°C	10s
3	<i>Annealing der Primer</i>	60°C	20s
4	<i>Elongation</i>	72°C	1,5min (AR-f Sequenz) 40s (AR-DNL Sequenz)
5		Wdh. Schritt 2-4	30x
6	Finale <i>Elongation</i>	72°C	5min
7	Kühlung	8°C	∞

Restriktionsspaltung der PCR-Amplifikate AR-f und AR-DNL

Mit dem *QIAquick® PCR Purification Kit* von *QIAGEN* wurden die PCR-Produkte (AR-f und AR-DNL) aufgereinigt und 30µl des Eluates für die Restriktionsspaltung eingesetzt. Für die Spaltung wurden *FastDigest*-Enzyme von *Fermentas* und der entsprechende Puffer verwendet. Die Ansätze wurden mit 5µl 10x Puffer, 0,5µl *XhoI* Enzym, 0,5µl *BamHI* Enzym versetzt und alles mit A. bidest. auf 50µl aufgefüllt. Die Spaltung erfolgte bei 37°C für 1h.

Ligation

Um die Ligation von Insert und Plasmid zu erleichtern, wurden gleiche Schnittstellen bei den Inserts und Vektoren geschaffen. Hierzu wurden ebenfalls die Zielvektoren mit den Enzymen *XhoI* und *BamHI* einem Restriktionsverdau unterzogen und danach dephosphoryliert. Die benötigten Vektoren für die Ligation (ECFP/EYFP) standen vorab schon zu Verfügung. In diese Vektoren wurden durch Einfügen der DNA-Fragmente (*AR-full* und *AR-DNL*) die gewünschten Konstrukte generiert. Die Menge an PCR-Produkt, die für 50ng Plasmid benötigt wurde, berechnet sich nach dieser Formel:

Der ermittelte Wert musste mit dem Faktor 3 multipliziert werden, da das Verhältnis PCR-Produkt zu Plasmidmenge 3:1 betrug. Zusätzlich kamen bei einem 10µl Ansatz noch 1µl 10x Ligationspuffer und 0,5µl T4 DNA-Ligase hinzu. Der Ansatz musste 1h bei Raumtemperatur inkubieren.

PCR zur Testung positiver Klone

Die Kontrolle positiver Klone erfolgte mittels einer PCR. Die Bakterien wurden direkt zum Ansatz gegeben und durch die hohen Temperaturen während der PCR lysiert. Als Negativkontrolle wurde *A. bidest*, als Positivkontrolle 2ng pcDNA3.1-AR(wt) in den Ansatz gegeben. Die Tab. 8 zeigt die Zusammensetzung des Ansatzes und Tab. 9 das entsprechende PCR-Programm.

Tab. 8: PCR-Ansatz zur Testung positiver Klone. Die Angaben beziehen sich auf die Verwendung von *Innu-Taq*-Polymerase von Analytik-Jena

16,25µl	<i>A. bidest</i>
2,5µl	10x Puffer (ohne Mg ²⁺)
1,5µl	25mM MgCl ₂
0,5µl	dNTPs (10mM)
1µl	Primer hAR-2793-for
1µl	Primer hAR-2968-rev
2µl (vorlegen)	Taq-Polymerase (5U/µl)
0,25µl	<i>E. coli</i> -Kultur/ <i>A. bidest</i> (neg. K.)/ Plasmid (pos. K.)

Tab. 9: PCR-Programm zur Testung positiver Klone

Schritt	Vorgang	Temperatur	Zeit
1	Initiale Denaturierung	95°C	2min
2	Denaturierung	95°C	15s
3	Annealing der Primer	60°C	20s
4	Elongation	72°C	15s
5		Wdh. Schritt 2-4	30x
6	Finale Elongation	72°C	5min
7	Kühlung	8°C	∞

In Tab. 10 sind alle verwendeten Konstrukte aufgelistet. Die Tabelle gibt sowohl einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Konstrukte, als auch über diejenigen, welche zur Verfügung gestellt wurden.

Tab. 10: Liste der verwendeten Konstrukte

Kloniert	Gestellt
CFP-C-AR-DNL	CFP-N-PC1 , IMBM Greifswald
CFP-C-AR-full	YFP-N-PC1 , IMBM, Greifswald
CFP-N-AR-DNL	CFP-C-Prdx1 , IMBM, Greifswald
CFP-N-AR-full	YFP-C-Prdx1 , IMBM, Greifswald
YFP-C-AR-DNL	CFP-YFP (+) Kontr. , AG Schindler Heinrich-Pette-Institut, Hamburg
YFP-C-AR-full	
YFP-N-AR-DNL	
YFP-N-AR-full	

2.2.3 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Die Transfektion von LNCaP-Zellen erfolgte nach Protokoll von *jetPEI™ DNA TRANSFECTION* von Polyplus-transfection™ oder nach dem Protokoll von *pegFECT DNA Transfection Reagent* von peqlab.

2.2.4 Proteingewinnung und -bestimmung

Zellyse mit *TriFAST™*

Die *TriFAST™* Präparation ermöglicht es, aus Gewebeproben und Zellen Proteine genomische DNA und RNA zu gewinnen. In den nachfolgenden Schritten beziehen sich alle Volumina auf die Präparation einer 3,5cm Schale. Jeder Zentrifugationsschritt wurde bei 4°C und jeder Inkubationsschritt bei RT durchgeführt. Nachdem die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen wurden, erfolgte die Zugabe von 1ml *TriFAST™* und die Inkubation für 5min. Mithilfe eines Zellschabers wurde das Lysat abgelöst und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 200µl Chloroform hinzugegeben und jede Probe sofort 15s invertiert. Nach 3min auf dem Rollinkubator wurden die Proben unter Zentrifugation (15min bei 12.000 x g) in drei Phasen aufgeteilt: in eine obere, wässrige Phase mit RNA, eine Interphase mit genomischer DNA und einer unteren, organischer Phase mit den gelösten Proteinen. Zur Fällung der RNA wurde die wässrige Phase in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5ml Isopropanol versetzt und mehrfach invertiert. Anschließend wurden die Proben 10min inkubiert und danach bei 12.000 x g für 10min zentrifugiert. Das entstandene RNA-Pellet wurde zweimal mit je 1ml 75% Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet. Nach jedem Waschschrift wurden die Proben 5min bei 7.500 x g zentrifugiert. Das getrocknete RNA-Pellet wurde zum Schluss der Präparation mit 30–50µl DEPC-Wasser versetzt und bei 4°C für 2–3h kühl gelagert, um für weitere Versuche verwendet zu werden. Die zurückgebliebene Interphase und organische Phase wurden zur Fällung der genomischen DNA verwendet. Die Proben wurden mit 0,3ml Ethanol versetzt und sofort invertiert. Nach 2-3min Inkubation auf dem Rollinkubator fiel die DNA deutlich sichtbar aus. Anschließend wurden die Proben bei 12.000 x g zentrifugiert und der Überstand mit den gelösten Proteinen auf zwei neue 2ml Reaktionsgefäße überführt. Das DNA-Pellet wurde verworfen. Zur Fällung der Proteine wurden die Proben mit je 0,75ml Isopropanol versetzt und sofort invertiert. Nach 10min Inkubationszeit wurde die Probe 5min bei 12000 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand entfernt. Das zurückgebliebene Protein-Pellet wurde viermal je 20min mit 1,5ml 0,3M Guanidinium-HCl-Lösung gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Proben 2min bei 12000 x g zentrifugiert und der

Überstand verworfen. Am Ende der Präparation wurde das Protein-Pellet noch zweimal je 20min mit 1,5ml Ethanol gewaschen und stand nach dem letzten Waschschrift für weitere Versuche zur Verfügung.

1x PBS: 137mM NaCl, 12,6mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 2,68mM KCl, 1,76mM KH₂PO₄ in A. bidest
DEPC-Wasser: 0,1% DEPC in A. bidest
2D-Lysispuffer: 8M Harnstoff, 2M Thioharnstoff, 4% CHAPS, 40mM Tris Base, 65mM DTT
Guanidinium-HCl-Waschpuffer: 0,3M Guanidinium-HCl in 95% EtOH

Präparation mit NP40-Lysispuffer

Zu Beginn wurden die Zellen bis zu dreimal mit 5ml PBS gewaschen. Für eine 3,5cm Schale wurde, an die Dichte des Zellrasens angepasst, zwischen 80-100µl NP-40-*complete* Lysispuffer hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und die entstandene Suspension in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen bei -80°C eingefroren und anschließend aufgetaut. Die lysierten Zellen wurden bei 12.000 x g und 4°C sedimentiert und der Überstand als Proteinextrakt verwendet. Mittels einer modifizierten *Bradford*-Methode konnte zum Schluss die Proteinkonzentration in der Lösung bestimmt werden (Bradford, 1976).

NP40-Lysispuffer: 50mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 0,1% v/v NP-40, 0,5% w/v *CompleteTMMini* (optional) in A. bidest

Proteinbestimmung nach *Bradford*

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen eignet sich die Methode nach *Bradford*. Hierbei nutzt man das veränderte Absorptionsmaximum des *Coomassie-brilliant-blue* G-250 Farbstoffes bei Bindung von Proteinen (465nm ohne Protein, 595nm mit Protein). Mithilfe einer BSA-Lösung mit bekannter Proteinkonzentration wurde eine Standardkurve erstellt, an der die Proteinmenge, gemessen bei 595nm, ermittelt werden konnte (Bradford, 1976). Eine Übersicht über das Pipettierschema ist in Tab. 11 abgebildet. Im Verhältnis 1:5 oder 1:10 wurden die Proben verdünnt und anschließend 2µl der Verdünnung zu 18µl A. bidest. hinzugegeben. Der Ansatz wurde mit 300µl Bradford-Lösung versetzt und nach 10min Inkubation am *Infinite[®] M200 NanoQuant* bei 595nm die Absorption gemessen. Die Standardreihe und alle Proben wurden in Triplikaten gemessen.

Tab. 11: Pipettierschema für die *Bradford*-Standardkurve

BSA-Proteinmenge (μg)	A. bidest	BSA-Stamm-lösung (0,2mg/ml)	verwendeter Puffer	Bradford-Lösung
0	18 μl	-	2 μl	300 μl
0,4	16 μl	2 μl	2 μl	300 μl
0,8	14 μl	4 μl	2 μl	300 μl
1,2	12 μl	6 μl	2 μl	300 μl
1,6	10 μl	8 μl	2 μl	300 μl
2,0	8 μl	10 μl	2 μl	300 μl
2,4	6 μl	12 μl	2 μl	300 μl
2,8	4 μl	14 μl	2 μl	300 μl

Bradford- Reagenz: 0,1% w/v *Coomassie Blue G250*, 5% v/v Ethanol, 8,5% v/v Phosphorsäure, in A.bidest

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine bilden in Verbindung mit SDS in einem bestimmten Verhältnis einen negativ geladenen Komplex, der proportional zur Masse des Proteins ist. Dadurch lassen sich die Proteine in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Molekulargewichte auftrennen. Für dieses Trennverfahren wurden Polyacrylamidgele als Matrix verwendet, die mit SDS versetzt sind. Große Proteine werden durch das molekulare Maschennetz stärker am Wandern gehindert als kleine (Laemmli, 1970). Die verwendeten Gele bestanden aus einem Trenn- und Sammelgel, die nacheinander in die Gelkammern gegossen wurden. Die Trenngellösung wurde (Tab. 12) nach der Herstellung in die Glaskammer gegossen und musste bei Raumtemperatur mindestens 30min polymerisieren. Anschließend wurde auf das Trenngel die Sammelgellösung (Tab. 12) aufgetragen und ein Kamm zur Ausbildung von Taschen ins Sammelgel gesteckt. Das Sammelgel musste ebenfalls bei Raumtemperatur mindestens 30min polymerisieren.

Tab. 12: Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel

Trenngel (12%)	Sammelgel (4%)
3,3ml A. bidest	2,8ml A. bidest
2,5ml Trenngelpuffer	1,25ml Sammelgelpuffer
4,0ml Acrylamid	750 μl Acrylamid
0,1ml 10% SDS	50 μl 10% SDS
50 μl 10% APS	50 μl 10% APS
5 μl TEMED	5 μl TEMED

Nach der Polymerisation wurde die Gelkammer in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit 1x SDS-Laufpuffer aufgefüllt. In die Probenaschen wurden 20µl Volumen aufgetragen. Dafür werden 20µg der Proben mit 5µl 4x Probenpuffer versetzt und mit NP40-Puffer auf 20µl aufgefüllt. Anschließend wurden die vorbereiteten Proben für ca. 5min bei 97°C erhitzt und mit dem Marker zusammen nach dem Abkühlen aufgetragen. Die Zusammensetzung des Markers bestand aus 5µl *Prestained*-Marker, 4µl 4x Probenpuffer und 11µl NP40-Probenpuffer. Zunächst erfolgte die Elektrophorese für 15min bei 120V und anschließend für 60-90min bei 150V.

SDS-PAGE-Laufpuffer: 192mM Glycin, 24,8mM Tris, 0,1% SDS

4x Proteinprobenpuffer: 500mM Tris-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 20% Glycerol, 4% Mercaptoethanol, 0,02%

Bromphenolblau

Sammelgelpuffer: 0,5M Tris-HCl (pH 6,8)

Trenngelpuffer: 1,5M Tris-HCl (pH 8,8)

Western-Blotting

Beim *Western-Blotting* werden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern Proteine detektiert, welche zuvor von einem Acrylamidgel auf eine Zellulosemembran transferiert wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde das *semidry*-Verfahren verwendet. Die Proteine, die zuvor über SDS-PAGE in einem Gel aufgetrennt wurden, wurden auf einer Membran fixiert (Pingoud und Urbanke, 1997). Im ersten Schritt wurde das Acrylamidgel aus der Gelkammer gelöst und das Sammelgel entfernt. Das Gel und 4 Lagen Whatman-Filterpapier wurden anschließend für 5min in Kathodenpuffer getaucht. Weitere 4 Lagen Filterpapier sowie die Nitrozellulosemembran wurden in Anodenpuffer getaucht (5min). Entsprechend des schematischen Aufbaus (Abb. 8) wurden die Komponenten zusammengesetzt und durch den angelegten Stromfluss in 1h die Proteine auf die Membran transferiert. Die Stromstärke wurde der Membrangröße angepasst und betrug $1\text{mA}/\text{cm}^2$. Zur Prüfung der Transfereffizienz und Fixierung der Proteine auf der Membran wurde die Membran für 1-2min in 15ml *Ponceau-S*-Lösung gefärbt. Durch dreimaliges Waschen mit *A.bidest.* wurde überschüssiges *Ponceau-S* entfernt.

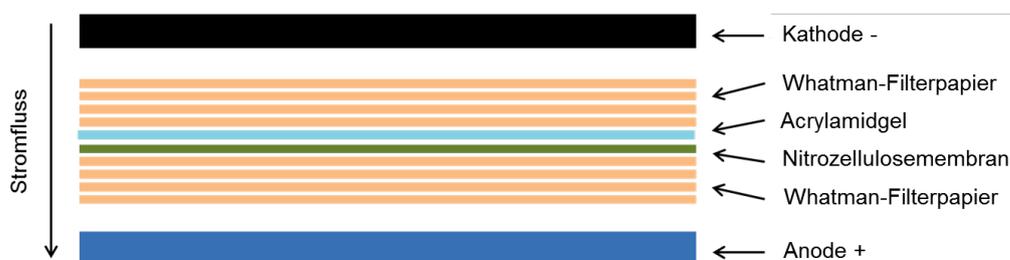


Abb. 8: Schematischer Aufbau eines *Western-Blot*

Roti®-Blot A: 10% *Roti®-Blot A* in 20% Methanol

Roti®-Blot K: 10% *Roti®-Blot K* in 20% Methanol

Ponceau S-Lösung: 2% w/v *Ponceau S*, in 3% Trichloressigsäure

Immunologische Detektion von Proteinen

Zum Nachweis und zur Visualisierung der geblohteten Proteine wurden Primärantikörper verwendet. Die Antikörper erkennen das entsprechende Protein als ihr Antigen und binden daran. Im nächsten Schritt wurden HRP-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet, welche an die Primärantikörper binden und Substrate umsetzen können. Bei dieser Umsetzung wird Licht emittiert und dadurch ein Röntgenfilm geschwärzt. Im Anschluss an die *Ponceau-S* Färbung wurde die Membran für mind. 30min in 1x *Roti-Block* Lösung blockiert. Nach dem Waschen (3x je 5min) mit TBS-T wurde die Membran in 10ml Primärantikörperlösung (ca. 50cm²) für 30-90min bei Raumtemperatur inkubiert.

Entsprechend der benötigten Konzentration erfolgte die Ansetzung der Primärantikörperlösung in TBS-T Lösung mit 5% BSA und einer Spatelspitze NaN₃. Nach der Inkubation wurde erneut mit TBS-T 3x je 5min gewaschen und der Sekundärantikörper für mindestens 30min bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Der Sekundärantikörper wurde in 10ml 1x *Roti-Block* in der benötigten Konzentration gelöst. Die Membran wurde erneut 3x gewaschen (je 5min) und anschließend die Substratlösung dazugegeben. Diese Lösung wird durch das Enzym am Sekundärantikörper umgesetzt und emittiert dabei Licht, was zur Schwärzung eines Röntgenfilms führt. Als Substratlösung wurde entweder ECL-*Homemade* oder das sensitivere *Dura* verwendet. Nach Zugabe von 10ml ECL-*Homemade*-Lösung auf die Membran wurde für 5min auf dem Wippinkubator inkubiert. Bei Verwendung der *Dura*-Lösung musste das Substrat (1ml) 2min lang immer wieder auf die Membran pipettiert werden. Zur Detektion des Lichtsignals auf einem Röntgenfilm, wurde die überschüssige Substratlösung entfernt und die Membran zwischen zwei Folien in eine Fotokassette gelegt. Der anschließend aufgelegte Röntgenfilm musste in Abhängigkeit der Lichtsignalstärke zwischen 2-60min auf der Membran liegen. Anschließend wird der Film in Entwicklerlösung 2-3min geschwenkt, in *A. bidest.* gewaschen und in der Fixierlösung fixiert.

ECL-*Homemade*, *Solution A*: 0,1M Tris- HCl (pH 8,6), 14,1mM Luminol in *A. bidest*

ECL-*Homemade*, *Solution B*: 6,7mM para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO

Detektions-Lösung: 1ml *Solution A*, 100µl *Solution B*, 0,3µl 30% v/v H₂O₂

TBS-T: 0,14M NaCl, 20mM *Tris*-HCl, 0,1% *Tween* 20, pH 7,6

SuperSignal® West *Dura*: 0,5ml Peroxid-*Buffer* + 0,5ml *Enhancer Solution*

Antikörperlösungen: Primärantikörper: Anti-AR (1:5000), Anti-AR(C-Terminus) (1:5000), Anti-EGFP (1:1000), Anti-PrLZ (1:2000) alle in TBST + 5% BSA + NaN₃. Sekundärantikörper: anti-*rabbit* (1:10000), anti-*mouse* (1:10000) alle in 10% v/v *Roti*®-*Block*/ *A. bidest.*

2.2.5 Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen

Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Methode

Eine Möglichkeit zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen ist die FRET-Methode. Das Funktionsprinzip ist in Abb. 9 schematisch anhand der Proteinen AR und PC1 exemplifiziert. Wie dargestellt, besteht das Prinzip in der Übertragung von Emissionstrahlung zwischen zwei Fluoreszenzproteinen in räumlicher Nähe. Dabei wird mit Licht einer bestimmten Wellenlänge ein Fluorochrom angeregt (Donor), welches durch die Emissionstrahlung das zweite Fluorochrom (Akzeptor) ebenfalls anregt. Die durch die Anregung des zweiten Fluorochroms entstandene Emission kann dann gemessen werden. Grundvoraussetzung für diesen Energie-Transfer ist die räumliche Nähe beider Fluoreszenzproteine, welche durch Kopplung von Zielproteinen zur Untersuchung von möglichen Interaktionen genutzt werden kann.

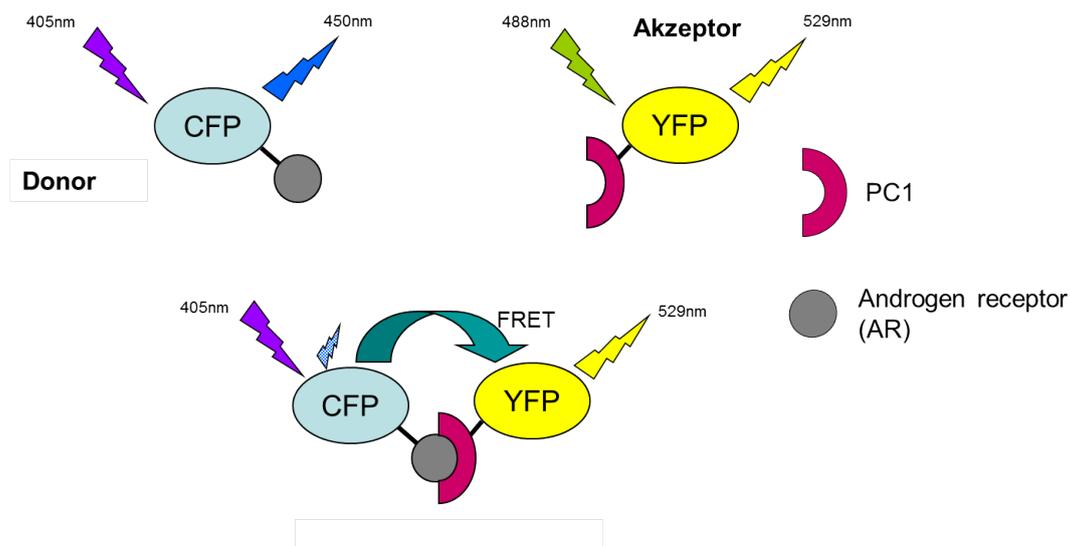


Abb. 9: Funktionsweise von FRET. Fluoreszenzproteine: CFP = *cyan-fluorescent-protein*, YFP = *yellow-fluorescent-protein*. PC1 PrLZ.

