

Charakterisierung und funktionelle Analyse verschiedener Isoformen von Clusterin (Apolipoprotein J)

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Dem Fachbereich Biologie der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Hans-Peter Prochnow
geboren in Speyer

Mainz, 2014

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2010 bis Dezember 2013 am Institut für Pharmazie und Biochemie - Therapeutische Lebenswissenschaften erstellt.

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
1.1	ENTDECKUNG DES GLYKOPROTEINS CLUSTERIN	1
1.2	STRUKTUR UND BIOGENESE VON SEZERNIERTEM CLUSTERIN	1
1.2.1	<i>Biogenese von sezerniertem Clusterin</i>	<i>2</i>
1.2.2	<i>Struktur von sezerniertem Clusterin.....</i>	<i>3</i>
1.3	EIGENSCHAFTEN DES CLUSTERIN-GENS UND DER TRANSKRIBIERTEN mRNAs.....	4
1.3.1	<i>Der Clusterin-Genlocus codiert für mehrere mRNA-Varianten</i>	<i>4</i>
1.3.2	<i>Variante 1</i>	<i>5</i>
1.3.3	<i>Alternatives Splicing von Variante 1</i>	<i>7</i>
1.3.4	<i>Variante 2</i>	<i>7</i>
1.3.4.1	Expression von Variante 2	7
1.3.4.2	Exon 1b codiert für mehrere uORFs.....	8
1.3.5	<i>Variante 3</i>	<i>8</i>
1.4	NICHT-SEZERNIERTE FORMEN VON CLUSTERIN	9
1.4.1	<i>Verschiedene Hypothesen zur Biogenese intrazellulärer Clusterin-Formen.....</i>	<i>9</i>
1.4.1.1	Alternative Translationsstartpunkte	9
1.4.1.2	Exon-skipping	10
1.4.1.3	Retrotranslokation von hypoglykosyliertem psCLU	11
1.4.1.4	Mistranslokation des sCLU prä-Proteins CLU ₁₋₄₄₉	12
1.4.2	<i>Postulierte Lokalisation, Struktur und Funktionen nicht-sezernerter Clusterin-Formen</i>	<i>12</i>
1.4.2.1	Nukleäres Clusterin	12
1.4.2.2	Mitochondrial assoziiertes Clusterin.....	13
1.5	REGULATION, FUNKTIONEN UND BINDUNGSPARTNER VON CLUSTERIN.....	14
1.5.1	<i>Regulation der Expression von sezerniertem Clusterin</i>	<i>14</i>
1.5.2	<i>Bekannte Bindungspartner von Clusterin.....</i>	<i>15</i>
1.5.3	<i>Einflüsse von Clusterin auf (patho-)physiologische Prozesse</i>	<i>16</i>
1.5.4	<i>Clusterin bei Krebskrankheiten: Onkogen oder Tumorsuppressor?.....</i>	<i>17</i>
1.6	FUNKTION VON CLUSTERIN ALS MOLEKULARES CHAPERON	18
1.6.1	<i>Chaperone sind Hitzeschockproteine</i>	<i>18</i>
1.6.2	<i>Sezerniertes Clusterin bindet an denaturierende Proteine und verhindert deren Aggregation</i>	<i>19</i>
1.6.3	<i>Sezerniertes Clusterin fördert die Aufnahme von fehlgefalteten Proteinen in Gewebszellen.....</i>	<i>20</i>
1.6.4	<i>Wirken nicht-sezernierte Clusterin Formen als Chaperone?</i>	<i>21</i>
1.7	ROLLE VON CLUSTERIN WÄHREND DER APOPTOSE	21
1.7.1	<i>Mechanismen der zellulären Apoptose.....</i>	<i>21</i>
1.7.2	<i>Potentielle Modulation der intrinsisch induzierten Apoptose durch Clusterin</i>	<i>22</i>
1.8	ROLLE VON CLUSTERIN IM RAHMEN DER NF-κB-VERMITTELTE SIGNALTRANSDUKTION	24
1.8.1	<i>Regulation des NF-κB-Signaltransduktionswegs.....</i>	<i>24</i>
1.8.2	<i>Einfluss von CLU auf den NF-κB-Signaltransduktionsweg.....</i>	<i>25</i>
1.9	ZIELE DER ARBEIT	26
2	MATERIAL	28
2.1	LABORGERÄTE	28
2.2	CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	29
2.3	BIOLOGISCH AKTIVE SUBSTANZEN	30

2.3.1	<i>Antikörper</i>	30
2.3.2	<i>DNA-Primer</i>	31
2.3.3	<i>Enzyme</i>	31
2.3.4	<i>Plasmide</i>	31
3	METHODEN	33
3.1	ARBEITEN MIT ZELLKULTUREN	33
3.1.1	<i>Aussaat, Kultur und Konservierung von Zelllinien</i>	33
3.1.2	<i>Behandlung von Zellen mit MG-132, H₂O₂ und erhöhter Temperatur</i>	35
3.1.3	<i>Transiente Transfektion von Zellkulturen mit Expressionsplasmiden</i>	36
3.1.4	<i>Selektion eines sCLU-überexprimierenden Einzelklons</i>	37
3.1.5	<i>Ernten von Gesamtzelllysaten und Zellkulturüberständen</i>	38
3.1.6	<i>Bestimmung der Caspase 3/7-Aktivität</i>	39
3.1.7	<i>Bestimmung der NF-κB-Aktivität</i>	40
3.2	ARBEITEN MIT BAKTERIEN	41
3.2.1	<i>Kultur, Transformation und Konservierung von Bakterien</i>	41
3.2.2	<i>Plasmidpräparation aus transformierten DH5α Bakterien</i>	42
3.2.3	<i>Selektion und Stimulation von CLU₂₁₋₄₄₉⁻ und CLU₃₄₋₄₄₉⁻ überexprimierenden SG13009 Bakterien</i>	43
3.3	RNA-ANALYTIK	44
3.3.1	<i>RNA-Präparation</i>	44
3.3.2	<i>Quantifizierung von RNA-Lösungen</i>	45
3.3.3	<i>Erstrangsynthese</i>	45
3.4	DNA-ANALYTIK	46
3.4.1	<i>Quantifizierung von DNA-Lösungen</i>	46
3.4.2	<i>Sequenzierung von DNA-Molekülen nach Sanger</i>	46
3.4.3	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	46
3.4.4	<i>Restriktion und Dephosphorylierung von DNA</i>	48
3.4.5	<i>Ligation kompatibler DNA-Enden</i>	49
3.4.6	<i>Polymerase Kettenreaktion</i>	50
3.4.6.1	<i>Päparative PCR</i>	51
3.4.6.2	<i>Kolonie-PCR</i>	51
3.4.6.3	<i>5'-Rapid Amplification of cDNA-ends</i>	52
3.4.6.4	<i>"Site-directed" in vitro Mutagenese</i>	54
3.4.6.5	<i>Semi-quantitative RT-PCR (sqPCR)</i>	56
3.4.6.6	<i>Quantitative RT-PCR (qPCR)</i>	57
3.4.7	<i>Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide</i>	59
3.5	PROTEINANALYTIK	60
3.5.1	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford</i>	60
3.5.2	<i>SDS-PAGE</i>	61
3.5.3	<i>Western-Blot</i>	63
3.5.4	<i>Kolloidale Coomassie-Färbung</i>	65
3.5.5	<i>Fraktionierung von Gesamtzelllysaten</i>	65
3.5.6	<i>N-Deglykosylierung von Gesamtzelllysaten</i>	66
3.5.7	<i>Immuncytochemie und Laser Scanning Mikroskopie</i>	67
3.5.8	<i>Nickel-Affinitätschromatographie via „Fast Protein Liquid Chromatography“</i>	69