Für die FRET-Analyse wurden die Standardfluoreszenzproteine EYFP und ECFP verwendet. Mittels eines Lasers von 405nm Wellenlänge wird das ECFP angeregt und emittiert Strahlung mit 450nm Wellenlänge. Diese Emissionsstrahlung regt bei räumlicher Nähe (< 10nm) fast strahlungsfrei das EYFP-Protein an. Die daraus resultierende Emissionsstrahlung des EYFP liegt bei 529nm Wellenlänge und ist als gelbe Fluoreszenz sichtbar.

Messung von FRET am konfokalen LSM

Für die Versuche wurden fixierte und kotransfizierte LNCaP- und PC-3-Zellen verwendet. Die Transfektion erfolgte mit den in Tab. 8 beschriebenen Vektoren und zusätzlich mit CFP-C-Prdx1. Die transfizierten Zellen wurden mittels eines konfokalem LSM-Mikroskop analysiert. Hierzu wurde im ersten Schritt die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten von ECFP und EYFP bestimmt. Wie im Schema (Abb. 10) dargestellt wurde ECFP mit einem Laser von 405nm Wellenlänge angeregt und die Emission von 450nm Strahlung gemessen. Für EYFP erfolgte die Anregung mit 488nm mit resultierender Emission von 528nm Strahlung. Anschließend erfolgte das Bleichen (*acceptor photobleaching*) des EYFP. Dazu wurde in einem definierten Bereich der Zelle das EYFP mittels Laserstrahlung von 488nm 20-30x bestrahlt und so das Fluorochrom zerstört. Anschließend wurde erneut die Fluoreszenzintensität des ECFP gemessen.

Die FRET-Effizienz (E_{FRET}) errechnet sich aus der Differenz der Fluoreszenzintensität des ECFP vor (I_{pre}) und nach (I_{post}) dem Bleichen und wird mit dieser Formel bestimmt:

$$E_{\text{FRET}} = \frac{I_{\text{post}} - I_{\text{pre}}}{I_{\text{post}}}$$

Durch das Bleichen wurde der Akzeptor (EYFP) zerstört. Eine Aufnahme von übertragener Energie ist daher nicht mehr möglich. Das ist der Grund dafür, dass die emittierte Strahlung des ECFP nach dem Bleichen höher ist, da ein Teil der Energie jetzt nicht mehr auf EYFP transferiert wird, sondern als Emission abgestrahlt wird.

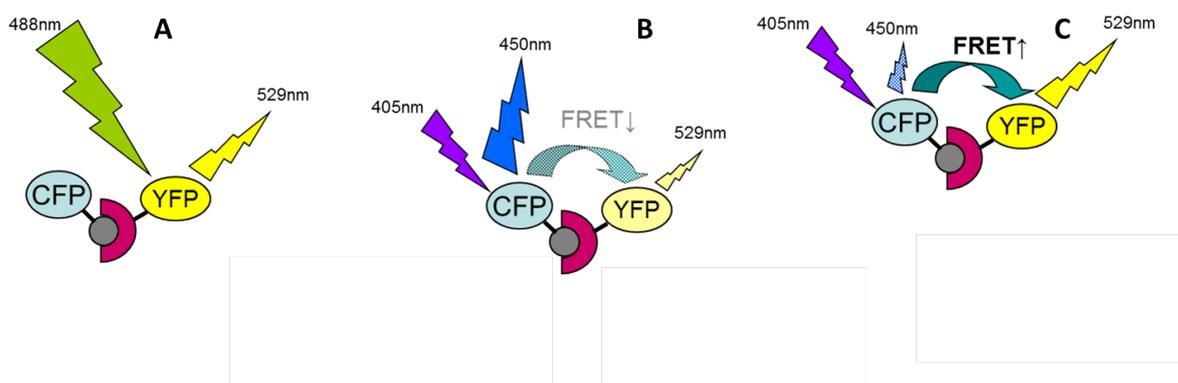


Abb. 10: Grundprinzip des Bleichens. (A) Bestrahlung und Zerstörung des YFP-Proteins. (B) Anregung des CFP. Durch das Bleichen nimmt das FRET-Signal ab. (C) Situation vor dem Bleichen.

Messung von FRET mit der FACS-Methode

Die FACS-Analyse (*Fluorescence activated cell sorting*), auch Durchflusszytometrie genannt, ist eine nicht invasive und sensitive Methode, mit deren Hilfe sich große Zellzahlen untersuchen lassen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte mithilfe der FACS-Methode die Detektion von positiven FRET-Signalen in den transfizierten LNCaP-Zellen. Für die Analyse können sowohl fixierte als auch lebende Zellen untersucht werden, welche zuvor in eine Zellsuspension überführt werden müssen (Chan *et al.*, 2001). Für die Versuche wurden LNCaP-Zellen in 6cm Schalen ausgesät und nach 4 Tagen das Medium gewechselt. Die Transfektion erfolgte 4h nach Mediumwechsel nach dem jet-Prime-Protokoll. Hierzu wurde ein Teil der in Tab. 8 gezeigten Vektoren verwendet. Pro 6cm Schale wurden 4µg DNA transfiziert, jeweils 1µg DNA von jedem ECFP/EYFP-Konstrukt und die restliche Menge mit dem Leervektor pcDNA3.1 aufgefüllt. Bei der Kontrolle mit dem Fusionsprotein ECFP-EYFP wurden 2µg des Vektors und 2µg des Leervektors verwendet. Die Transfektion erfolgte mit 8µl jet-Prime-Lösung in 4ml Medium. Nach 72h Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und der Zellrasen mit 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 1,5ml Accutase für 30min bei 37°C. Das Enzym Accutase unterstützt das Ablösen der Zellen vom Schalenboden und verhindert die Adhäsion der Zellen untereinander. Nach der Inkubation wurden die Zellen vorsichtig vom Schalenboden gelöst, in ein FACS-Röhrchen überführt und anschließend auf Eis gelagert. Gemessen wurde direkt aus der Accutaselösung. Während der Messung erfolgte die Anregung von ECFP wie oben beschrieben mit einem Laser mit 405nm Wellenlänge und die Messung der Emission vom EYFP im Bereich von 529nm Wellenlänge. In jedem Durchgang wurden ca. 20.000 Zellen analysiert. In der Auswertung fanden nur positive FRET-Signale von Zellen Berücksichtigung, welche sowohl ECFP und EYFP im ausreichend guten Maß exprimierten.

Kolokalisationsberechnungen

Die Berechnungen wurden mithilfe der *JACoP*-Funktion in der *ImageJ-Software* durchgeführt. Auf der Grundlage des *Pearson's* und *Mander's* Koeffizient konnte mit den Ansätzen von Costes (Costes *et al.*, 2004) und van Steensel (van Steensel *et al.*, 1996) die Berechnungen durchgeführt werden. Transfizierte DNA-Mengen: CFP-C-AR-DNL: 0,25µg und YFP-N-PC1: 0,25µg sowie CFP-C-Prdx1: 0,25µg und YFP-N-PC1: 0,25µg. Die Transfektion erfolgte mit 1µl *jetPrime*.

3. Ergebnisse

3.1. Kontrollspaltung der klonierten Vektoren

In Abb. 11 und 12 sind die Kontrollspaltungen der C-terminalen und N-terminalen Fusionsvektoren dargestellt (AR-DNL Abb. 11 und AR-*full* Abb. 12). Die Kontrollspaltung dient neben der Sequenzierung zur Überprüfung der Vektoren. Für die Kontrolle wurden die Enzyme *Xho*I und *Bam*HI verwendet. Abbildung 11 zeigt mit Ausnahme der Spur 3 positive Restriktionsspaltungen. Das entsprechende DNL-Insert ist korrekt aus dem Vektor geschnitten worden. Die Größe des Vektorrückgrats und des Inserts können anhand des Markers abgelesen werden.

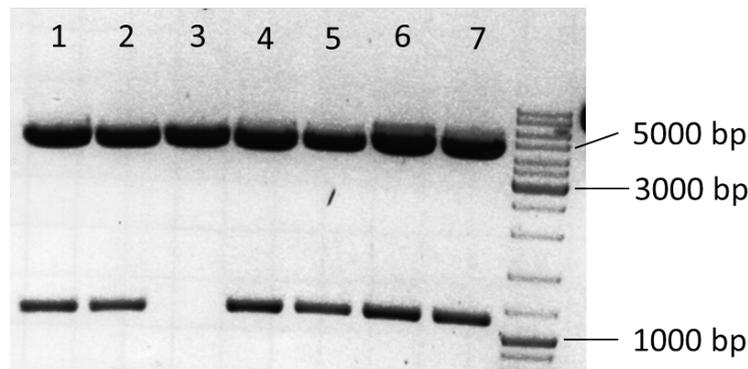


Abb. 11: Kontrollspaltung von ECFP-N-DNL (Spur 1 & 2), EYFP-N-DNL (Spur 3 & 4), ECFP-C-DNL (Spur 5 & 6) und EYFP-C-DNL (Spur 7). Größe der einzelnen Fragmente: Vektorrückgrad 4,7kb, DNL-Insert 1,1kb.

In Abb. 12 ist die Kontrollspaltung für die Vektoren mit dem AR-*full*-Insert dargestellt. Aufgrund der größeren cDNA-Sequenz (*full length* AR) sind die entsprechenden Banden auch größer (2,8kb). Die Bande des Leervektors ist unverändert bei einer Größe von 4,7kb zu sehen. Mit Ausnahme des Klons in Spur 4 sind alle Restriktionsspaltungen positiv. Eine anschließende Sequenzierung der Vektoren durch die Firma SeqLab (Göttingen) bestätigte die richtige Sequenz aller Vektoren.

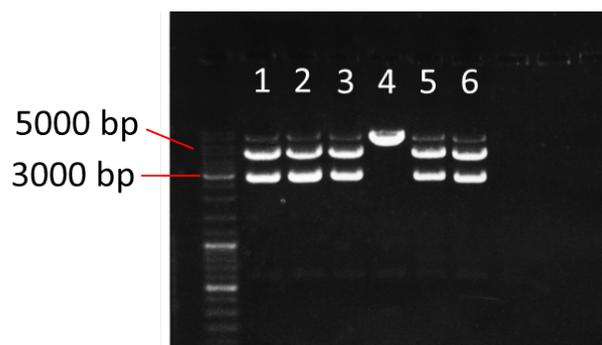


Abb. 12: Kontrollspaltung von ECFP-C-AR-*full* (Spur 1 & 2), EYFP-C-AR-*full* (Spur 3 & 4), ECFP-N-AR-*full* (Spur 5) und EYFP-N-AR-*full* (Spur 6). Größe der einzelnen Fragmente: Vektorrückgrad 4,7kb, AR-*full*-Insert 2,8kb.

3.2. Expression von AR-DNL-full, PC1 und Prdx1 nach Transfektion in LNCaP-Zellen

Zur Kontrolle ob und in welchem Maße die entsprechenden Fusionproteine von den LNCaP-Zellen exprimiert werden, wurden die Zellen mittels *Western-Blot* analysiert. Abbildung 13 zeigt das Ergebnis des *Western-Blots* von transfizierten LNCaP-Zellen.

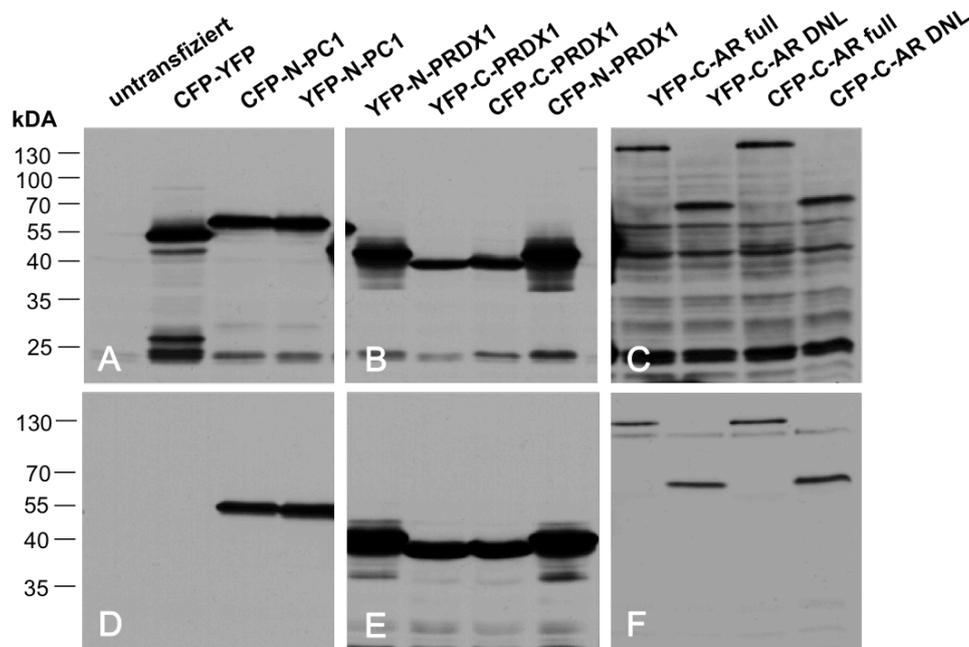


Abb. 13: *Western-Blot* transfizierter LNCaP-Zellen. Die transfizierten Konstrukte sind über der jeweiligen Spur angegeben. Prim. AK: anti-GFP in A/B/C (1:1000) anti-PC1 in D (1:2000), anti-AR-C-terminal in F (1:5000), anti-Prdx1 in E (1:5000). Sek. AK: anti-rabbit (1:10000), anti-mouse (1:20.000). Entwicklung mit ECL-*Homemade* A/B/D/E 2 min, C/F 2 h. Größe der Fusionsproteine: AR-*full*: 126,5kDa, AR-DNL: 69,3kDa, PC1: 51,8kDa, Prdx1: 22kDa.

Die Abb. 13 zeigt, dass alle transfizierten Konstrukte von den Zellen exprimiert wurden. Allerdings gibt es Unterschiede im Ausmaß der Expression. In den Teilabbildungen A/B/C wurden die Fusionsproteine mittels GFP-Antikörper deutlich gemacht. In den Teilabbildungen A, B, D und E betrug die Entwicklungszeit 2min und in Abbildungen C und F 2h. Zusätzlich ist in Abb. 13F der in LNCaP-Zellen natürlich vorkommende, endogene Androgenrezeptor in allen 4 Spuren schwach detektiert worden.

3.3 Endogene Expression und Translokation von AR und PC1 in LNCaP-Zellen in Abhängigkeit vom Medium

In Abb. 14 ist die Expression und die Translokation von AR und PC1 in Abhängigkeit vom Medium dargestellt. Die verwendeten LNCaP-Zellen wurden hierfür zuerst in Standardmedium und anschließend 4 Tage in hormonepletiertem Medium kultiviert.

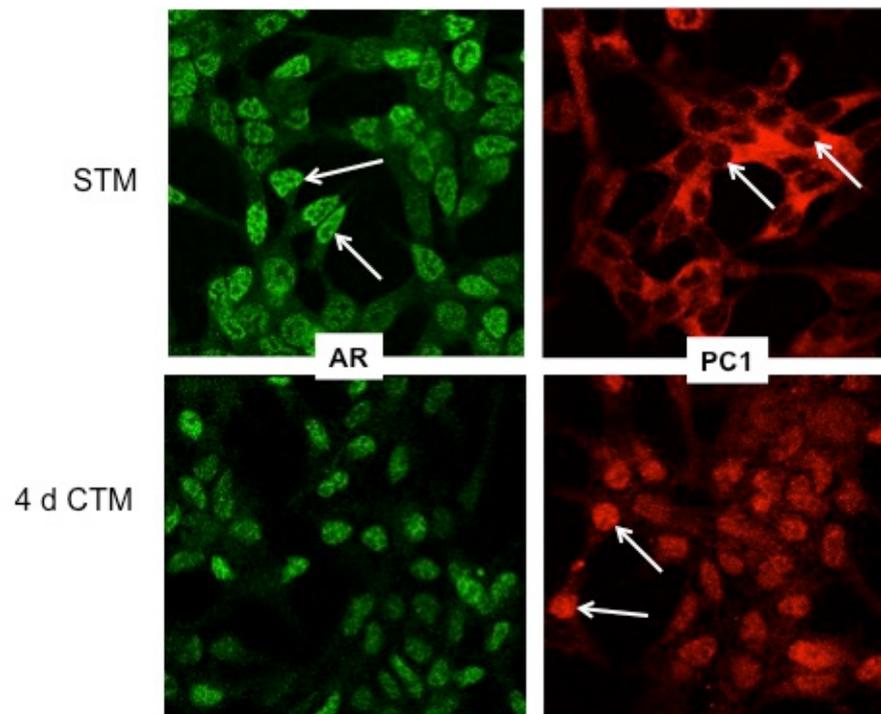


Abb. 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der endogenen Expression von AR und PC1 in LNCaP-Zellen in Abhängigkeit vom Medium. Im ST-Medium befindet sich der AR vermehrt im Nucleus (Pfeil) während PC1 nicht im Nucleus lokalisiert ist (Pfeil). Im CT-Medium transloziert PC1 vermehrt in den Kern (Pfeil). Primärantikörper: AR: 1:5000; PC1: 1:2000, Sekundärantikörper: *anti-mouse* Cy2 1:300, *anti-rabbit* Cy3 1:1000.

Die Lokalisation des PC1 weist deutliche Unterschiede auf. Unter Standardbedingungen ist das Protein ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert. Im hormonfreien Medium (CTM) erfolgt dann eine Translokation in den Kern. Das PC1 ist jetzt vermehrt im Nucleus vorhanden und nur noch gering im Zytoplasma. Im Standardmedium ist der Androgenrezeptor sowohl im Nucleus als auch im Zytoplasma lokalisiert. Im Vergleich liegt jedoch im Kern eine höhere Menge des Proteins vor als in im Zytoplasma. Nach der Kultivierung im CT-Medium findet sich der AR fast ausschließlich im Nucleus. Nur noch sehr schwach lässt sich eine Lokalisation im Zytoplasma finden.

3.4 Proteinexpression nach Transfektion von AR und PC1 in STM/CTM

Die Abb. 15 zeigt die Unterschiede der Proteinexpression von transfizierten Zellen mit CFP-C-AR-*full* und YFP-N-PC1 zwischen Standardmedium und hormonepletiertem Medium.

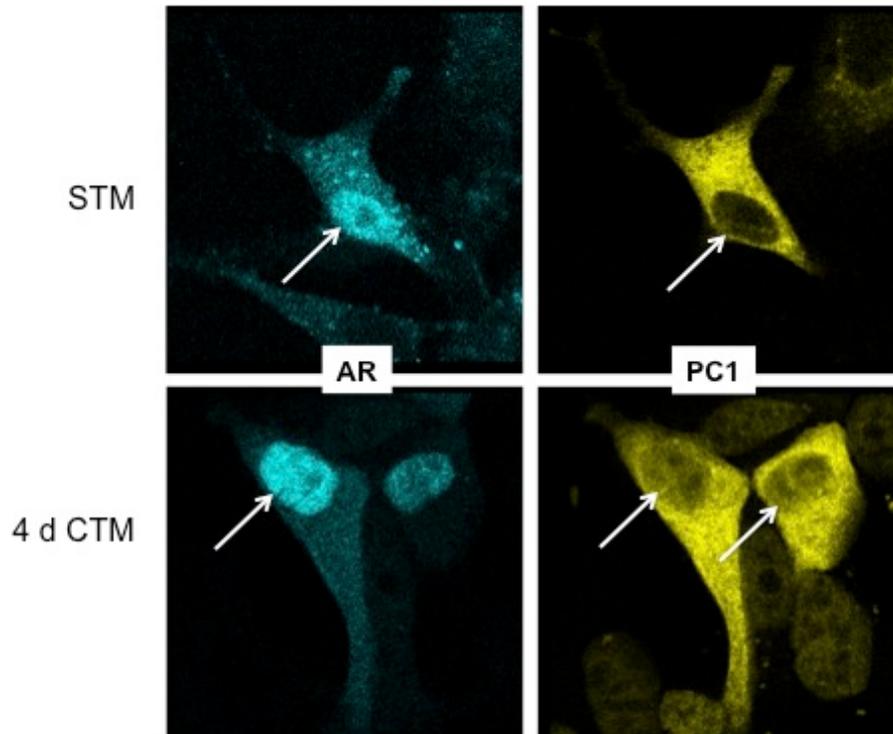


Abb. 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von transfizierten LNCaP-Zellen. Transfektion von CFP-C-AR-*full* und YFP-N-PC1, Kultivierung in STM und CTM. Im ST-Medium findet sich PC1 nur im Zytosol und nicht im Kern (Pfeil), der AR ist im Kern (Pfeil) sowie im Zytosol lokalisiert. Im CT-Medium befindet sich ein Teil des PC1 im Nukleus (Pfeile) sowie im Zytosol, der AR liegt in höherer Menge im Kern (Pfeil) und vermindert im Zytosol vor. Transfizierte DNA Menge: 0,5µg. Transfektion mit 1µl *jetPrime*.

Im Standardmedium liegt der AR sowohl im Zytosol als auch im Nukleus vor. Nach Kultivierung im hormonfreien Medium findet sich der Rezeptor verstärkt im Kern und auch in der Zellperipherie. Das Tumorprotein PC1 liegt unter Standardbedingungen nur im Zytosol vor. Im CTM-Medium zeigte sich das PC1 im Kern und Zytosol.

3.5 Endogene Proteinexpression und Translokation von PC1 und AR in CT-Medium mit und ohne synthetischem Androgen-Agonisten R1881 (\pm H)

In diesem Versuch wurde der Einfluss des androgenen Steroids R1881 auf die endogene Expression und Verteilung von PC1 und AR untersucht. Es konnten so mögliche Unterschiede im Expressions- und Verteilungsmuster von PC1 und AR zwischen Standardmedium und CT-Medium ermittelt werden. Die Abb. 16 zeigt das Ergebnis.

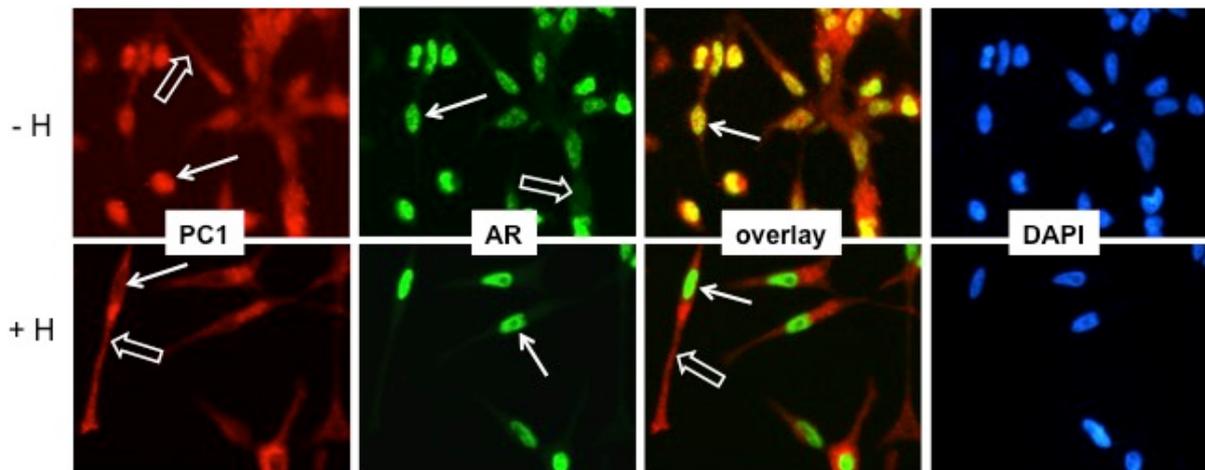


Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von LNCaP-Zellen im CTM Medium mit (+H) und ohne (-H) R1881. Aufnahmen ohne Hormon: PC1 diffus im Plasma (Blockpfeil) und vermehrt im Zellkern (Pfeil); AR fast ausschließlich im Kern (Pfeil) und sehr schwach im Zytosol (Blockpfeil); im *Overlay* Bestätigung PC1 und AR im Kern lokalisiert (Pfeil). Aufnahmen mit Hormon: PC1 vermehrt im Zytosol (Blockpfeil) mit Aussparung des Nukleus (Pfeil); AR im Kern lokalisiert (Pfeil); im *Overlay* deutliche Trennung zwischen AR im Kern (Pfeil) und PC1 im Zytosol (Blockpfeil). DAPI-Färbung zur Lokalisation der Zellkerne. Primärantikörper PC1: 1:2000; AR: 1:5000. Sekundärantikörper: *anti-rabbit*: 1:500.

Im hormonfreien CTM findet sich PC1 diffus verteilt im Zytoplasma und Zellkern. Der Androgenrezeptor hingegen liegt überwiegend im Kern vor und lediglich sehr schwach in der Zellperipherie. Im Medium mit R1881 transloziert der AR vermehrt in der Nukleus, während PC1 vermehrt im Zytoplasma vorliegt und nur geringfügig im Kern.

3.6 Kolokalisationsberechnungen von transfizierten LNCaP-Zellen

In Vorbereitung auf die Kolokalisationsanalysen mittels FRET-Methode wurden Kolokalisationsberechnungen an den transfizierten Zellen durchgeführt. Die Berechnungen wurden mit der *ImageJ*-Erweiterung *JACoP* auf der Grundlage der Korrelationsbestimmungen von Pearson, Li und van Steensel durchgeführt (Bolte and Cordelieres 2006). Die Ergebnisse geben eine Wahrscheinlichkeit über eine mögliche Kolokalisation zweier Proteine wieder.

Untersucht wurden die Kotransfektionen von CFP-C-AR-DNL + YFP-N-PC1 und CFP-C-Prdx1 + YFP-N-PC1 in LNCaP-Zellen. Die Abb. 17 zeigt die Ergebnisse der Berechnung CFP-C-AR-DNL + YFP-N-PC1.

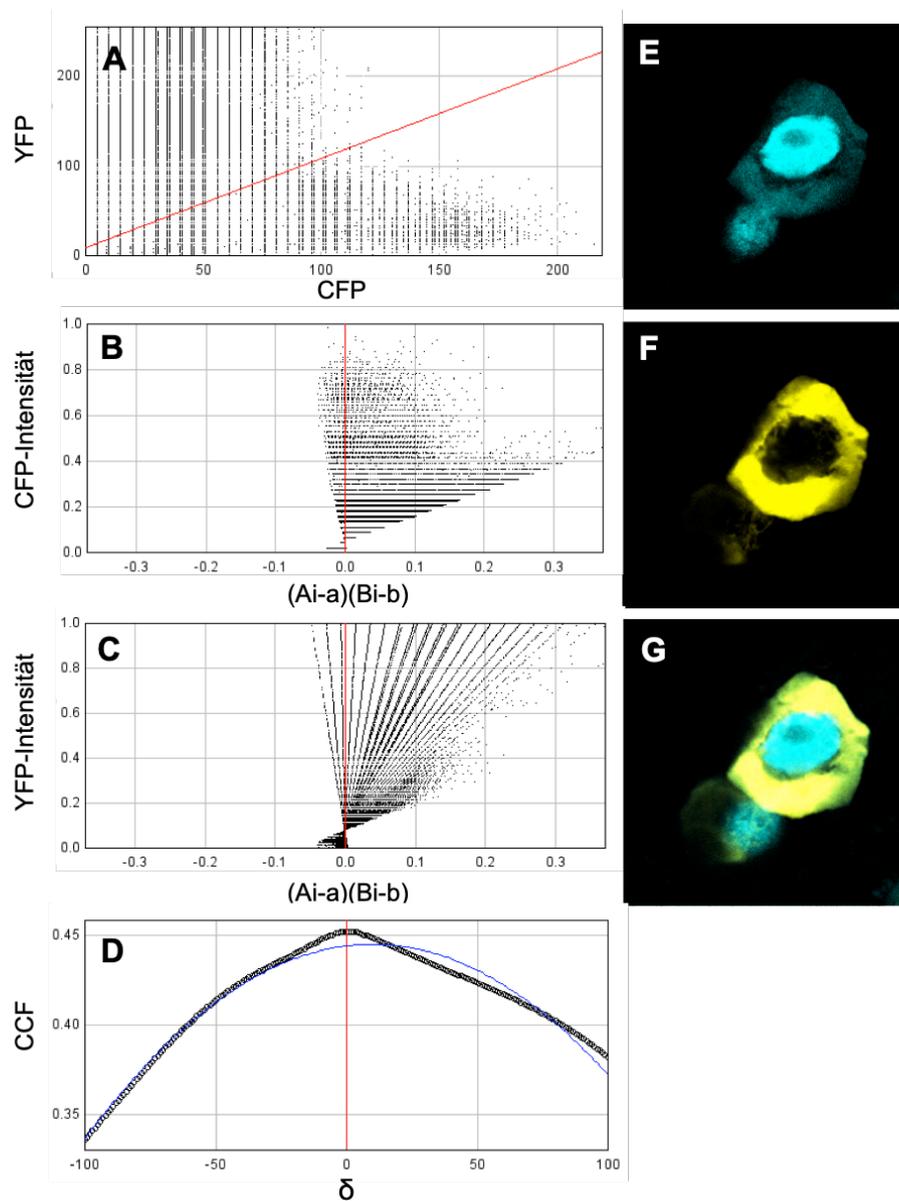


Abb. 17: Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von LNCaP-Zellen nach Kotransfektion mit CFP-C-AR-DNL (E) und YFP-N-PC1 (F). *Overlay* beider Fluoreszenzkanäle (G). LNCaP-Zellen wurden in CTM transfiziert und weitere drei Tage kultiviert. *JACoP* Analyse nach Pearson (A). *JACoP* Analyse ICA (*intensity correlation analysis*) nach Li für Kanal CFP (B). *JACoP* Analyse ICA (*intensity correlation analysis*) nach Li für Kanal YFP (C). *JACoP* Analyse van Steensel' s *cross correlation function* (CCF) mit Pixelverschiebung von $\delta x = \pm 100$ (D) (Bolte und Cordeliers, 2006).

In Tab. 13 sind die Analysewerte und Referenzwerte für CFP-C-AR-DNL + YFP-N-PC1 abgebildet.

Tab. 13: Messwerte der Kolokalisationsberechnungen von CFP-C-AR-DNL + YFP-N-PC1

Analysenmethode	Analysenwerte	Grenzwerte
Pearson's Koeffizient	$r = 0,452$	-1 negative Korrelation 0 keine Korrelation 1 positive Korrelation
van Steensel's Kreuzkorrelation-koeffizienten (CCF)	CCF min. = 0,33 für $dx = 100$ CCF max. = 0,45 für $dx = 0$	Verkleinerung des Pearson's Koeffizienten im Gegensatz zum Originalwert = positive Korrelation
Li's Intensitätskorrelationskoeffizient/-quotient (ICQ)	ICQ = 0,415	-0,5 keine Kolokalisation 0,5 Kolokalisation

Alle Analysewerte liegen innerhalb des Referenzbereiches für eine positive Korrelation und deuten auf eine wahrscheinliche Kolokalisation zwischen AR-DNL und PC1 hin. In Abb. 18 sind die Ergebnisse für die Berechnungen von CFP-C-Prdx1 + YFP-N-PC1 abgebildet.

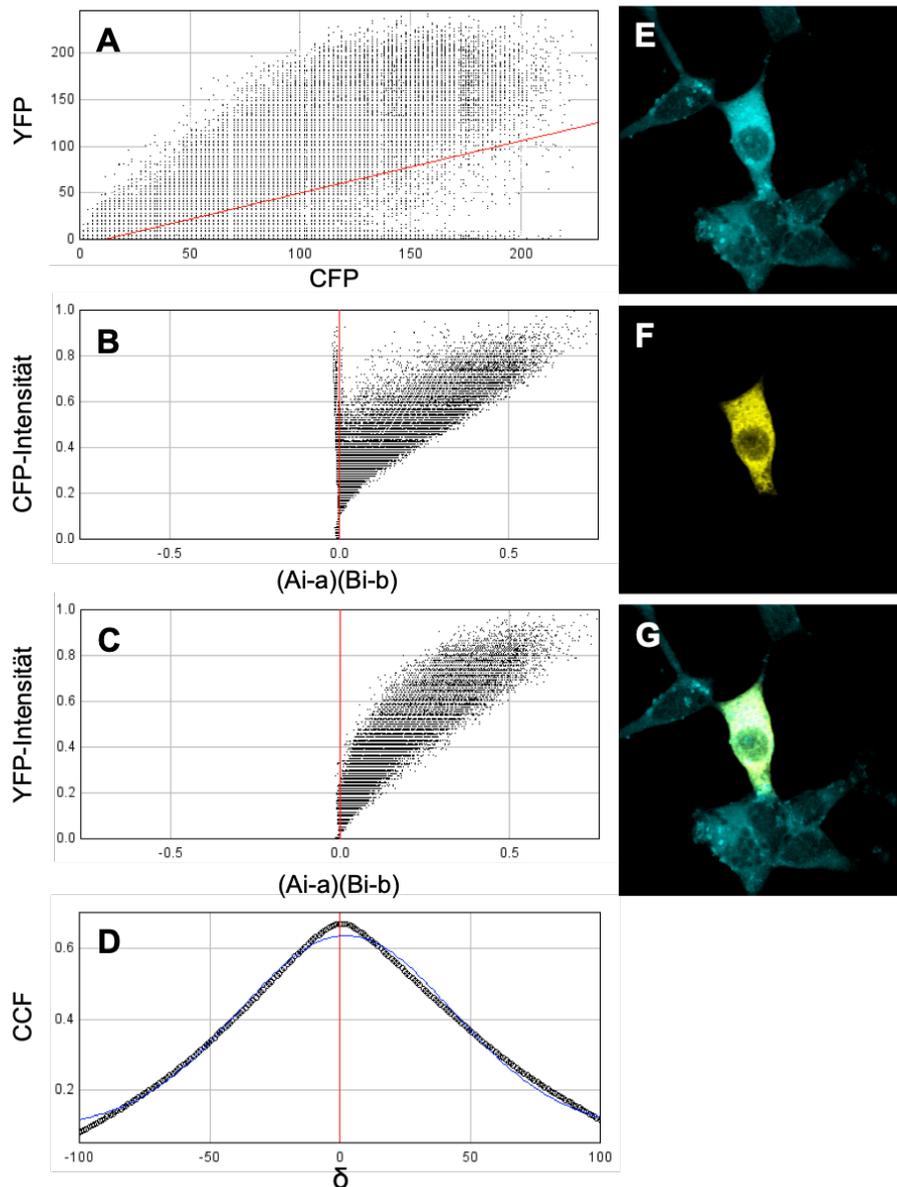


Abb. 18: Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von LNCaP-Zellen nach Kotretransfektion mit CFP-C-Prdx1 (E) und YFP-N-PC1 (F). *Overlay* beider Fluoreszenzkanäle (G). LNCaP-Zellen wurden in CTM transfiziert und weitere drei Tage kultiviert. *JACoP* Analyse nach Pearson (A). *JACoP* Analyse ICA (*intensity correlation analysis*) nach Li für Kanal CFP (B). *JACoP* Analyse ICA (*intensity correlation analysis*) nach Li für Kanal YFP (C). *JACoP* Analyse van Steensel' s *cross correlation function* (CCF) mit Pixelverschiebung von $\delta x = \pm 100$ (D) (Bolte und Cordelieres, 2006).

Die Auswertung der Analysen ist in Tab. 14 dargestellt. Die berechneten Werte liegen innerhalb der Referenzbereiche, was für eine positive Korrelation und wahrscheinliche Kolo-kalisation zwischen Prdx1 und PC1 spricht.

Tab. 14: Messwerte der Kolokalisationsberechnungen von CFP-C-Prdx1 + YFP-N-PC1

Analysenmethode	Analysenwerte	Grenzwerte
Pearson's Koeffizient	$r = 0,672$	-1 negative Korrelation 0 keine Korrelation 1 positive Korrelation
Van Steensel's Kreuzkorrelation-koeffizienten (CCF)	CCF min. = 0,08 für $dx = 100$ CCF max. = 0,67 für $dx = 0$	Verkleinerung des Pearson's Koeffizienten im Gegensatz zum Originalwert = positive Korrelation
Li's Intensitätskorrelationskoeffizient/-quotient (ICQ)	ICQ = 0,307	-0,5 keine Kolokalisation 0,5 Kolokalisation

3.7 Kolokalisationsanalyse von transfizierten LNCaP- und PC-3-Zellen mittels FRET-Methode

Eine andere Möglichkeit zum Nachweis von Proteinkolokalisationen ist die FRET-Methode. Hierzu wurden LNCaP-Zellen mit verschiedenen Vektoren transfiziert und anschließend mittels konfokaler *Laser-scanning-Mikroskopie* analysiert und auf mögliche FRET-Signale untersucht. Zur Überprüfung wurden sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle durchgeführt. In unterschiedlichen Prostatakarzinomzellen erfolgten die Transfektionen und Analysen. Dabei wurden verschiedene Fusionsproteine in unterschiedlichen Kombinationen verwendet. Um den Einfluss von Androgenen zu untersuchen, erfolgte die Transfizierung in unterschiedlichen Kulturmedien mit unterschiedlichen Androgenmengen. Die Tab. 15 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der unterschiedlichen Versuche. Für eine bessere Übersicht wurden die Versuche zum Ausschluss von Interaktionen zwischen dem CFP oder YFP mit den Fusionsproteinen nicht abgebildet. In diesen Versuchen zeigte sich keine auf eine unspezifische Kolokalisation hindeutende Interaktion. In den nachfolgenden Abschnitten sind die Versuche mit positiven FRET-Signalen exemplarisch mit mikroskopischen Bildern dargestellt.

Tab. 15: Liste der Ergebnisse der FRET-Analysen unter unterschiedlichen Bedingungen

Zellen	Interaktionspartner	STM/ CTM	CTM -H		CTM +H		STM		STM +H		n=
			ZP/K	ZP	K	ZP	K	ZP	K	ZP	
LNCaP	CFP+YFP (-) Kontrolle		-	-	-	-	0,008	-	-	-	3
LNCaP	CFP-YFP (+) Kontrolle		-	-	-	-	0,154	-	-	-	3
LNCaP	CFP-N-PC1 YFP-C-AR-DNL		∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	3
LNCaP	CFP-C-AR-DNL YFP-N-PC1		0,498	0,011	∅	∅	0,358	0,015	∅	∅	3
LNCaP	CFP-N-PC1 YFP-C-AR-full		∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	3
LNCaP	CFP-C-AR-full YFP-N-PC1		∅	∅	∅	∅	∅	∅	0,354	0,063	3
LNCaP	CFP-N-PC1 YFP-C-Prdx1		∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	3
LNCaP	CFP-C-Prdx1 YFP-N-PC1		∅	∅	∅	∅	∅	∅	0,151 0,125	∅ 0,09	3
PC-3	CFP-N-PC1 YFP-C-AR-full		∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	3
PC-3	CFP-C-AR-full YFP-N-PC1		0,463 0,176	0,087 0,152	0,497	0,047	∅	∅	∅	∅	3

ZP= Zytoplasma, K= Kern, n= Anzahl der Replikate, - = nicht durchgeführt, ∅= FRET-Signal nicht ermittelbar bzw. zu schwach, CTM= hormonfreies Medium, STM= Standardmedium, -H= ohne Hormonzusatz, +H= mit Hormonzusatz

Positivkontrolle in STM

Zur Kontrolle der FRET-Methode wurden Zellen mit dem Fusionsprotein CFP-YFP transfiziert. Aufgrund der räumlichen Nähe kommt es nach dem *bleaching* des YFP zur vermehrten Emission von Strahlung durch das CFP-Protein (siehe Abb. 19 Post-*bleaching* CFP Pfeil). Die Berechnung der FRET-Effizienz mit 0,159 bestätigt die Kolokalisation. Die Abb. 19 zeigt exemplarisch eine Positivkontrolle in einer transfizierten LNCaP-Zelle.

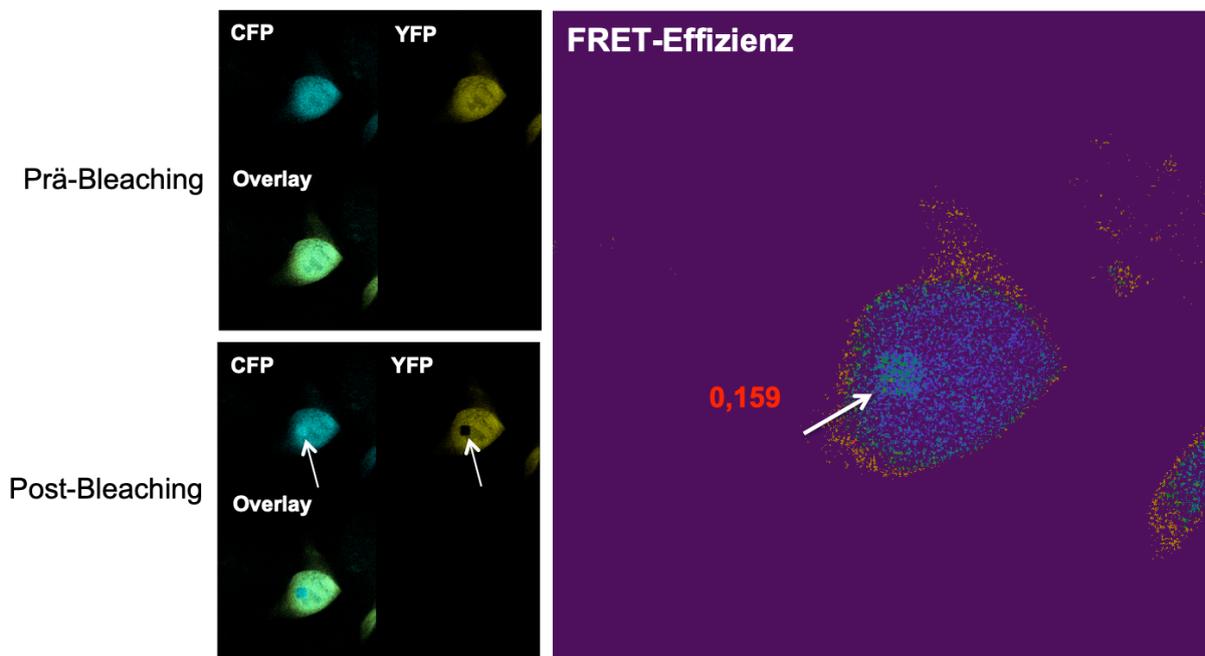


Abb. 19: Positivkontrolle der FRET-Analysen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von transfizierten LNCaP-Zellen mit CFP-YFP-Fusionsprotein. Die Pfeile zeigen auf den untersuchten Bereich. Fluoreszenzabnahme im YFP-Kanal nach dem *bleaching* und damit verbunden verstärkte Fluoreszenzintensität im CFP-Kanal. Mit einer Effizienz von 0,159 liegt ein positives FRET-Signal vor.