3.5.9	<i>Umpufferung und Rückfaltung der aufgereinigten CLU-Formen</i>	71
3.5.10	<i>CD-Spektroskopie</i>	72
3.5.11	<i>Analyse der Chaperonaktivität</i>	72
4	ERGEBNISSE	75
4.1	NICHT-SEZERNIERTE FORMEN VON CLUSTERIN SIND ZELLSTRESS ASSOZIIERT	75
4.2	ANALYSE DER ENDOGEN EXPRIMIERTEN CLUSTERIN-MRNA-VARIANTEN	77
4.2.1	<i>Ermittlung des Transkriptionstarts von Variante 1</i>	77
4.2.2	<i>Alternatives Splicing von Variante 1</i>	79
4.2.3	<i>Quantitative Analyse der verschiedenen Clusterin-mRNA-Varianten</i>	80
4.3	EKTOPISCHE EXPRESSION VON CLUSTERIN-CDNAS IN HEK-293-ZELLEN	83
4.3.1	<i>Proteinexpression ausgehend von den verschiedenen Clusterin-cDNA-Varianten</i>	83
4.3.2	<i>Die Expression von sezerniertem Clusterin ausgehend von Variante 2 und Variante 3 wird durch distinkte uORFs gehemmt</i>	84
4.3.3	<i>Translationsinitiation an alternativen Startcodons auf Exon 1 führt zur Expression von sCLU</i>	85
4.4	CHARAKTERISIERUNG DER BIOGENESE NICHT-SEZERNIERTER CLUSTERIN-ISOFORMEN	86
4.4.1	<i>Nicht-sezernierte CLU-Isoformen entstehen durch alternative Translationsinitiation an drei verschiedenen Nukleotid-Triplets</i>	87
4.4.2	<i>Nicht-sezernierte CLU-Isoformen sind im Cytosol lokalisiert, unglykosyliert und unterliegen teilweise post-translationaler Regulation</i>	88
4.4.2.1	Fraktionierung von Gesamtzellysate	88
4.4.2.2	Immuncytochemie mittels Laser-Scanning-Mikroskopie Clusterin-überexprimierender Zellen	89
4.4.2.3	Deglykosylierung von Zellysaten CLU-überexprimierender Zellen	91
4.4.2.4	Post-translationale Mechanismen tragen zur Akkumulation von distinkten CLU-Isoformen in MG-132 behandelten Zellen bei	92
4.5	FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNG DISTINKTER CLU-ISOFORMEN	93
4.5.1	<i>Aufreinigung verschiedener CLU-Isoformen</i>	93
4.5.1.1	<i>Aufreinigung von sCLU-V5</i>	93
4.5.1.2	<i>Aufreinigung von CLU₂₁₋₄₄₉-V5 und CLU₃₄₋₄₄₉-V5</i>	94
4.5.1.3	<i>Sekundärstrukturanalysen von sCLU-V5</i>	96
4.5.2	<i>Effekt distinkter CLU-Isoformen auf die Aggregation entfaltender Proteine</i>	96
4.5.3	<i>Einfluss distinkter CLU-Isoformen auf die Apoptose</i>	98
4.5.4	<i>Einfluss distinkter CLU-Isoformen auf den NF-κB-vermittelten Signaltransduktionsweg</i>	100
5	DISKUSSION	102
5.1	ZELLSTRESS INDUZIERT DIE EXPRESSION VON CLUSTERIN	102
5.1.1	<i>Expression von sezerniertem Clusterin in gestressten Zellen</i>	102
5.1.2	<i>Expression von nicht-sezernierten Clusterin-Formen in gestressten Zellen</i>	103
5.2	EXPRESSIONSANALYSEN DER EINZELNEN CLUSTERIN-MRNA-VARIANTEN IN UNGESTRESSTEN UND GESTRESSTEN ZELLINIEN	104
5.2.1	<i>Die Transkription von Clusterin-mRNA Variante 1 startet 23nt downstream der TATA-Box</i>	104
5.2.2	<i>Variante 1 ist, gegenüber Variante 2, Variante 3 und Variante 1 [Δex2], die dominant exprimierte Clusterin-mRNA</i>	104
5.2.3	<i>Applikation von MG-132 resultiert in einer Hitzeschockantwort und der Induktion von Clusterin-mRNA-Varianten</i>	105
5.3	EKTOPISCHE EXPRESSION DISTINKTER CLUSTERIN-CDNAS UND PROTEINEXPRESSIONSANALYSEN	107

5.3.1	<i>Die Expression aller Exon 2-enhaltenden cDNAs führt hauptsächlich zur Synthese von sezerniertem Clusterin</i>	107
5.3.2	<i>Die physiologische Relevanz der Clusterin-mRNA-Varianten 2 und 3 ist fraglich</i>	108
5.3.3	<i>Biogenese und Charakteristiken nicht-sezernerter Clusterin-Isoformen</i>	109
5.3.4	<i>Zelluläre Lokalisation nicht-sezernerter Clusterin-Isoformen</i>	111
5.3.5	<i>Regulation der Expression nicht-sezernerter Clusterin-Isoformen</i>	113
5.4	FUNKTION NICHT-SEZERNIERTER CLU-ISOFORMEN	115
5.4.1	<i>Chaperonaktivität</i>	115
5.4.2	<i>Einfluss auf die zelluläre Apoptose</i>	116
5.4.3	<i>Einfluss auf den NF-κB Signaltransduktionsweg</i>	117
5.5	PHYSIOLOGISCHE ROLLE EINZELNER CLUSTERIN-ISOFORMEN	118
5.6	AUSBLICK	120
6	ZUSAMMENFASSUNG	122
7	LITERATUR	124
8	ANHANG	I
8.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
8.2	TABELLEN	IV
8.3	SEQUENZEN DER KLONierten CLU-cDNAs	X
8.3.1	<i>CLU-cDNA-Variante 1 in pcDNA6</i>	X
8.3.2	<i>Weitere CLU-cDNA-Varianten in pcDNA6</i>	X
8.3.2.1	Variante 1 [Δ ex2]	X
8.3.2.2	Variante 1 (NM_001831.3)	XI
8.3.2.3	Variante 2	XI
8.3.2.4	Variante 3	XI
8.3.3	<i>CLU-cDNA-Varianten in pQE-30</i>	XII
8.3.3.1	Variante 1 mut 5 in pQE-30 (codiert für CLU ₂₁₋₄₄₉)	XII
8.3.3.2	Variante 1 mut 6 in pQE-30 (codiert für CLU ₃₄₋₄₄₉)	XII
8.4	MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN	XIII
	VERÖFFENTLICHUNGEN	XIV
	VERSICHERUNG	XVI