Negativkontrolle in STM

Zum Nachweis keiner unspezifischen Kollokalisierung und Interaktion von CFP und YFP wurden LNCaP-Zellen mit CFP- und YFP-Fluoreszenzproteinen transfiziert und auf mögliche FRET-Signale untersucht. Die Abb. 20 zeigt das Ergebnis der FRET-Analyse. Nach dem *bleaching* kam es zu keiner Emissionsverstärkung des CFP und auch die errechnete FRET-Effizienz von 0,0088 bestätigt die fehlende Kollokalisierung.

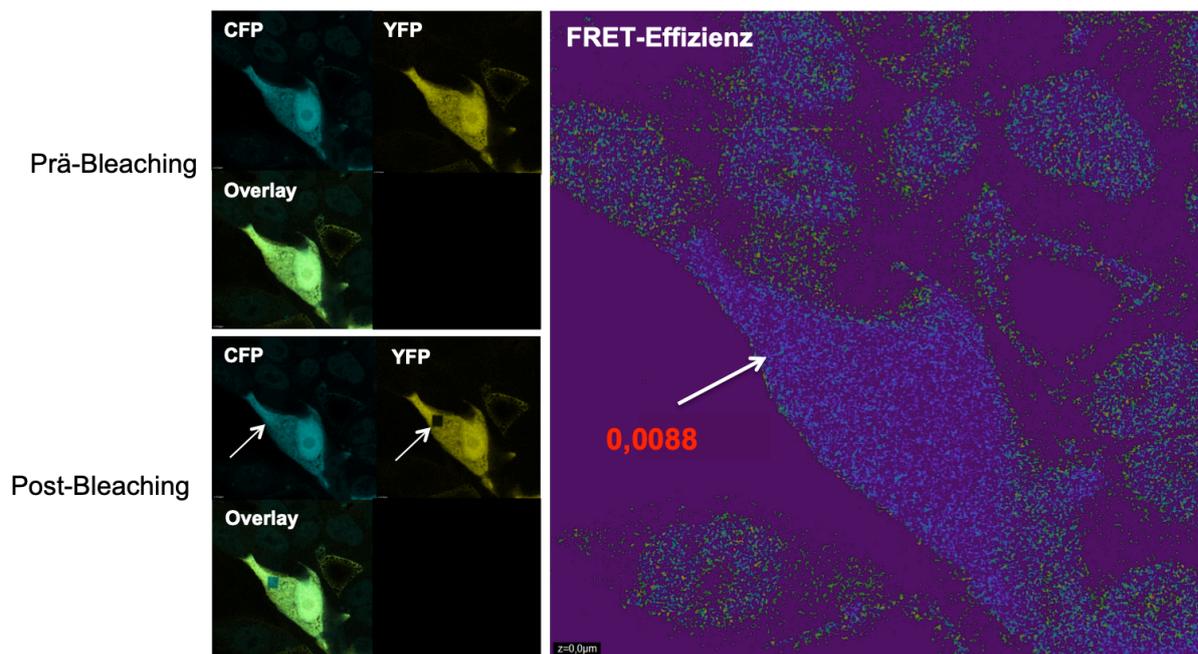


Abb. 20: Negativkontrolle der FRET-Analysen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von transfizierten LNCaP-Zellen mit CFP- und YFP-Fluoreszenzproteinen. Die Pfeile zeigen auf den untersuchten Bereich. Fluoreszenzabnahme im YFP-Kanal nach dem *bleaching* und fehlende verstärkte Fluoreszenzintensität im CFP-Kanal. Bei einer Effizienz von 0,0088 liegt kein positives FRET-Signal vor.

Kotransfektion von CFP-C-AR-DNL und YFP-N-PC1 in STM

Dieser experimentelle Ansatz diente der Untersuchung möglicher Kolokalisationen von AR-DNL und PC1 im Standardmedium. Es wurden Bereiche im Zytoplasma und im Kern analysiert und exemplarisch in Abb 21 dargestellt. Kolokalisationen konnten im Zytoplasma gefunden werden. Im Zellkern konnten dagegen keine positiven FRET-Signale nachgewiesen werden.

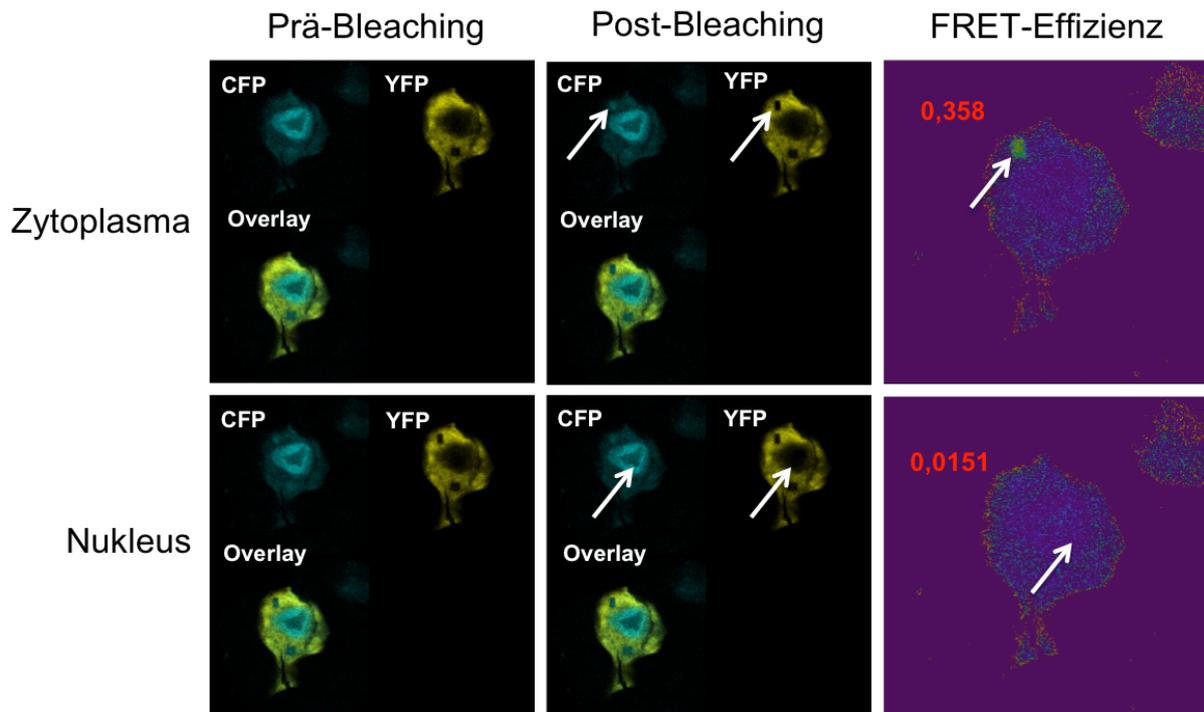


Abb. 21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kotransfizierten LNCaP-Zellen mit CFP-C-AR-DNL- und YFP-N-PC1-Fusionsproteinen in STM. Es wurden Areale im Zytoplasma und Zellkern untersucht (Pfeile). Zytoplasmatische Fluoreszenzabnahme im YFP-Kanal nach dem *bleaching* und verstärkte Fluoreszenzintensität im CFP-Kanal. Fehlende Fluoreszenzverstärkung im CFP-Kanal nach dem *bleaching* im Zellkern. Positives FRET-Signal im Zytoplasma, FRET-Effizienz: 0,358. Negatives FRET-Signal im Zellkern, FRET-Effizienz: 0,0151.

Kotransfektion von CFP-C-AR-DNL und YFP-N-PC1 in CTM ohne Hormon (- H)

Zum Vergleich der Ergebnisse in Abhängigkeit vom Medium wurden LNCaP-Zellen erneut mit CFP-C-AR-DNL und YFP-N-PC1 transfiziert und in CTM kultiviert. Es wurden sowohl Bereiche im Zytoplasma als auch im Zellkern auf mögliche Kollokalisierungen untersucht. Die Abb. 22 zeigt die Ergebnisse. Auch in CTM konnten positive FRET-Signale im Zytoplasma nachgewiesen werden. Im Zellkern fanden sich dagegen keine FRET-Signale.

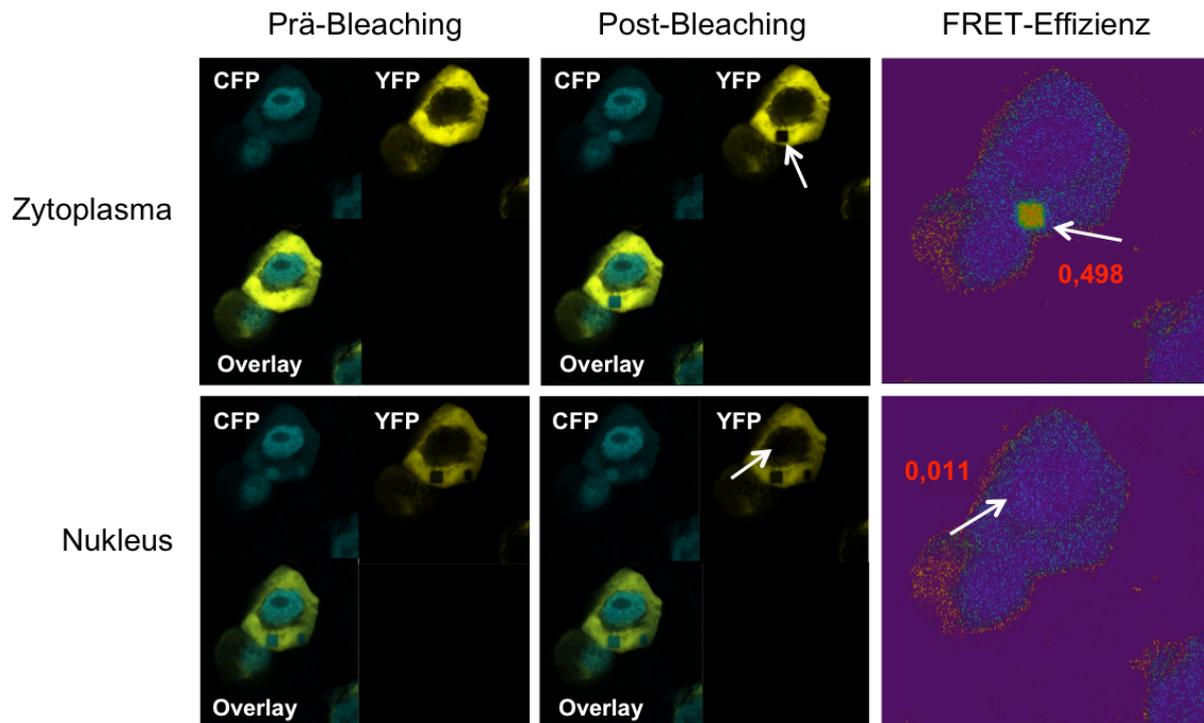


Abb. 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kotransfizierten LNCaP-Zellen mit CFP-C-AR-DNL- und YFP-N-PC1-Fusionsproteinen in CTM ohne Hormon. Es wurden Areale im Zytoplasma und Zellkern (Pfeile) untersucht. Zytoplasmatische Fluoreszenzabnahme im YFP-Kanal nach dem *bleaching* und verstärkte Fluoreszenzintensität im CFP-Kanal. Fehlende Fluoreszenzverstärkung im CFP-Kanal nach dem *bleaching* im Zellkern. Positives FRET-Signal im Zytoplasma, FRET-Effizienz: 0,498. Negatives FRET-Signal im Zellkern, FRET-Effizienz: 0,011.

Kotransfektion von CFP-C-AR-*full* und YFP-N-PC1 in STM mit Hormon (+H)

Um den Einfluss eines Androgens auf eine mögliche Translokation und Kolokalisation im Nukleus zu untersuchen, wurden LNCaP-Zellen mit CFP-C-AR-*full* und YFP-N-PC1 transfiziert und in STM mit 0,5nM R1881 kultiviert. Sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus wurden Areale hinsichtlich der FRET-Signale untersucht. Es konnten positive FRET-Signale im Zytoplasma, jedoch nicht im Zellkern nachgewiesen werden (Abb. 23).

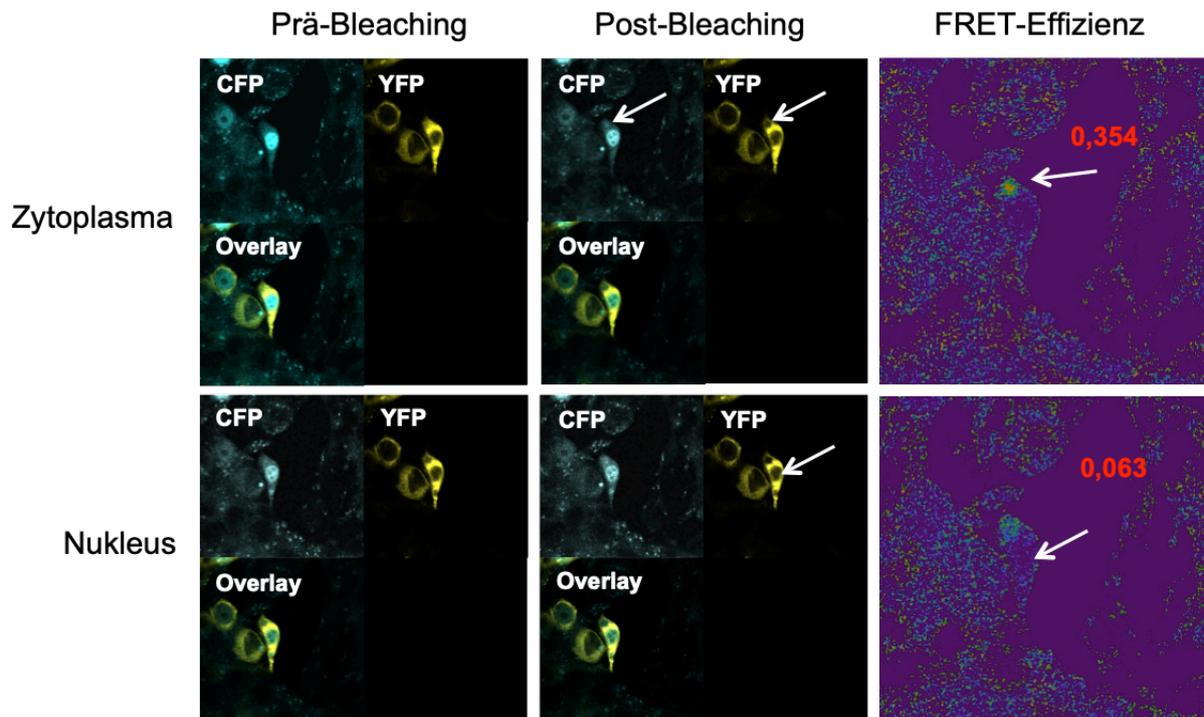


Abb. 23: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kotransfizierten LNCaP-Zellen mit CFP-C-AR-*full*- und YFP-N-PC1-Fusionsproteinen in STM mit 0,5nM R1881. Es wurden Areale im Zytoplasma und Zellkern (Pfeile) untersucht. Zytoplasmatische Fluoreszenzabnahme im YFP-Kanal nach dem *bleaching* und verstärkte Fluoreszenzintensität im CFP-Kanal. Fehlende Fluoreszenzverstärkung im CFP-Kanal nach dem *bleaching* im Zellkern. Positives FRET-Signal im Zytoplasma, FRET-Effizienz: 0,354. Negatives FRET-Signal im Zellkern, FRET-Effizienz: 0,063.

Kotransfektion von CFP-C-Prdx1 und YFP-N-PC1 in STM mit Hormon (+H)

Eine weitere mögliche Interaktion wurde zwischen dem Protein Prdx1 und PC1 untersucht. Die Zellen wurden transfiziert und in STM mit 0,5nM R1881 kultiviert. In den Zellen wurden Areale im Zytoplasma und im Zellkern auf bestehende Kolokalisationen analysiert. In Abb. 24 und 25 sind die Ergebnisse der Versuche abgebildet. Es konnten Kolokalisationen in Zytoplasma jedoch nicht im Zellkern nachgewiesen werden.

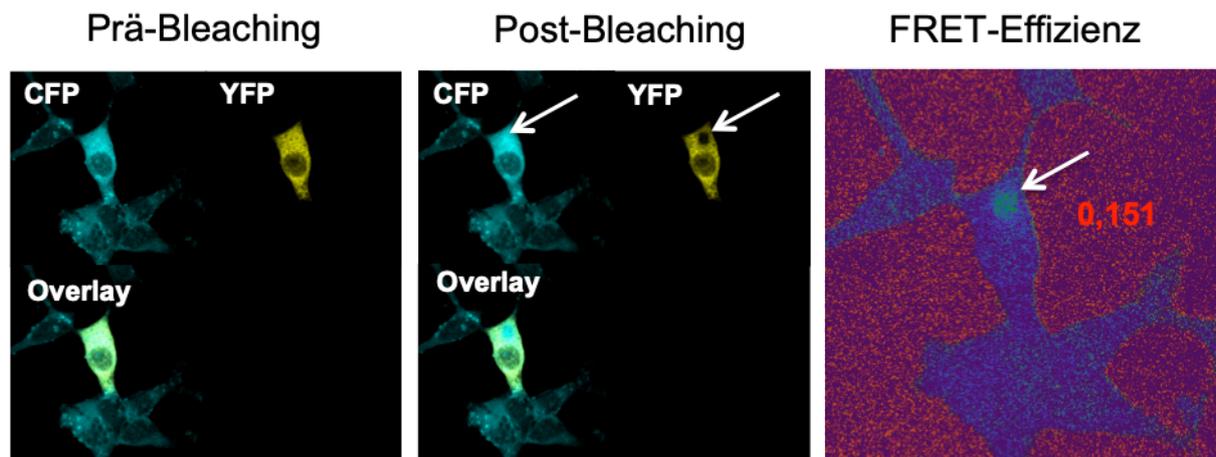


Abb. 24 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kotransfizierten LNCaP-Zellen mit CFP-C-Prdx1- und YFP-N-PC1-Fusionsproteinen in STM mit 0,5nM R1881. Es wurden Areale im Zytoplasma und Zellkern (Pfeile) untersucht. Positives FRET-Signal im Zytoplasma, FRET-Effizienz: 0,151.

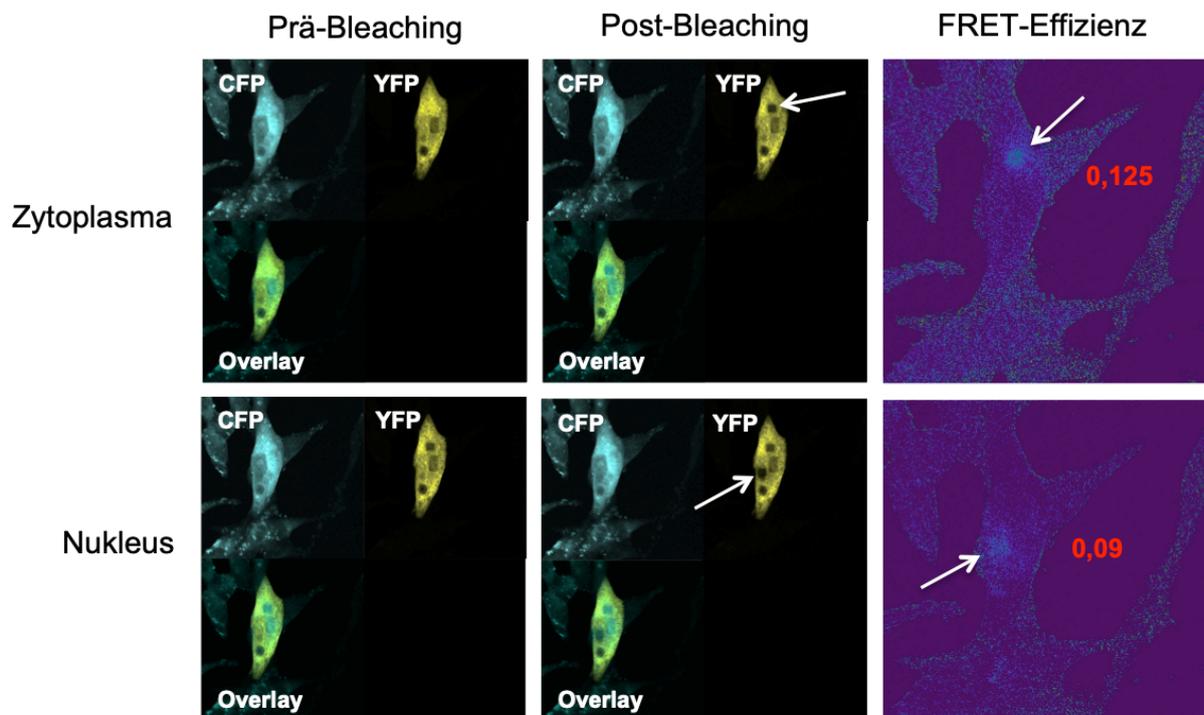


Abb. 25: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kotransfizierten LNCaP-Zellen mit CFP-C-Prdx1- und YFP-N-PC1-Fusionsproteinen in STM mit 0,5nM R1881. Es wurden Areale im Zytoplasma und Zellkern (Pfeile) untersucht. Zytoplasmatische Fluoreszenzabnahme im YFP-Kanal nach dem *bleaching*. Positives FRET-Signal im Zytoplasma, FRET-Effizienz: 0,125. Negatives FRET-Signal im Zellkern, FRET-Effizienz: 0,09.

3.8. Kolokalisationsanalyse von transfizierten PC-3-Zellen mittels FRET-Methode

Kotransfektion von CFP-C-AR-*full* und YFP-N-PC1 in CTM ohne Hormon (-H)

Zusätzlich zu den Versuchen mit LNCaP-Zellen wurden weitere Versuche in der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 durchgeführt. Hierzu wurden diese Zellen mit CFP-C-AR-*full* und YFP-N-PC1 mit und ohne Hormonzusatz (R1881) in CTM transfiziert. Die Abb. 26 und 27 zeigen die Ergebnisse ohne Hormonzusatz. In der Versuchsreihe in Abb. 26 konnten Kolokalisationen nur im Zytoplasma nachgewiesen werden. In Abb. 27 sind die Ergebnisse eines Replikates abgebildet. Hier konnten sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus positive FRET-Signale gemessen werden.

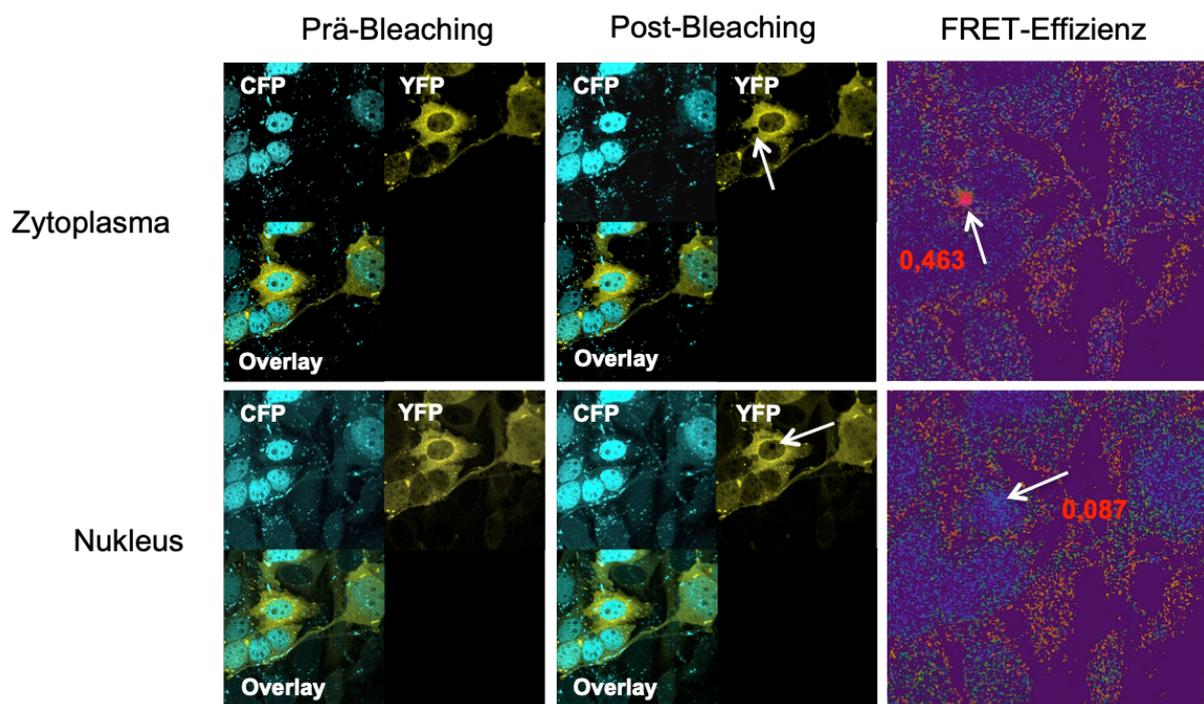


Abb. 26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kotransfizierten PC-3-Zellen mit CFP-C-AR-*full*- und YFP-N-PC1-Fusionsproteinen in CTM ohne R1881. Es wurden Areale im Zytoplasma und Zellkern (Pfeile) untersucht. Zytoplasmatische Fluoreszenzabnahme im YFP-Kanal nach dem *bleaching*. Positives FRET-Signal im Zytoplasma, FRET-Effizienz: 0,463. Negatives FRET-Signal im Zellkern, FRET-Effizienz: 0,087.

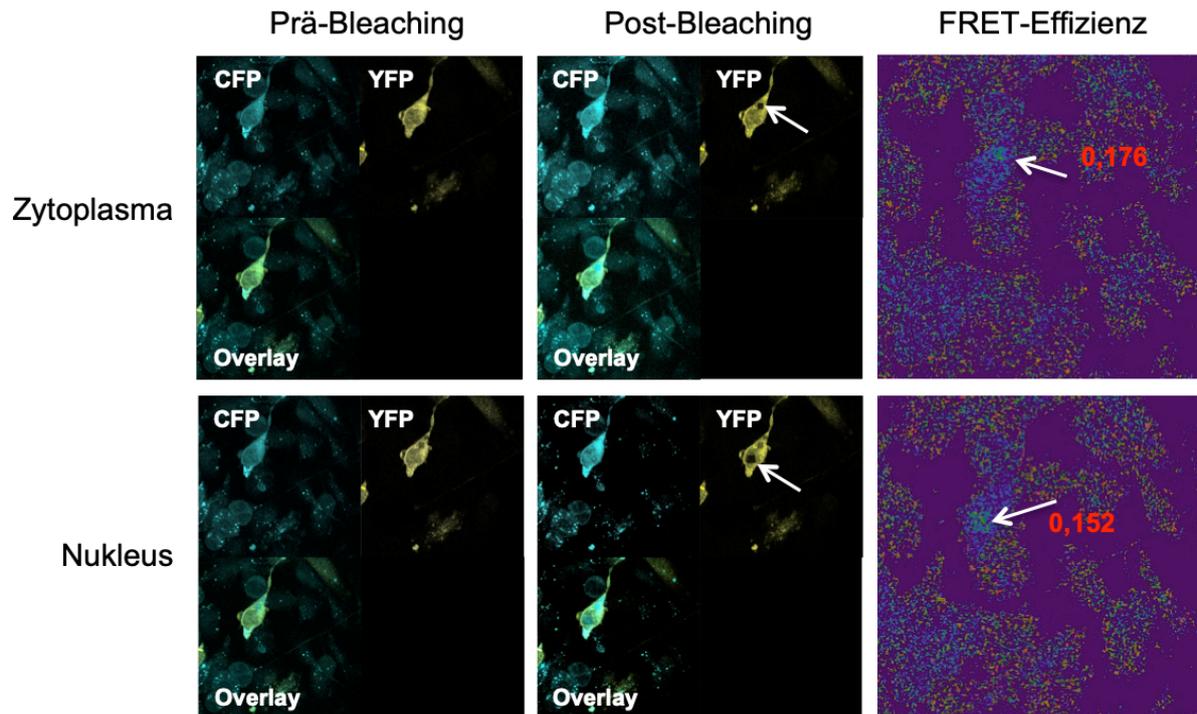


Abb. 27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kotransfizierten PC-3-Zellen mit CFP-C-AR-*full*- und YFP-N-PC1-Fusionsproteinen in CTM ohne R1881. Es wurden Areale im Zytoplasma und Zellkern (Pfeile) untersucht. Zytoplasmatische und intranukleäre Fluoreszenzabnahme im YFP-Kanal nach dem *bleaching*. Positives FRET-Signal im Zytoplasma, FRET-Effizienz: 0,176. Positives FRET-Signal im Zellkern, FRET-Effizienz: 0,152.

Kotransfektion von CFP-C-AR-*full* und YFP-N-PC1 in CTM mit Hormon (+H)

In diesem Versuch wurde der Einfluss des Hormons R1881 auf mögliche Kolokalisationen im Zytoplasma und Nukleus untersucht. Die PC-3-Zellen wurden mit CFP-C-AR-*full* und YFP-N-PC1 kotransfiziert und in CTM mit 0,5nM R1881 kultiviert. Bei diesen Versuchen konnten nur Interaktionen im Zytoplasma und nicht im Nukleus nachgewiesen werden. Die Abb. 28 zeigt exemplarisch die Ergebnisse.

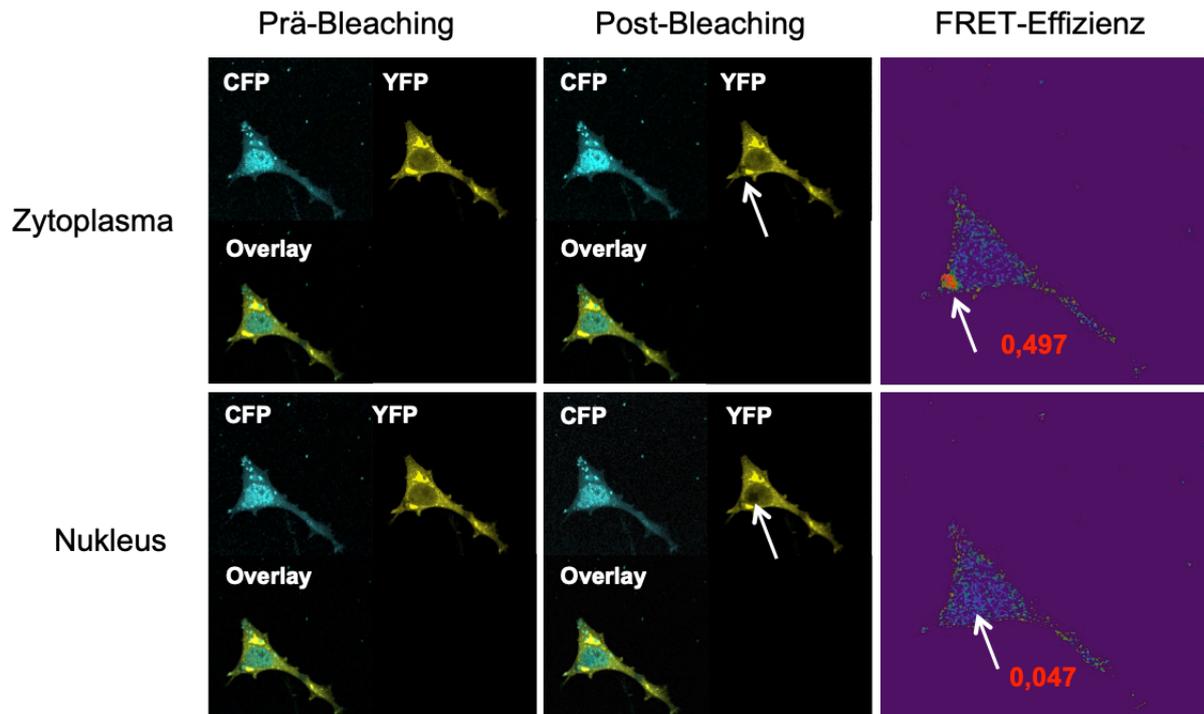


Abb. 28: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kotransfizierten PC-3-Zellen mit CFP-C-AR-*full*- und YFP-N-PC1-Fusionsproteinen in CTM mit 0,5nM R1881. Es wurden Areale im Zytoplasma und Zellkern (Pfeile) untersucht. Zytoplasmatische Fluoreszenzabnahme im YFP-Kanal nach dem *bleaching*. Positives FRET-Signal im Zytoplasma, FRET-Effizienz: 0,497. Negatives FRET-Signal im Zellkern, FRET-Effizienz: 0,047.

3.9. FACS-FRET Analysen von transfizierten LNCaP-Zellen

Die FACS-FRET Analyse ist eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung von transfizierten Zellen auf möglichen Kolo-kalisation. Für die Versuche wurden LNCaP-Zellen mit CFP-C-AR-*full* bzw. CFP-C-Prdx1 und YFP-N-PC1 transfiziert. In der Durchflusszytometrie wurden die Zellsuspensionen auf positive FRET-Signale untersucht. Die LNCaP-Zellen wurden in CTM transfiziert und für 72h kultiviert. Die Abb. 29 zeigt die Messergebnisse der Kotransfektion von CFP-C-AR-*full* und YFP-N-PC1. Es sind neben der Positivkontrolle (CFP-YFP-Fusionprotein) und den Negativkontrollen (CFP + YFP), auch die Transfektionen in CTM und STM jeweils mit und ohne Hormonzusatz (0,5nM R1881) dargestellt. In den Ergebnissen bestätigen sich die Positiv- und Negativkontrolle. In den Zellen der Versuchsreihen mit CTM konnten unabhängig vom Hormonzusatz positive FRET-Signale in einem Teil der Zellpopulation detektiert werden. Bei den LNCaP-Zellen in STM konnten ebenfalls unabhängig vom Hormon positive FRET-Signale nachgewiesen werden. Die Rate der FRET-positiven Zellen war bei den Zellpopulationen in STM deutlich höher als bei den in CTM kultivierten Zellen.

CFP-C-AR-full + YFP-N-PC1

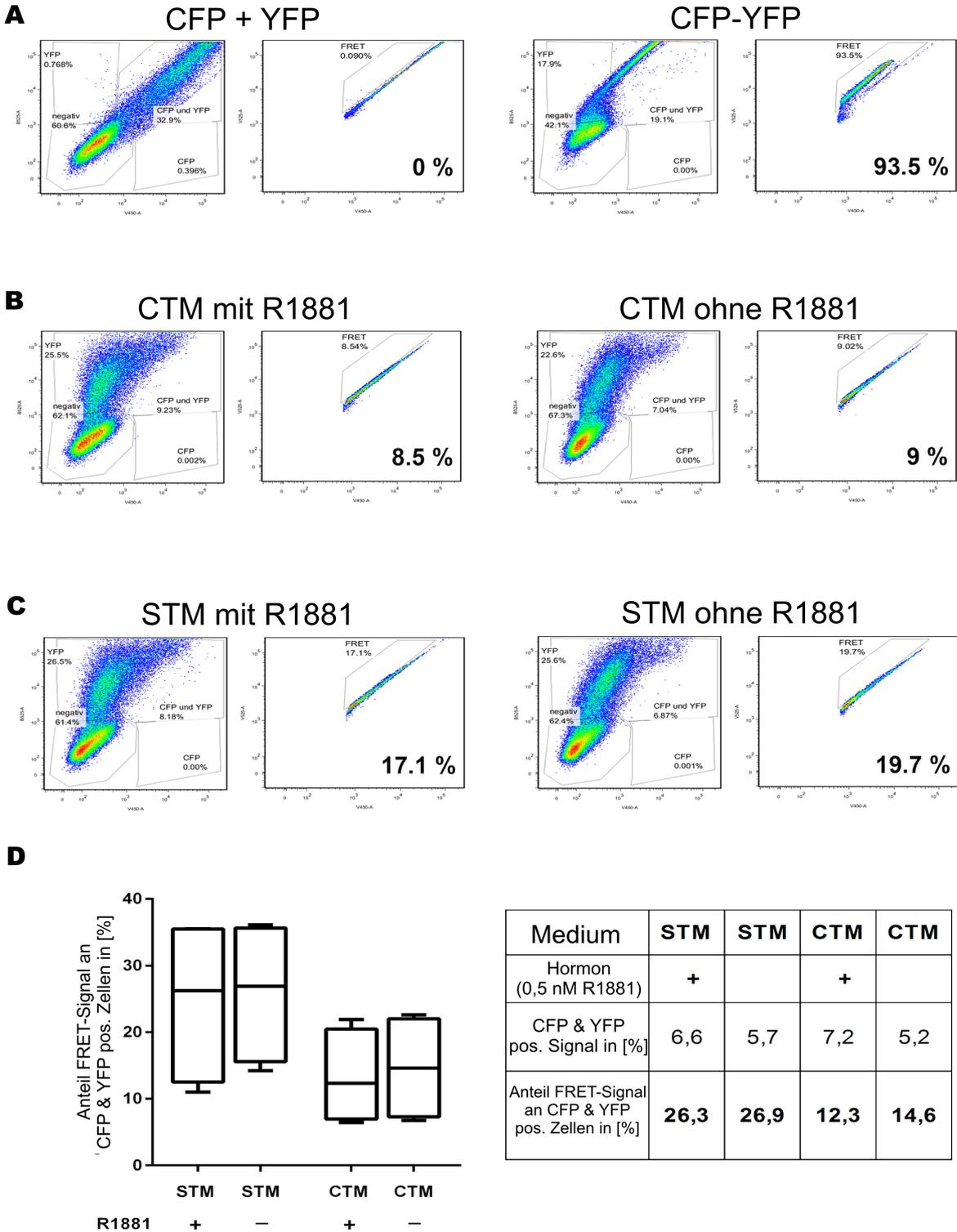


Abb. 29: FACS-FRET-Analyse von transfizierten LNCaP-Zellen mit CFP-C-AR-full und YFP-N-PC1. Die LNCaP-Zellen wurden in CTM und STM transfiziert und für drei Tage kultiviert. Die jeweils linke Abb. zeigt die Messwerte der Gesamtzahl, die jeweils rechte Abb. repräsentiert die Zellen mit positiven FRET-Signal (Angabe in Prozent von Gesamtzellzahl). A: Negativkontrolle (CFP + YFP) und Positivkontrolle (CFP-YFP-Fusionsprotein). B: Transfektion in CTM mit und ohne R1881. C: Transfektion in STM mit und ohne R1881. D: Anteil FRET-Signal an CFP und YFP positiven Zellen in (%) im Vergleich der verschiedenen Medien.

Die Abb. 30 zeigt die Ergebnisse der FACS-FRET-Messung von CFP-C-Prdx1 und YFP-N-PC1. Die Zellen wurden in STM ohne Hormonzusatz transfiziert und für drei Tage kultiviert. Die Positiv- und Negativkontrolle bestätigten die FRET-Funktion. Bei der FACS-FRET-Analyse der Koftransfektion fanden sich bei 18,2% der gemessenen Zellen positive FRET-Signale.

CFP-C-Prdx1 + YFP-N-PC1

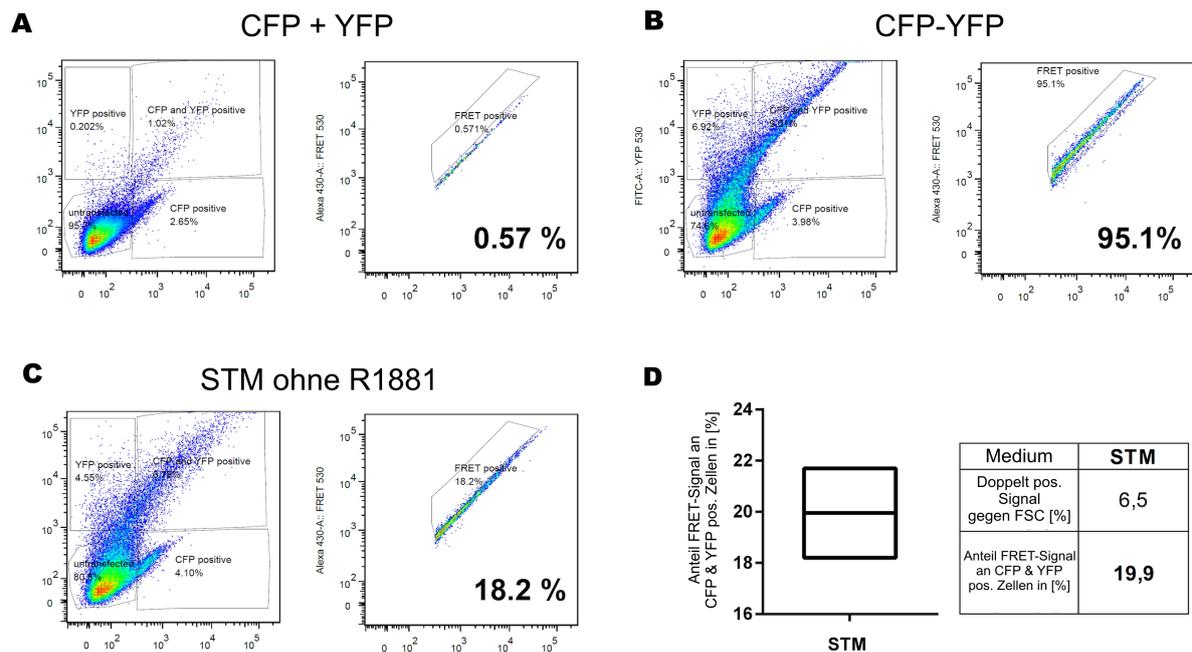


Abb. 30: FACS-FRET-Analyse von transfizierten LNCaP-Zellen mit CFP-C-Prdx1 und YFP-N-PC1 in STM ohne Hormonzusatz. Die jeweils linke Abb. zeigt die Gesamtzellzahl, die jeweils rechte Abb. den Zellanteil mit positivem FRET-Signal. A: Negativkontrolle mit 0,57% FRET positiven Zellen. B: Positivkontrolle mit 95,1% FRET positiven Zellen. C: Transfektion in STM ohne R1881, mit 18,2% FRET positiven Zellen. D: Anteil FRET-Signal an CFP und YFP positiven Zellen in (%) FRET im STM.

4. Diskussion

Das Prostatakarzinom ist das häufigste Karzinom und die zweithäufigste Krebstodesursache beim Mann in Deutschland. Die Inzidenz der Erkrankung blieb in den letzten Jahren auf einem stabil hohen Niveau (Robert-Koch-Institut), jedoch stellt die Tatsache, dass mit steigendem Alter die Inzidenz der Erkrankung zunimmt und gleichzeitig die Lebenserwartung der Menschen in Deutschland stetig steigt, ein großes gesundheitliches Problem dar.

Neben der Möglichkeit einer chirurgischen Resektion, der Radio-Chemo- sowie Brachytherapie, ist die Androgenablation ein weiteres Therapieverfahren beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom. Nach anfänglich guter Therapiewirksamkeit entwickeln viele Patienten jedoch nach 12-18 Monaten ein androgenunabhängiges Tumorwachstum (kastrationsresistentes Stadium) (Miyamoto H. *et al.*, 2004).

Der Mechanismus dieser Veränderung ist noch weitestgehend ungeklärt und stellt zugleich eine große Herausforderung in der Therapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms dar. Dabei gibt es viele verschiedenen Ansätze, um den Prozess des kastrationsresistenten Stadiums zu verstehen. Eine zentrale Rolle spielen der Androgenrezeptor und seine Veränderungen bzw. Interaktionsproteine, die über die Aktivierung des AR und seiner Zielgene eine Progression des Tumors ermöglichen.

In Untersuchungen zeigte sich, dass bei 30% der Prostatakarzinome, welche nach Androgenablation kastrationsresistent wurden, das AR-Gen amplifiziert vorliegt und eine verstärkte Expression des AR's zur Folge hat. Dies ermöglicht eine AR-Aktivierung bei Androgenkonzentrationen wie sie unter Ablationsbedingungen vorliegen (Koivisto *et al.*, 1997, Visakorpi *et al.*, 1995).

Bei ca. 10% der Prostatakarzinomfälle befinden sich Mutationen im AR-Gen (Gottlieb *et al.*, 2004), welche sich auch in Prostatazelllinien wie den LNCaP-Zellen nachweisen lassen (Daskivich und Oh, 2006). Darüber hinaus scheint die Androgenablation selbst zu einem signifikanten Anstieg der AR-Mutationen zu führen (Marcelli *et al.*, 2000, Taplin *et al.*, 1995, Tilley *et al.*, 1996). Diese Mutationen befinden sich zum Teil auch im Bereich der LBD (Lallous *et al.*, 2016), was zur veränderten Ligandenspezifität und -affinität führt und durch Interaktionen mit anderen Proteinen neue Wege zur Aufrechterhaltung der AR-Signalkaskade ermöglicht (Heinlein und Chang, 2004, McKenzie und Kyprianou, 2006).

In Untersuchungen zeigte sich, dass Mutationen in der LBD des AR die Affinität zum DHT erhöhen können und sogar zur androgenunabhängigen AR-Aktivierung durch Hormone wie Progestin, Östrogen oder Hydrocortison führen. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass manche Mutationen die Wirkung von Anti-Androgenen wie Hydroxyflutamid oder

Bicalutamid herabsetzen bzw. zur Wirkumkehr führen, sodass diese als Agonisten fungieren (Lallous *et al.*, 2016).

Die Veränderung der L701H-Mutation führt zur verminderten DHT-Affinität und ermöglicht gleichzeitig die Bindung von Glucocorticoiden wie Cortison und Cortisol an den AR. Die T877A-Mutation erhöht die Affinität des AR zu Glucocorticoiden um 300% im Vergleich zur L701H-Mutation. Interessanterweise haben beide Mutationen zusammen synergistische Effekte, was zu einer Aktivierung des AR durch Glucocorticoide bereits bei physiologischen Plasmakonzentrationen führen kann (Suzuki *et al.*, 1993, Zhao *et al.*, 1999, Zhao *et al.*, 2000).

Neben Mutationen gibt es weitere Möglichkeiten die AR-Aktivität zu erhöhen und so die Entstehung des kastrationsresistenten Stadiums zu fördern. So können z.B. die Wnt- und β -Catenin- vermittelten Signaltransduktionswege den AR androgenunabhängig aktivieren (Schweizer *et al.*, 2008). Auch das erhöhte Expressionsniveau von EGF, IGF-1 und KGF können die Aktivität des AR über Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge steigern (Culig *et al.*, 1994).

In Metastasen vom kastrationsresistenten Prostatakarzinom fand man im Vergleich zum unbehandelten Karzinom eine erhöhte Konzentration von Testosteron, was wahrscheinlich auf die gleichzeitig erhöhte Expressionen von Enzymen der Steroidsynthese (z.B. CYP17A1) zurückzuführen ist. Diese hohen Mengen an Testosteron sind vermutlich ebenfalls in der Lage den AR zu aktivieren (Montgomery *et al.*, 2008).

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass bei einem Viertel der Patienten vor Beginn der Androgenablation bereits eine verminderte Hormonsensitivität vorliegt und so quasi schon zu Beginn der Therapie eine Resistenz besteht (Feldman und Feldman, 2001, Marcu *et al.*, 2010, Shi *et al.*, 2006).

Ein weiterer Erklärungsansatz der Kastrationsresistenz ist die neuroendokrine Differenzierung (NED) von Prostatakarzinomzellen, die durch Sezernierung von Wachstumsfaktoren das Zellwachstum androgenunabhängig fördern kann (Marcu *et al.*, 2010). Das Zytokin IL-6 ist in der Lage die NED zu induzieren, was insofern von Bedeutung ist, da erhöhte IL-6-Plasmaspiegel bei kastrationsresistenten PCa gefunden wurden (Corcoran und Costello, 2003, Drachenberg *et al.*, 1999, Nakashima *et al.*, 2000). In einer Greifswalder Arbeit wurde darüber hinaus der potenzierende Effekt einer PC1-Überexpression auf die IL-6-vermittelte NED in LNCaP-Zellen festgestellt (Moritz *et al.*, 2016).

In Prostatakarzinomzellen (Li *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2011) sowie in Zellen des kastrationsresistenten Stadiums ist das Tumorprotein PC1 hoch exprimiert (Li *et al.*, 2013). Dies führte zu der Annahme, dass PC1 eine besondere Rolle bei der Aktivierung des AR in den Zellen spielt.

Zur Untersuchung möglicher Interaktionen auf zellulärer Ebene mussten zuerst verschiedene Vektoren kloniert werden (siehe Tab. 10 S. 30), um diese dann in die Zielzellen transfizieren zu können. Zur Bestätigung, dass die LNCaP-Zellen in der Lage sind die Proteine zu synthetisieren, wurden *Western-Blots* von Lysaten transfizierter LNCaP-Zellen erstellt (Abb. 13 S. 40). Es zeigten sich unterschiedlich stark ausgeprägte Banden der verschiedenen Proteine bei unterschiedlichen Entwicklungszeiten. Diese Unterschiede können zum einen an der Varianz der Transfektion liegen. Bei verschiedenen Vektoren können auch bei gleicher eingesetzter DNA-Menge Unterschiede in der Expression oder Stabilität des Proteins auftreten. Des Weiteren kann es durch Störungen beim Proteintransfer vom SDS-Gel auf die Nitrozellulosemembran zu unterschiedlich gut ausgeprägten Banden bei der Detektion kommen. Grundvoraussetzung für die FRET-Analysen ist jedoch, dass die Zellen durch die transfizierten Vektoren die entsprechenden Proteine exprimieren können und die Mengenverhältnisse denen der endogenen Proteinverteilung möglichst nahe kommen. Für die FRET-Versuche wurde daher weniger DNA zur Transfektion verwendet als bei den Zellen für die *Western-Blot*-Analysen.

Das Wissen über die Lokalisation von PC1 und AR unter bestimmten Bedingungen lässt Rückschlüsse auf mögliche Kolo-kalisation in bestimmten Zellkompartimenten zu. Der endogene AR ist in hormonfreiem Medium ohne Hormon weniger im Kern lokalisiert als in hormonhaltigem Medium (Abb.14 S. 41). Die hormonabhängige Translokation des AR ist in zahlreichen Lehrbüchern und Publikationen beschrieben und entspricht dem physiologischen AR-Signalweg (Trapman *et al.*, 1988, Welsch und Deller, 2006). Dazu gegensätzlich verhält sich die Verteilung des endogenen PC1. Unter Standardbedingungen liegt das Protein nur im Zytosol vor und transloziert in hormonepletiertem Medium in den Kern. Dies ist ein Hinweis auf die Grundannahme, dass unter Ablationsbedingungen PC1 im Komplex mit dem AR dessen Signalweg aufrechterhält und in den Kern transloziert.

Die Lokalisation der Proteine nach Transfektion zeigte beim PC1 ein äquivalentes Bild zum endogenen PC1. Auch hier ist unter Standardbedingungen kein PC1 im Kern und transloziert in Medium ohne Hormon teilweise in den Nukleus (Abb. 15 S. 42).

In einer ähnlichen Studie zu Interaktionsanalysen zwischen AR und PC1 zeigte sich die Translokation des AR in transfizierten Zellen in Abhängigkeit vom Medium deutlich (Li *et al.*, 2013). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht in dieser Deutlichkeit gezeigt werden.

Sowohl ohne als auch mit Hormon im Medium liegt der AR in annähernd gleichen Mengen im Nukleus vor. Auch in transfizierten Zellen sollte es nach dem Wechsel vom hormonfreien zum hormonhaltigen Medium zu einer vermehrten Translokation des AR in den Kern kommen, was aber in diesen Versuchen nicht deutlich gezeigt werden konnte.

Die genutzten Vektoren exprimieren die untersuchten Proteine unter Kontrolle des sehr starken CMV-Promoters, was zu einer exzessiven Expression des AR führen kann. Um den AR im Zytosol zu halten, müssen in der Zelle ausreichend Hitzeschockproteine vorhanden sein, die den Rezeptor stabilisieren und an der Translokation ohne Liganden hindern (Abb. 7 S. 9). Eine Überexpression des AR aufgrund des starken Promotors kann daher zu einem Ungleichgewicht zwischen dem AR und den stabilisierenden Proteinen, z.B. Hitzeschockprotein 27 (Miyamoto N. *et al.*, 2009), führen. Dies kann eine Translokation des AR auch ohne Liganden und damit unabhängig vom Medium in den Kern begünstigen. Darüber hinaus können Ko-Regulatoren wie Prdx1 (Chhipa *et al.*, 2009, Park *et al.*, 2007), Tip60 (Shiota *et al.*, 2010a), ARA54 (Miyamoto H. *et al.*, 2002), ARA55 (Fujimoto *et al.*, 1999) oder PGC1 α (Shiota *et al.*, 2010b) den AR-Signalweg modifizieren und so eine Translokation begünstigen.

Eine diesem Mechanismus entgegretende Möglichkeit bestand in der geringeren DNA-Transfektion, um eine niedrigere Proteinsynthese in den Zellen zu erhalten. Für die Transfektion mit dem jetPRIME[®] Reagenz werden jedoch Mindestmengen an DNA benötigt, sodass die reduzierte Menge der AR-Vektoren durch einen Leervektor ausgeglichen wurde. Dies hatte bei gleichbleibender Transfereffizienz eine verminderte AR-Expression zur Folge.

Neben der Lokalisation in unterschiedlichen Medien wurde auch der Einfluss des synthetischen Hormons R1881 untersucht. Hier zeigte PC1 ein gleiches Verhalten wie in den vorherigen Versuchen. Unter Zusatz von R1881 zu Medium mit hormonepletiertem FCS liegt das Protein im Zytosol vor und transloziert nach Hormonentzug in den Kern. Auch der Androgenrezeptor weist unterschiedliche Lokalisationen in Medium mit hormonepletiertem FCS in Abhängigkeit vom Hormon auf. Unter Ablationsbedingungen befindet sich der AR vermehrt im Zytosol und transloziert nach Hormonzusatz in den Nukleus. Die *Overlay*-Variante (Abb. 16 S. 43) zeigt eindrücklich die verschiedenen Lokalisationen beider Proteine. Dieses Verteilungsmuster wurde ebenfalls in der Arbeit von Li beschrieben (Li *et al.*, 2013).

In dieser Arbeit konnten Koloalationen mittels LSM-FRET zwischen AR und PC1 in transfizierten LNCaP-Zellen nur im Zytoplasma gefunden werden (Tabl. 15 S. 48). Ergänzend zu den Versuchen mit LNCaP-Zellen wurden auch PC-3-Zellen transfiziert und auf mögliche Interaktionen zwischen AR und PC1 untersucht. Diese Zellreihe exprimiert keinen endogenen Androgenrezeptor und ihr Wachstum ist unabhängig von Androgenen

(Tai *et al.*, 2011). In einer der Arbeit von Li *et al.* zeigte sich, dass die transfektionsvermittelte Überexpression von PC1 in LNCaP- und PC-3-Zellen zur vermehrten Transaktivierung des AR führt (Li *et al.*, 2013)

In den hier durchgeführten Versuchen konnten Kollokationen in PC-3-Zellen im Zytoplasma und unter Ablationsbedingungen sogar im Nukleus nachgewiesen werden (Abb. 26, 27 und 28 S. 55, 56 und 57). Aus vorherigen Studien ist eine Interaktion und Transaktivierung des AR durch PC1 zwar bekannt (Li *et al.*, 2013), eine Kollokation im Kern jedoch noch nicht beschrieben worden.

Ein Erklärungsansatz für das kastrationsresistente Stadium ist die Interaktion zwischen PC1 und AR, die zur Translokation des AR und Expression seiner Zielgene führt. Aus der Arbeit von Li *et al.* 2013 ist bekannt, dass PC1 direkt über den N-Terminus und die PEST-Domäne an der Ligandenbindungsdomäne des AR binden kann und so zur Transaktivierung und Translokation des AR unter Androgenablationsbedingungen führt. Einfacher ausgedrückt: PC1 ersetzt die Funktion des Androgens und ermöglicht so die AR-Translokation in den Zellkern.

Es stellt sich deshalb die Frage, warum in den Versuchen dieser Arbeit die Interaktion zwischen PC1 und AR im Zytoplasma von LNCaP-Zellen nicht zur Translokation des PC1-AR-Komplexes in den Nukleus geführt hat bzw. warum in den Versuchen mit LNCaP-Zellen nur Kollokationen im Zytoplasma nachgewiesen werden konnte, darüber hinaus auch nur in hormonhaltigen Medien, was im Widerspruch zur Grundhypothese steht.

Dies ist auch insofern interessant, da vorhergehende Kollokationsberechnungen von PC1- und AR- transfizierten LNCaP-Zellen unter Ablationsbedingungen eine Kollokation mit hoher Wahrscheinlichkeit ergaben (Abb. 17 S. 44). Ergänzend zu den mikroskopischen Untersuchungen wurden FACS-FRET-Analysen von kotransfizierten (PC1 und AR) LNCaP-Zellen durchgeführt (Abb. 29 S. 58), die ebenfalls positive FRET-Signale in den Zellen bestätigten und dies unabhängig von Medium und Hormonstatus.

Für die LSM-FRET-Ergebnisse können verschiedene Gründe diskutiert werden. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass im Zellkern die notwendige Nachweisgrenze von AR und PC1 nicht erreicht wurde und so zwar eine Kollokation vorlag, diese aber nicht detektiert werden konnte. Eine weitere Ursache könnte das Ausmaß der festgelegten ROI (*region of interest*) sein. Wird hierbei der zu analysierende Bereich zu groß gewählt, könnten mögliche positive FRET-Signale über die bestehende Fluoreszenz des CFP- und YFP-Kanals hinaus nicht detektiert werden. Diese Möglichkeit ist gerade vor dem Hintergrund, das für den AR-Signalweg nur eine geringe Menge an AR-Liganden-Komplexen erforderlich ist, nicht außer Acht zu lassen.

Neben dem PC1 gibt es noch weitere Kofaktoren und Interaktionspartner des AR, so z.B. Prdx1 (Chhipa *et al.*, 2009, Park *et al.*, 2007), Tip60 (Shiota *et al.*, 2010a), ARA54 (Miyamoto H. *et al.*, 2002), ARA55 (Fujimoto *et al.*, 1999) oder PGC1 α (Shiota *et al.*, 2010b). Es wäre daher auch denkbar, dass andere Interaktionspartner die Bindungsstelle des PC1 blockieren oder durch Interaktion eine Translokation des PC1-AR-Komplexes in den Nukleus verhindern.

Die „*de-novo*“ Synthese von DHT in Prostatakarzinomzellen ist in diesem Zusammenhang ebenfalls in Betracht zu ziehen. In früheren Studien konnte nachgewiesen werden, dass Prostatakarzinomzellen unter Ablationsbedingungen die Aktivität der 5 α -Reduktase Aktivität hochregulieren können und so aus Testosteron das wesentlich potentere DHT synthetisieren, was zur AR-Aktivierung führt (Labrie *et al.*, 1986).

Darüber hinaus wurden in Tumorrezidiven Androgenkonzentration gefunden, die zur Aktivierung des AR ausreichen (Mohler *et al.*, 2004). Die Fähigkeit mehr DHT zu synthetisieren, wäre auch ein Erklärungsansatz warum in den Versuchen dieser Arbeit keine Interaktionen unter Ablationsbedingungen bei LNCaP-Zellen gefunden wurden.

Ein weiterer Einflussfaktor besteht in der Zellpassage. Aus der Arbeit von Culig ist bekannt, dass das Kultivieren von LNCaP-Zellen in hormonfreiem Medium über einen längeren Zeitraum die Zelllinie verändert. In diesen veränderten LNCaP-Zellen ist der AR viermal höher exprimiert und besitzt eine 30-fach höhere Transkriptionsaktivität (Culig *et al.*, 1999). Es könnte daher über den Zeitraum der Versuche zur Veränderung der LNCaP-Zellen gekommen sein, die eine Aktivierung des AR auch ohne Hormon ermöglichen. Dies wäre auch eine denkbare Erklärung für die nicht nachweisbaren Kolo-kalisationen unter diesen Kulturbedingungen.

Im kastrationsresistenten Stadium verändert sich die Expression unterschiedlicher Wachstumsfaktoren wie ILG-1 (Culig *et al.*, 1994), HER-2 (Craft *et al.*, 1999) und IL-6 (Hobisch *et al.*, 1998), welche alle die AR-Aktivität modulieren können. Das ist insofern relevant, da IL-6 in der Lage ist, die AR-Aktivität ligandenunabhängig zu regulieren (Hobisch *et al.*, 1998). Darüber hinaus führt eine PC1-Überexpression zur Aktivierung des STAT3-Signalweges (Zhang *et al.*, 2011), welcher ebenfalls durch IL-6 aktiviert werden kann und damit auch zur neuroendokrinen Transdifferenzierung (NETD) beiträgt. PC1 und IL-6 könnten daher im Zusammenspiel die NETD fördern, was auch zur Entwicklung des kastrationsresistenten PCa beiträgt (Huss *et al.*, 2004, Jin *et al.*, 2004, Moritz *et al.*, 2016).

Die verwendeten LNCaP-Zellen sind androgenabhängig und entsprechen damit nicht den androgenunabhängigen kastrationsresistenten Zellen. Der Erklärungsansatz der PC1-AR Interaktion bezieht sich vor allem auf Tumorzellen im kastrationsresistenten Stadium. Daher wurden ebenfalls Versuche mit androgenunabhängigen PC-3-Zellen durchgeführt.

Entsprechend der Hypothese konnten hier unter Ablationsbedingungen Kolokalisation von PC1 und AR im Kern nachgewiesen werden.

Eine frühere Studie zeigte einen Unterschied zwischen der Lokalisation, Expression und vor allem Wirkung von Prdx2 im Vergleich zwischen LNCaP-Zellen und CxR-Zellen (kastrationsresistente LNCaP-Sublinie) (Shiota *et al.*, 2011). Das Protein Prdx2 ist ebenfalls in der Lage, direkt mit dem AR zu interagieren und spielt eine wichtige Rolle im kastrationsresistenten Stadium (Shiota *et al.*, 2011). Es wäre daher interessant, die Kolokalisationsversuche von PC1 und AR mit kastrationsresistenten CxR-Zellen zu wiederholen, da ähnlich wie beim Prdx2 eventuell Unterschiede im Verhalten des PC1 zwischen den beiden Zelllinien bestehen.

In wachsenden Tumoren, das PCa mit eingeschlossen, kommt es häufig zur Ausbildung einer Hypoxie in bestimmten Gewebebereichen, die die Progression des Karzinoms beeinflusst (Brizel *et al.*, 1999, Brizel *et al.*, 1996, Hockel *et al.*, 1996, Movsas *et al.*, 2000, Movsas *et al.*, 2002, Nordmark und Overgaard, 2000). Ursache dieser Hypoxie sind meistens abnormale Vaskularisationsstrukturen sowie histologische Veränderungen im Gefäßaufbau und daraus resultierend auch Veränderungen im Blutfluss (Jain, 2003, 2005, Kimura *et al.*, 1996, Vaupel *et al.*, 1989).

Das Antioxidans Prdx1 wird durch oxidativen Stress beeinflusst und ist in diesem Zusammenhang in verschiedenen Karzinomen hoch exprimiert (Chang J. W. *et al.*, 2001, Chen M. F. *et al.*, 2006, Yanagawa *et al.*, 1999, Yanagawa *et al.*, 2000).

In einer Greifswalder Arbeit von 2008 wurden Interaktionspartner von TPD52 untersucht. Dabei wurde *in vitro* eine Interaktion mit Prdx1 gefunden (Ummanni, 2008).

Aus früheren Studien ist bekannt, dass Prdx1 mit dem AR interagiert, die Expression der Zielgene verstärkt und ebenfalls in LNCaP-Zellen vermehrt vorliegt (Park *et al.*, 2006, Park *et al.*, 2007).

Durch Interaktion von Prdx1 und AR kommt es zu einer Erhöhung der Affinität des AR zum DHT sowie einer verminderten Dissoziation des AR-Ligandenkomplexes (Chhipa *et al.*, 2009). Darüber hinaus verstärkt Prdx1 eine Dimerisierung des AR (Chhipa *et al.*, 2009). Dabei kommt es nach Bindung des Liganden zur Ausbildung eines Dimers zwischen dem N-Terminus eines AR-Monomers und dem C-Terminus eines zweiten Monomers. Diese N- und C-terminale Dimerisierung erhöht die Affinität zum Hormon, die Aktivität des Rezeptors und gilt sowohl für mutierte Varianten als auch für den Wildtyp des AR (Chhipa *et al.*, 2009).

Prdx1 ist daher in seiner Funktion kein Ligand des Androgenrezeptors, sondern verstärkt vielmehr die Wirkung und Bindung des Liganden-Rezeptorkomplexes. Ob dieser Effekt auch bei der Bindung zwischen PC1 als AR-Ligand und dem AR auftritt, ist nicht bekannt.

Daher ergab sich die Vermutung, dass Prdx1 als Interaktionspartner die Affinität des AR zum Liganden PC1 erhöht und so zu einer Translokation des Komplexes in den Nukleus führt.

In den Versuchsreihen dieser Arbeit wurde auch eine mögliche Kolokalisation zwischen PC1 und Prdx1 untersucht.

Es konnten jedoch nur Kolokalisationen im Zytoplasma von transfizierten LNCaP-Zellen in Standardmedium mit Hormonzusatz gefunden werden. Die ergänzenden FACS-FRET-Untersuchungen an Prdx1 und PC1 transfizierten LNCaP-Zellen bestätigten die positiven FRET-Signale unter diesen Kulturbedingungen.

Das mikroskopisch nur in hormonhaltigem Medium Kolokalisationen zwischen PC1 und Prdx1 nachgewiesen wurden, ist insofern interessant, da in dieser Arbeit vorhergehende Kolokalisationsberechnungen eine hohe Wahrscheinlichkeit dafür ergeben haben, jedoch unter Ablationsbedingungen (Abb. 18 S. 46).

Des Weiteren ist bekannt, dass gerade die Hormonablation zu oxidativem Stress in LNCaP-Zellen führt (Veldscholte *et al.*, 1990a) und dass Hypoxie die Interaktion von Prdx1 und AR begünstigt (Park *et al.*, 2006, Park *et al.*, 2007).

Daher wäre gerade unter hormonfreien Kulturbedingungen eine Kolokalisation zwischen Prdx1 und PC1 zu erwarten gewesen. Vor allem da in dieser Arbeit eine Interaktion zwischen PC1 und AR unter Ablationsbedingungen nachgewiesen werden konnte.

Der Steroid-Rezeptor-Coaktivator-1 (SRC-1) ist in der Lage mit dem N-Terminus eines AR und mit dem C-Terminus eines anderen AR zu interagieren (Bevan *et al.*, 1999, Onate *et al.*, 1998) und kann so die AR-Aktivität unter suboptimalen Androgenbedingungen potenzieren (Agoulnik *et al.*, 2005). Eine Überlegung ist, dass Prdx1 die Rekrutierung vom SRC-1 zum AR-Ligandenkomplex stimulieren könnte (Chhipa *et al.*, 2009). Dies wäre eine Möglichkeit den AR unter Ablationsbedingungen zu aktivieren und ein Erklärungsansatz für die fehlende Interaktion zwischen Prdx1 und PC1 in Abwesenheit von Androgenen.

In Tierversuchen konnte in Rattennieren und -leberzellen eine Prdx1-Expression sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden (Immenschuh *et al.*, 2003, Oberley *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurden Interaktionen und Kolokalisationen zwischen Prdx1 und AR im Nukleus von Prostatakarzinomzellen nachgewiesen (Park *et al.*, 2007), was darauf schließen lässt, dass grundsätzlich Prdx1 in der Lage ist in den Kern zu translozieren und dort mit dem AR zu interagieren. In der Konsequenz müsste daher auch eine Kolokalisation zwischen Prdx1 und dem AR-PC1-Komplex im Kern möglich sein.

In den Experimenten dieser Arbeit konnte jedoch eine Kollokalisierung zwischen PC1 und Prdx1 im Nukleus nicht nachgewiesen werden. Möglich ist auch hier, dass die Nachweisgrenze im Nukleus nicht erreicht wurde oder dass die ROI zu groß gewählt wurde. Denkbar wäre aber auch, dass Prdx1 die Interaktion zwischen PC1 und AR fördert, an der Translokation in den Nukleus aber nicht beteiligt ist. Dafür sprechen würde auch die beschleunigte Dissoziation von AR und Hormon bei niedrigem Prdx1-Level in LNCaP- und PC-3-Zellen (Chhipa *et al.*, 2009). Es wäre daher interessant die Versuche an PC-3-Zellen zu wiederholen, in denen eine Kollokalisierung vom AR und PC1 im Kern nachgewiesen werden konnte und demnach eine Kollokalisierung von Prdx1 und PC1 im Nukleus als möglich erscheint.

In dieser Arbeit wurden LNCaP- und PC-3-Zellen verwendet, da es sich um Prostatakarzinomzellen handelt, welche gut kultivierbar sind und bei denen gute Ergebnisse in der Transfektion erzielt werden können. Dies ist die Grundlage für Interaktionsanalysen auf zellulärer Ebene.

Eine eingeleitete Ablationstherapie führt zu einer massiven Erhöhung des Selektionsdrucks zwischen den Karzinomzellen. Veränderungen jedweder Art, die Wachstum und Proliferation auch unter Ablationsbedingungen ermöglichen, fördern das Überleben der Karzinomzellen. Die Grundannahme, dass PC1 als Ersatz des Androgens dessen Rolle übernimmt und so die Signalkaskade weiterlaufen kann, ist daher nur ein möglicher und vereinfachter Erklärungsansatz für das kastrationsresistente Stadium.

Die Literatur zeigt, dass es viele verschiedene Interaktionspartner vom PC1 und AR in der Zelle gibt, welche alle mehr oder weniger Einfluss auf die Aktivierung des AR haben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben jedoch deutlich gemacht, dass PC1 als direkter Interaktionspartner eine zentrale und wichtige Rolle beim AR-Signalweg im kastrationsresistenten Stadium einnimmt.

5. Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist bei Männern in Deutschland die häufigste Krebserkrankung und die dritthäufigste Krebstodesursache. Aufgrund der steigenden Inzidenz mit fortschreitendem Alter und der parallel dazu immer älter werdenden Bevölkerung ist diese Erkrankung von großer sozioökonomischer Bedeutung. Nach einer antiandrogenen Therapie im fortgeschrittenen Tumorstadium kommt es häufig zur erneuten Progression des Tumorwachstums. In diesem kastrationsresistenten Stadium kommt es zur hormonunabhängigen Aktivierung und Aufrechterhaltung von Signalwegen des Androgenrezeptors.

Ein in diesem Zusammenhang postulierter Mechanismus besteht in der direkten Wechselwirkung des Rezeptors mit dem Tumorprotein PC1 (*prostate and colon gene-1*), welches auch als Tumorprotein D52 bezeichnet. Es liegt in Prostatakarzinomzellen häufig überexprimiert vor und steht daher im Verdacht, maßgeblich zur Progression des Tumorwachstums beizutragen, insbesondere im kastrationsresistenten Stadium.

In der vorliegenden Arbeit sollten mit Hilfe von FRET-basierten Interaktionsstudien mögliche Wechselwirkungen von PC1 mit dem Androgenrezeptor untersucht werden. Da es bereits Hinweise für eine Interaktion von PC1 mit Prdx1 gab, wurde dieses Protein in die Analyse mit einbezogen. Die Untersuchungen wurden an den Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC-3 unter verschiedenen Kulturbedingungen durchgeführt.

Die verwendeten Methoden umfassten die Klonierung von Expressionsvektoren, Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen, indirekte Immunfluoreszenz, Westernblot-Analysen, Durchflusszytometrie sowie konfokale Mikroskopie.

In dieser Arbeit konnte eine Kolokalisation zwischen PC1 und dem Androgenrezeptor sowie zwischen PC1 und Prdx1 im Zytoplasma von androgenabhängig wachsenden LNCaP-Zellen gezeigt werden. Auch in PC-3-Zellen, welche ähnlich wie kastrationsresistente Zellen androgenunabhängig wachsen, gelang es, eine Kolokalisation zwischen PC1 und dem Androgenrezeptor im Zytoplasma nachzuweisen. Bei Kultivierung dieser Zellen in hormonfreiem Medium waren PC1 und der Androgenrezeptor sogar im Zellkern von PC-3-Zellen kolokalisiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf die besondere und zentrale Funktion des PC1 bei der Aufrechterhaltung des Tumorwachstums hin. Somit wäre das prostataspezifisch vorkommende PC1 eine durchaus interessante Zielstruktur für die Entwicklung neuer Therapiestrategien beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom.

6. Literaturverzeichnis

Agoulnik I. U., Vaid A., Bingman W. E., 3rd, Erdeme H., Frolov A., Smith C. L., Ayala G., Ittmann M. M., Weigel N. L. Role of SRC-1 in the promotion of prostate cancer cell growth and tumor progression. *Cancer Res* 65: 7959-7967, 2005.

Ayala G., Thompson T., Yang G., Frolov A., Li R., Scardino P., Ohori M., Wheeler T., Harper W. High levels of phosphorylated form of Akt-1 in prostate cancer and non-neoplastic prostate tissues are strong predictors of biochemical recurrence. *Clin Cancer Res* 10: 6572-6578, 2004.

Beato M., Chavez S., Truss M. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 61: 240-251, 1996.

Benninghoff Alfred, Drenckhahn Detlev, Waschke Jens. Taschenbuch Anatomie. Elsevier Verlag, 1. Auflage, 313-315, 2007.

Bevan C. L., Hoare S., Claessens F., Heery D. M., Parker M. G. The AF1 and AF2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1. *Mol Cell Biol* 19: 8383-8392, 1999.

Bolte S., Cordelieres F. P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224: 213-232, 2006.

Bonkhoff H., Remberger K. Morphogenetic concepts of normal and abnormal growth in the human prostate. *Virchows Arch* 433: 195-202, 1998.

Boutros R., Bailey A. M., Wilson S. H., Byrne J. A. Alternative splicing as a mechanism for regulating 14-3-3 binding: interactions between hD53 (TPD52L1) and 14-3-3 proteins. *J Mol Biol* 332: 675-687, 2003.

Boutros R., Fanayan S., Shehata M., Byrne J. A. The tumor protein D52 family: many pieces, many puzzles. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 1115-1121, 2004.

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

Brinkmann A. O., et al. The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression. *J Steroid Biochem* 34: 307-310, 1989.

Brizel D. M., Dodge R. K., Clough R. W., Dewhirst M. W. Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. *Radiother Oncol* 53: 113-117, 1999.

Brizel D. M., Scully S. P., Harrelson J. M., Layfield L. J., Bean J. M., Prosnitz L. R., Dewhirst M. W. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 56: 941-943, 1996.

Byrne J. A., Mattei M. G., Basset P. Definition of the tumor protein D52 (TPD52) gene family through cloning of D52 homologues in human (hD53) and mouse (mD52). *Genomics* 35: 523-532, 1996.

Byrne J. A., Nourse C. R., Basset P., Gunning P. Identification of homo- and heteromeric interactions between members of the breast carcinoma-associated D52 protein family using the yeast two-hybrid system. *Oncogene* 16: 873-881, 1998.

- Byrne J. A., Tomasetto C., Garnier J. M., Rouyer N., Mattei M. G., Bellocq J. P., Rio M. C., Basset P. A screening method to identify genes commonly overexpressed in carcinomas and the identification of a novel complementary DNA sequence. *Cancer Res* 55: 2896-2903, 1995.
- Cao Q., Chen J., Zhu L., Liu Y., Zhou Z., Sha J., Wang S., Li J. A testis-specific and testis developmentally regulated tumor protein D52 (TPD52)-like protein TPD52L3/hD55 interacts with TPD52 family proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 344: 798-806, 2006.
- Chan F. K., Siegel R. M., Zacharias D., Swofford R., Holmes K. L., Tsien R. Y., Lenardo M. J. Fluorescence resonance energy transfer analysis of cell surface receptor interactions and signaling using spectral variants of the green fluorescent protein. *Cytometry* 44: 361-368, 2001.
- Chang C. S., Kokontis J., Liao S. T. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* 240: 324-326, 1988.
- Chang J. W., Jeon H. B., Lee J. H., Yoo J. S., Chun J. S., Kim J. H., Yoo Y. J. Augmented expression of peroxiredoxin I in lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 507-512, 2001.
- Chen C. D., Welsbie D. S., Tran C., Baek S. H., Chen R., Vessella R., Rosenfeld M. G., Sawyers C. L. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med* 10: 33-39, 2004.
- Chen M. F., Keng P. C., Shau H., Wu C. T., Hu Y. C., Liao S. K., Chen W. C. Inhibition of lung tumor growth and augmentation of radiosensitivity by decreasing peroxiredoxin I expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64: 581-591, 2006.
- Chen S. L., Maroulakou I. G., Green J. E., Romano-Spica V., Modi W., Lautenberger J., Bhat N. K. Isolation and characterization of a novel gene expressed in multiple cancers. *Oncogene* 12: 741-751, 1996.
- Cher M. L., MacGrogan D., Bookstein R., Brown J. A., Jenkins R. B., Jensen R. H. Comparative genomic hybridization, allelic imbalance, and fluorescence in situ hybridization on chromosome 8 in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 11: 153-162, 1994.
- Chhipa R. R., Lee K. S., Onate S., Wu Y., Ip C. Prx1 enhances androgen receptor function in prostate cancer cells by increasing receptor affinity to dihydrotestosterone. *Mol Cancer Res* 7: 1543-1552, 2009.
- Corcoran N. M., Costello A. J. Interleukin-6: minor player or starring role in the development of hormone-refractory prostate cancer? *BJU Int* 91: 545-553, 2003.
- Costes S. V., Daelemans D., Cho E. H., Dobbin Z., Pavlakis G., Lockett S. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J* 86: 3993-4003, 2004.
- Craft N., Shostak Y., Carey M., Sawyers C. L. A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nat Med* 5: 280-285, 1999.
- Crawford E. D. Epidemiology of prostate cancer. *Urology* 62: 3-12, 2003.

- Cude K. J., Dixon S. C., Guo Y., Lisella J., Figg W. D. The androgen receptor: genetic considerations in the development and treatment of prostate cancer. *J Mol Med (Berl)* 77: 419-426, 1999.
- Culig Z., Hobisch A., Cronauer M. V., Radmayr C., Trapman J., Hittmair A., Bartsch G., Klocker H. Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res* 54: 5474-5478, 1994.
- Culig Z., Hobisch A., Hittmair A., Peterziel H., Cato A. C., Bartsch G., Klocker H. Expression, structure, and function of androgen receptor in advanced prostatic carcinoma. *Prostate* 35: 63-70, 1998.
- Culig Z., et al. Switch from antagonist to agonist of the androgen receptor bicalutamide is associated with prostate tumour progression in a new model system. *Br J Cancer* 81: 242-251, 1999.
- Daskivich T. J., Oh W. K. Recent progress in hormonal therapy for advanced prostate cancer. *Curr Opin Urol* 16: 173-178, 2006.
- De Marzo A. M., Nelson W. G., Meeker A. K., Coffey D. S. Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. *J Urol* 160: 2381-2392, 1998.
- Deng B., Ye N., Luo G., Chen X., Wang Y. Proteomics analysis of stage-specific proteins expressed in human squamous cell lung carcinoma tissues. *Cancer Biomark* 1: 279-286, 2005.
- Drachenberg D. E., Elgamal A. A., Rowbotham R., Peterson M., Murphy G. P. Circulating levels of interleukin-6 in patients with hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 41: 127-133, 1999.
- Evans R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895, 1988.
- Fang Y., Fliss A. E., Robins D. M., Caplan A. J. Hsp90 regulates androgen receptor hormone binding affinity in vivo. *J Biol Chem* 271: 28697-28702, 1996.
- Feldman B. J., Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 34-45, 2001.
- Foster CS, Bostwick DG. 1998. in Young R, Srigley J, Amin M, Ulbright T, Cubilla A, eds. Atlas of Tumor Pathology: Tumors of the Prostate Gland, Seminal vesicles, Male Urethra and Penis., vol. 3. Auflage. The Armed Forces Institute of Pathology: WB Saunders Co (Elsevier).
- Fujii J., Ikeda Y. Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. *Redox Rep* 7: 123-130, 2002.
- Fujimoto N., Yeh S., Kang H. Y., Inui S., Chang H. C., Mizokami A., Chang C. Cloning and characterization of androgen receptor coactivator, ARA55, in human prostate. *J Biol Chem* 274: 8316-8321, 1999.
- Gottlieb B., Beitel L. K., Wu J. H., Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database (ARDB): 2004 update. *Hum Mutat* 23: 527-533, 2004.
- Graefen M. 2010. Prostatakarzinom. Pages 238-250 in Hautmann R, ed. Urologie, vol. 4. Auflage Springer Verlag.

- Hansen J. M., Moriarty-Craige S., Jones D. P. Nuclear and cytoplasmic peroxiredoxin-1 differentially regulate NF-kappaB activities. *Free Radic Biol Med* 43: 282-288, 2007.
- Heinlein C. A., Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev* 25: 276-308, 2004.
- Higgins B., Thompson I. M. The Prostate Cancer Prevention Trial: current status. *J Urol* 171: S15-17; discussion S18, 2004.
- Hirotsu S., Abe Y., Okada K., Nagahara N., Hori H., Nishino T., Hakoshima T. Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12333-12338, 1999.
- Hobisch A., Eder I. E., Putz T., Horninger W., Bartsch G., Klocker H., Culig Z. Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor. *Cancer Res* 58: 4640-4645, 1998.
- Hockel M., Schlenger K., Aral B., Mitze M., Schaffer U., Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 56: 4509-4515, 1996.
- Huss W. J., Gregory C. W., Smith G. J. Neuroendocrine cell differentiation in the CWR22 human prostate cancer xenograft: association with tumor cell proliferation prior to recurrence. *Prostate* 60: 91-97, 2004.
- Immenschuh S., Baumgart-Vogt E., Tan M., Iwahara S., Ramadori G., Fahimi H. D. Differential cellular and subcellular localization of heme-binding protein 23/peroxiredoxin I and heme oxygenase-1 in rat liver. *J Histochem Cytochem* 51: 1621-1631, 2003.
- Ishii T., Warabi E., Yanagawa T. Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity. *J Clin Biochem Nutr* 50: 91-105, 2012.
- Jain R. K. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9: 685-693, 2003.
- Jain R. K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307: 58-62, 2005.
- Jang H. H., et al. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* 117: 625-635, 2004.
- Jemal A., Tiwari R. C., Murray T., Ghafour A., Samuels A., Ward E., Feuer E. J., Thun M. J., American Cancer Society. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 54: 8-29, 2004.
- Jenster G., van der Korput H. A., van Vroonhoven C., van der Kwast T. H., Trapman J., Brinkmann A. O. Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Mol Endocrinol* 5: 1396-1404, 1991.
- Jin R. J., Wang Y., Masumori N., Ishii K., Tsukamoto T., Shappell S. B., Hayward S. W., Kasper S., Matusik R. J. NE-10 neuroendocrine cancer promotes the LNCaP xenograft growth in castrated mice. *Cancer Res* 64: 5489-5495, 2004.
- Kallioniemi A., Kallioniemi O. P., Citro G., Sauter G., DeVries S., Kerschmann R., Carroll P., Waldman F. Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 12: 213-219, 1995.

- Karihtala P., Mantyniemi A., Kang S. W., Kinnula V. L., Soini Y. Peroxiredoxins in breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 9: 3418-3424, 2003.
- Kimura H., Braun R. D., Ong E. T., Hsu R., Secomb T. W., Papahadjopoulos D., Hong K., Dewhirst M. W. Fluctuations in red cell flux in tumor microvessels can lead to transient hypoxia and reoxygenation in tumor parenchyma. *Cancer Res* 56: 5522-5528, 1996.
- Klein M. 2013. Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern des Tumorproteins D52. Diplomarbeit. Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald.
- Koivisto P., et al. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res* 57: 314-319, 1997.
- Labrie F., Dupont A., Belanger A., St-Arnaud R., Giguere M., Lacourciere Y., Emond J., Monfette G. Treatment of prostate cancer with gonadotropin-releasing hormone agonists. *Endocr Rev* 7: 67-74, 1986.
- Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- Lallous N., et al. Functional analysis of androgen receptor mutations that confer anti-androgen resistance identified in circulating cell-free DNA from prostate cancer patients. *Genome Biol* 17: 10, 2016.
- Lattouf J. B., Srinivasan R., Pinto P. A., Linehan W. M., Neckers L. Mechanisms of disease: the role of heat-shock protein 90 in genitourinary malignancy. *Nat Clin Pract Urol* 3: 590-601, 2006.
- Li L., et al. Increased PrLZ-mediated androgen receptor transactivation promotes prostate cancer growth at castration-resistant stage. *Carcinogenesis* 34: 257-267, 2013.
- Li L., Zhang D., Zhang L., Zhu G., Sun Y., Wu K., Wang X., He D. PrLZ expression is associated with the progression of prostate cancer LNCaP cells. *Mol Carcinog* 48: 432-440, 2009.
- Lubahn D. B., Joseph D. R., Sullivan P. M., Willard H. F., French F. S., Wilson E. M. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 240: 327-330, 1988.
- Marcelli M., et al. Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res* 60: 944-949, 2000.
- Marcu M., Radu E., Sajin M. Neuroendocrine transdifferentiation of prostate carcinoma cells and its prognostic significance. *Rom J Morphol Embryol* 51: 7-12, 2010.
- McKenzie S., Kyprianou N. Apoptosis evasion: the role of survival pathways in prostate cancer progression and therapeutic resistance. *J Cell Biochem* 97: 18-32, 2006.
- Mikuz G, Kristiansen G. 2012. Männliche Geschlechtsorgane. Pages 744-748 in Böcker W, Denk H, Heitz P, Moch H, eds. Pathologie, vol. 5. Auflage Elsevier Verlag.
- Miyamoto H., Messing E. M., Chang C. Androgen deprivation therapy for prostate cancer: current status and future prospects. *Prostate* 61: 332-353, 2004.

- Miyamoto H., Rahman M., Takatera H., Kang H. Y., Yeh S., Chang H. C., Nishimura K., Fujimoto N., Chang C. A dominant-negative mutant of androgen receptor coregulator ARA54 inhibits androgen receptor-mediated prostate cancer growth. *J Biol Chem* 277: 4609-4617, 2002.
- Miyamoto N., Izumi H., Miyamoto R., Kubota T., Tawara A., Sasaguri Y., Kohno K. Nipradilol and timolol induce Foxo3a and peroxiredoxin 2 expression and protect trabecular meshwork cells from oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: 2777-2784, 2009.
- Mohler J. L., Gregory C. W., Ford O. H., 3rd, Kim D., Weaver C. M., Petrusz P., Wilson E. M., French F. S. The androgen axis in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 10: 440-448, 2004.
- Montgomery R. B., Mostaghel E. A., Vessella R., Hess D. L., Kalthorn T. F., Higano C. S., True L. D., Nelson P. S. Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. *Cancer Res* 68: 4447-4454, 2008.
- Moon J. C., et al. Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H₂O₂-induced cell death. *J Biol Chem* 280: 28775-28784, 2005.
- Moritz T., Venz S., Junker H., Kreuz S., Walther R., Zimmermann U. Isoform 1 of TPD52 (PC-1) promotes neuroendocrine transdifferentiation in prostate cancer cells. *Tumour Biol* 37: 10435-10446, 2016.
- Movsas B., Chapman J. D., Greenberg R. E., Hanlon A. L., Horwitz E. M., Pinover W. H., Stobbe C., Hanks G. E. Increasing levels of hypoxia in prostate carcinoma correlate significantly with increasing clinical stage and patient age: an Eppendorf pO₂ study. *Cancer* 89: 2018-2024, 2000.
- Movsas B., Chapman J. D., Hanlon A. L., Horwitz E. M., Greenberg R. E., Stobbe C., Hanks G. E., Pollack A. Hypoxic prostate/muscle pO₂ ratio predicts for biochemical failure in patients with prostate cancer: preliminary findings. *Urology* 60: 634-639, 2002.
- Mu Z. M., Yin X. Y., Prochownik E. V. Pag, a putative tumor suppressor, interacts with the Myc Box II domain of c-Myc and selectively alters its biological function and target gene expression. *J Biol Chem* 277: 43175-43184, 2002.
- Nakashima J., Tachibana M., Horiguchi Y., Oya M., Ohigashi T., Asakura H., Murai M. Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 6: 2702-2706, 2000.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). Onlinedatenbank
- Netto L. E., Antunes F. The Roles of Peroxiredoxin and Thioredoxin in Hydrogen Peroxide Sensing and in Signal Transduction. *Mol Cells* 39: 65-71, 2016.
- Neumann C. A., Cao J., Manevich Y. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. *Cell Cycle* 8: 4072-4078, 2009.
- Neumann C. A., Fang Q. Are peroxiredoxins tumor suppressors? *Curr Opin Pharmacol* 7: 375-380, 2007.

- Niu Y., Chang T. M., Yeh S., Ma W. L., Wang Y. Z., Chang C. Differential androgen receptor signals in different cells explain why androgen-deprivation therapy of prostate cancer fails. *Oncogene* 29: 3593-3604, 2010.
- Nordsmark M., Overgaard J. A confirmatory prognostic study on oxygenation status and loco-regional control in advanced head and neck squamous cell carcinoma treated by radiation therapy. *Radiother Oncol* 57: 39-43, 2000.
- Nourse C. R., Mattei M. G., Gunning P., Byrne J. A. Cloning of a third member of the D52 gene family indicates alternative coding sequence usage in D52-like transcripts. *Biochim Biophys Acta* 1443: 155-168, 1998.
- Oberley T. D., Verwiebe E., Zhong W., Kang S. W., Rhee S. G. Localization of the thioredoxin system in normal rat kidney. *Free Radic Biol Med* 30: 412-424, 2001.
- Onate S. A., Boonyaratanakornkit V., Spencer T. E., Tsai S. Y., Tsai M. J., Edwards D. P., O'Malley B. W. The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem* 273: 12101-12108, 1998.
- Park S. Y., Kim Y. J., Gao A. C., Mohler J. L., Onate S. A., Hidalgo A. A., Ip C., Park E. M., Yoon S. Y., Park Y. M. Hypoxia increases androgen receptor activity in prostate cancer cells. *Cancer Res* 66: 5121-5129, 2006.
- Park S. Y., Yu X., Ip C., Mohler J. L., Bogner P. N., Park Y. M. Peroxiredoxin 1 interacts with androgen receptor and enhances its transactivation. *Cancer Res* 67: 9294-9303, 2007.
- Parkin D. M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74-108, 2005.
- Parmigiani R. B., Xu W. S., Venta-Perez G., Erdjument-Bromage H., Yaneva M., Tempst P., Marks P. A. HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9633-9638, 2008.
- Pingoud A, Urbanke C. Arbeitsmethoden der Biochemie. Walter de Gruyter, 1. Auflage, 1997.
- Proux V., Provot S., Felder-Schmittbuhl M. P., Laugier D., Calothy G., Marx M. Characterization of a leucine zipper-containing protein identified by retroviral insertion in avian neuroretina cells. *J Biol Chem* 271: 30790-30797, 1996.
- Proux-Gillardeaux V., Galli T., Callebaut I., Mikhailik A., Calothy G., Marx M. D53 is a novel endosomal SNARE-binding protein that enhances interaction of syntaxin 1 with the synaptobrevin 2 complex in vitro. *Biochem J* 370: 213-221, 2003.
- Quigley C. A., De Bellis A., Marschke K. B., el-Awady M. K., Wilson E. M., French F. S. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev* 16: 271-321, 1995.
- Ren P., et al. Peroxiredoxin 1 is a tumor-associated antigen in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 30: 2297-2303, 2013.
- Rhee S. G. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science* 312: 1882-1883, 2006.

- Rhee S. G., Chae H. Z., Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 38: 1543-1552, 2005.
- Rhee S. G., Kang S. W., Chang T. S., Jeong W., Kim K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* 52: 35-41, 2001.
- Riddell J. R., Bshara W., Moser M. T., Spornyak J. A., Foster B. A., Gollnick S. O. Peroxiredoxin 1 controls prostate cancer growth through Toll-like receptor 4-dependent regulation of tumor vasculature. *Cancer Res* 71: 1637-1646, 2011.
- Robert-Koch-Institut Onlinedatenbank: Krebsregisterdaten in Deutschland 2014.
- Rübben H. Uroonkologie. Springer Verlag, 5. Auflage, 485-637, 2009.
- Sakr W. A., Grignon D. J., Crissman J. D., Heilbrun L. K., Cassin B. J., Pontes J. J., Haas G. P. High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 249 cases. *In Vivo* 8: 439-443, 1994.
- Sanchez-Chapado M., Olmedilla G., Cabeza M., Donat E., Ruiz A. Prevalence of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia in Caucasian Mediterranean males: an autopsy study. *Prostate* 54: 238-247, 2003.
- Sar M., Lubahn D. B., French F. S., Wilson E. M. Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology* 127: 3180-3186, 1990.
- Schiebler TH, Korf HW. Anatomie. Steinkopf Verlag, 10. Auflage, 414-415, 2007.
- Schultz M. A., Abdel-Mageed A. B., Mondal D. The nrf1 and nrf2 balance in oxidative stress regulation and androgen signaling in prostate cancer cells. *Cancers (Basel)* 2: 1354-1378, 2010.
- Schweizer L., Rizzo C. A., Spires T. E., Platero J. S., Wu Q., Lin T. A., Gottardis M. M., Attar R. M. The androgen receptor can signal through Wnt/beta-Catenin in prostate cancer cells as an adaptation mechanism to castration levels of androgens. *BMC Cell Biol* 9: 4, 2008.
- Shau H., Gupta R. K., Golub S. H. Identification of a natural killer enhancing factor (NKEF) from human erythroid cells. *Cell Immunol* 147: 1-11, 1993.
- Shi Y., Chatterjee S. J., Brands F. H., Shi S. R., Pootrakul L., Taylor C. R., Datar R., Cote R. J. Role of coordinated molecular alterations in the development of androgen-independent prostate cancer: an in vitro model that corroborates clinical observations. *BJU Int* 97: 170-178, 2006.
- Shiota M., et al. Ets regulates peroxiredoxin1 and 5 expressions through their interaction with the high-mobility group protein B1. *Cancer Sci* 99: 1950-1959, 2008.
- Shiota M., Yokomizo A., Kashiwagi E., Takeuchi A., Fujimoto N., Uchiumi T., Naito S. Peroxiredoxin 2 in the nucleus and cytoplasm distinctly regulates androgen receptor activity in prostate cancer cells. *Free Radic Biol Med* 51: 78-87, 2011.
- Shiota M., Yokomizo A., Masubuchi D., Tada Y., Inokuchi J., Eto M., Uchiumi T., Fujimoto N., Naito S. Tip60 promotes prostate cancer cell proliferation by translocation of androgen receptor into the nucleus. *Prostate* 70: 540-554, 2010a.

- Shiota M., Yokomizo A., Tada Y., Inokuchi J., Tatsugami K., Kuroiwa K., Uchiumi T., Fujimoto N., Seki N., Naito S. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha interacts with the androgen receptor (AR) and promotes prostate cancer cell growth by activating the AR. *Mol Endocrinol* 24: 114-127, 2010b.
- Sökeland J, Rübber H. Taschenlehrbuch Urologie. Thieme Verlag, 14. Auflage, 22, 2007.
- Steuber T, Haese A, Huland H. 2010. Prostatakarzinom. Pages 1129-1155 in Hiddemann W, Bartram C, eds. Die Onkologie 2. Teil, vol. 2. Auflage Springer Verlag.
- Sugimura T. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis* 21: 387-395, 2000.
- Suzuki H., Sato N., Watabe Y., Masai M., Seino S., Shimazaki J. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46: 759-765, 1993.
- Suzuki H., Ueda T., Ichikawa T., Ito H. Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 10: 209-216, 2003.
- Tai S., Sun Y., Squires J. M., Zhang H., Oh W. K., Liang C. Z., Huang J. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate* 71: 1668-1679, 2011.
- Taplin M. E., Bubley G. J., Shuster T. D., Frantz M. E., Spooner A. E., Ogata G. K., Keer H. N., Balk S. P. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* 332: 1393-1398, 1995.
- Tarkkanen M., et al. Gains and losses of DNA sequences in osteosarcomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 55: 1334-1338, 1995.
- Thompson I. M. Chemoprevention of prostate cancer: agents and study designs. *J Urol* 178: S9-S13, 2007.
- Thompson I. M., Ankerst D. P., Chi C., Goodman P. J., Tangen C. M., Lucia M. S., Feng Z., Parnes H. L., Coltman C. A., Jr. Assessing prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *J Natl Cancer Inst* 98: 529-534, 2006.
- Thompson I. M., et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 350: 2239-2246, 2004.
- Tilley W. D., Buchanan G., Hickey T. E., Bentel J. M. Mutations in the androgen receptor gene are associated with progression of human prostate cancer to androgen independence. *Clin Cancer Res* 2: 277-285, 1996.
- Trapman J., Klaassen P., Kuiper G. G., van der Korput J. A., Faber P. W., van Rooij H. C., Geurts van Kessel A., Voorhorst M. M., Mulder E., Brinkmann A. O. Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 153: 241-248, 1988.
- Ueda T., Bruchofsky N., Sadar M. D. Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways. *J Biol Chem* 277: 7076-7085, 2002.
- Ulfig N. Histologie. Georg Thieme Verlag, 2. Auflage, 196-197, 2005.
- Ummanni Ramesh. 2008. Differentially expressed proteins in prostate cancer and functional characterization of proteins with altered expression. Dissertation. Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald.

UniProtKB Protein Knowledgebase. Onlinedatenbank.

van Steensel B., van Binnendijk E. P., Hornsby C. D., van der Voort H. T., Krozowski Z. S., de Kloet E. R., van Driel R. Partial colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in discrete compartments in nuclei of rat hippocampus neurons. *J Cell Sci* 109 (Pt 4): 787-792, 1996.

Vaupel P., Okunieff P., Neuringer L. J. Blood flow, tissue oxygenation, pH distribution, and energy metabolism of murine mammary adenocarcinomas during growth. *Adv Exp Med Biol* 248: 835-845, 1989.

Veldscholte J., Ris-Stalpers C., Kuiper G. G., Jenster G., Berrevoets C., Claassen E., van Rooij H. C., Trapman J., Brinkmann A. O., Mulder E. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 534-540, 1990a.

Veldscholte J., Voorhorst-Ogink M. M., Bolt-de Vries J., van Rooij H. C., Trapman J., Mulder E. Unusual specificity of the androgen receptor in the human prostate tumor cell line LNCaP: high affinity for progestagenic and estrogenic steroids. *Biochim Biophys Acta* 1052: 187-194, 1990b.

Visakorpi T., Hyytinen E., Koivisto P., Tanner M., Keinanen R., Palmberg C., Palotie A., Tammela T., Isola J., Kallioniemi O. P. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* 9: 401-406, 1995.

Wang R., He H., Sun X., Xu J., Marshall F. F., Zhau H., Chung L. W., Fu H., He D. Transcription variants of the prostate-specific PrLZ gene and their interaction with 14-3-3 proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 389: 455-460, 2009.

Wang R., et al. PrLZ, a novel prostate-specific and androgen-responsive gene of the TPD52 family, amplified in chromosome 8q21.1 and overexpressed in human prostate cancer. *Cancer Res* 64: 1589-1594, 2004.

Welsch U, Deller T. Sobotta Lehrbuch Histologie. Elsevier Verlag, 2. Auflage, 414-421, 2006.

Wen S. T., Van Etten R. A. The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity. *Genes Dev* 11: 2456-2467, 1997.

WHO. Cancer-Bericht. 2012.

Wieacker P., Griffin J. E., Wienker T., Lopez J. M., Wilson J. D., Breckwoldt M. Linkage analysis with RFLPs in families with androgen resistance syndromes: evidence for close linkage between the androgen receptor locus and the DXS1 segment. *Hum Genet* 76: 248-252, 1987.

Wu Y., Chhipa R. R., Zhang H., Ip C. The antiandrogenic effect of finasteride against a mutant androgen receptor. *Cancer Biol Ther* 11: 902-909, 2011.

Yanagawa T., Ishikawa T., Ishii T., Tabuchi K., Iwasa S., Bannai S., Omura K., Suzuki H., Yoshida H. Peroxiredoxin I expression in human thyroid tumors. *Cancer Lett* 145: 127-132, 1999.

Yanagawa T., Iwasa S., Ishii T., Tabuchi K., Yusa H., Onizawa K., Omura K., Harada H., Suzuki H., Yoshida H. Peroxiredoxin I expression in oral cancer: a potential new tumor marker. *Cancer Lett* 156: 27-35, 2000.

Zeigler-Johnson C. M., Spangler E., Jalloh M., Gueye S. M., Rennert H., Rebbeck T. R. Genetic susceptibility to prostate cancer in men of African descent: implications for global disparities in incidence and outcomes. *Can J Urol* 15: 3872-3882, 2008.

Zhang D., et al. PrLZ protects prostate cancer cells from apoptosis induced by androgen deprivation via the activation of Stat3/Bcl-2 pathway. *Cancer Res* 71: 2193-2202, 2011.

Zhang D., Li L., Zhang L. L., Xue Y., Wang X. Y., He D. L. [Impact of PrLZ overexpression on invasion of prostate cancer LNCaP cells in vitro]. *Ai Zheng* 28: 483-486, 2009.

Zhao X. Y., Boyle B., Krishnan A. V., Navone N. M., Peehl D. M., Feldman D. Two mutations identified in the androgen receptor of the new human prostate cancer cell line MDA PCa 2a. *J Urol* 162: 2192-2199, 1999.

Zhao X. Y., Malloy P. J., Krishnan A. V., Swami S., Navone N. M., Peehl D. M., Feldman D. Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. *Nat Med* 6: 703-706, 2000.

Zhou Z. X., Wong C. I., Sar M., Wilson E. M. The androgen receptor: an overview. *Recent Prog Horm Res* 49: 249-274, 1994.

8. Danksagung

Im Zusammenhang mit der Erstellung meiner Dissertation gilt mein besonderer Dank dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekulare Zellbiologie (IMBM) der Universitätsmedizin Greifswald für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes mit den bestmöglichen Arbeitsbedingungen. An dieser Stelle möchte ich besonders **Herrn Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Walther** danken für die zahlreichen Anmerkungen und Kommentare in den Diskussionen über die Ergebnisse sowie die weiterführende Betreuung über seine Zeit als Institutsdirektor hinaus.

Mein größter Dank gilt meinen beiden Betreuerinnen **Frau Dr. rer. nat. Heike Junker** und **Frau Dr. rer. nat. Simone Venz**, IMBM der Universitätsmedizin Greifswald. Es war für mich aus wissenschaftlicher und vor allem menschlicher Sicht ein Segen und großes Glück bei euch in der Arbeitsgruppe mitwirken zu dürfen. Abgesehen von den zahlreichen Hilfestellungen und Diskussionen, den Denkanstößen und Verbesserungsvorschlägen die mich immer weitergebracht haben, war es auch untereinander für mich ausnahmslos eine schöne Zeit mit euch. Es gab so viele gute Gespräche, auch über die Arbeit hinaus und ich habe die Zeit bei und mit euch sehr genossen. Ihr habt mich beide über einen so langen Zeitraum hinweg betreut und meinen Weg begleitet, habt mich gefordert und gefördert und standet immer mit Rat zur Seite. Der Abschluss in Humanbiologie, die Möglichkeit, das Physikikum trotz Laborarbeit zu packen und nun die Promotion, das Alles wäre ohne euch nicht möglich gewesen und ich bin dankbar dafür, dass ihr mich so unterstützt habt. Darüber hinaus hoffe ich sehr, auch in Zukunft mit euch in Kontakt bleiben zu können und hin und wieder schöne Stunden mit guten Gesprächen mit euch zu verbringen, bei denen wir hoffentlich, wie sonst auch, zusammen lachen werden. Ich danke euch für alles!

Herrn Robert Beyer, IMBM der Universitätsmedizin Greifswald, möchte ich dankend erwähnen, für die konstruktive Beratung beim Durchführen und optimieren der Versuche sowie für die Hilfe bei Fragen im Labor.

Desweiteren danke ich allen **Mitarbeitern** der **AG Junker/Venz**, für die Hilfe, Toleranz und Unterstützung während meiner Zeit hier. Sowie allen **Mitarbeitern des IMBM**, für die Hilfe und die durchweg freundliche Atmosphäre im Institut.

Die Promotion stellt auch das endgültige Ende meines Studiums dar und daher möchte ich mich auch bei meinen **Freunden** bedanken. Ihr habt mich durch das Studium mit begleitet, wart immer an meiner Seite und habt mich unterstützt wenn ich Hilfe brauchte. Ich danke

euch, dass ihr immer da wart, denn mit euch war das Studium eine großartige Zeit und ich bin froh, dass wir uns alle so gefunden haben!

Großer Dank gilt meiner **Familie** und speziell meinen **Eltern**, die mich von der Kindheit an unterstützt und gefördert haben. Die mir die Möglichkeit gegeben haben meine Interessen zu verfolgen und meine Stärken weiter auszubauen. Ohne euch und ohne eure Unterstützung auf meinem Weg, wäre dieses Studium und die Promotion nicht möglich gewesen. Ihr habt mir alles ermöglicht, was ich mir vorgenommen habe und niemals meine Motivation und mein Handeln in Frage gestellt. Es war ein langer und schwieriger Weg bis hier und ihr wart immer für mich da, in guten wie auch in schlechten Momenten. Ohne diesen Rückhalt und euer Vertrauen hätte ich es nicht geschafft und dafür bin ich euch sehr dankbar!

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Freundin **Elena Bischoff** bedanken. Gerade in der letzten Zeit hast du mich motiviert die Arbeit fertig zu schreiben und mir den Raum und die Möglichkeiten gegeben dies auch zu schaffen. Ich danke dir für deine Geduld, deine Ratschläge und die Unterstützung während der Fertigstellung. Ich bin froh, dass ich dich habe.