1 EINLEITUNG

1.1 Entdeckung des Glykoproteins Clusterin

Clusterin wurde erstmals 1983 in der Literatur erwähnt und als ein zellaggregierender Faktor in der Samenflüssigkeit von Schafen (*Ovis aries*) beschrieben (Fritz *et al.*, 1983). Es erhielt den Namen aufgrund seiner Fähigkeit, die Verklumpung (engl. *clustering*) verschiedener Zelltypen wie Sertolizellen, Erythrozyten oder TM-4 Zellen zu fördern. Noch im selben Jahr gelang es, Clusterin über konventionelle biochemische Techniken aus der Samenflüssigkeit zu isolieren und als 80 Kilodalton (kDa) großes, heterodimers Glykoprotein zu charakterisieren (Blaschuk *et al.*, 1983). In den folgenden Jahren wurde Clusterin von einer Reihe an Arbeitsgruppen aus den verschiedensten Fachgebieten unabhängig voneinander charakterisiert und ging so unter einer Vielzahl verschiedener Namen in die Literatur ein (vgl. Tab. 1.1). Es stellte sich schnell heraus, dass es sich bei all diesen Proteinen um Homologe des Clusterins handelt. So konnten z.B. aus *Homo sapiens* SP-40,40 (Kirszbaum *et al.*, 1989) und *Complement lysis inhibitor* (CLI) (Jenne und Tschopp, 1989) im Zusammenhang mit der Komplementregulation sowie Apolipoprotein J (ApoJ) (de Silva *et al.*, 1990) als Bestandteil von *high density lipoproteins* (HDL) charakterisiert werden. Um Konfusionen angesichts der vielen unterschiedlichen Bezeichnungen zu vermeiden, legte man sich 1992 auf einem internationalen Workshop auf die ursprünglich geprägte Bezeichnung „Clusterin“ (CLU) fest (Fritz und Murphy, 1993).

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Koch-Brandt wurde CLU zuerst 1987 unter dem Namen gp80 (80 kDa Glykoprotein) als Marker für den vektorialen i.e. apikalen Proteintransport in Kulturen der Zelllinie *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) aus *Canis lupus familiaris* untersucht. Im Rahmen dieser Analysen konnte die Biosynthese von gp80 beschrieben werden (Urban *et al.*, 1987). Es gelang schließlich die Klonierung der cDNA von gp80 (Hartmann *et al.*, 1991), sodass dessen Primärstruktur aufgeklärt werden konnte und eine 80%-ige Homologie zu SGP-2 bzw. 83%-ige Homologie zu SP-40,40 festgestellt wurde. Generell besteht zwischen den CLU-Homologen aus verschiedenen Spezies eine hohe Homologie, wobei diese im Bereich der Cystein-Cluster, welche an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt sind (vgl. 1.2.1), besonders ausgeprägt ist. Des Weiteren sind homologe Bereiche zu anderen Proteinen wie Apolipoprotein A-I oder Bestandteilen des Komplementsystems (C7, C8, C9) bekannt (Collard und Griswold, 1987; Kirszbaum *et al.*, 1989), die sich jedoch auf amphipathische Abschnitte beschränken (vgl. 1.2.2).

1.2 Struktur und Biogenese von sezerniertem Clusterin

Bei dem eingangs beschriebenen CLU handelt es sich um die sezernierte Form des Proteins (engl. *secretory Clusterin*, sCLU). Es ist in allen Körperflüssigkeiten zu finden, wobei die Konzentration im Serum zwischen 50 und 340 µg/ml, in der zerebrospinalen Flüssigkeit zwischen 1,2 und 3,6 µg/ml, in der Samenflüssigkeit jedoch bis zu 15 mg/ml betragen kann (Choi *et al.*, 1990; Rosenberg und Silkensen,

1995). In diesem Abschnitt wird die Biogenese von humanem sCLU beschrieben, wobei diese in anderen Vertebraten sehr ähnlich abläuft. Weiterhin wird auf die Struktur von sCLU eingegangen und Parallelen zu anderen Proteinen aufgezeigt.

Tab. 1.1: Übersicht der CLU-Homologen. Alle Namen bezeichnen ein zu CLU homologes Protein aus verschiedenen Spezies oder Geweben. Die jeweiligen Arbeitsgruppen arbeiteten zur Zeit der Entdeckung auf den unterschiedlichsten Gebieten und beschrieben das Protein weitestgehend unabhängig voneinander (verändert nach Rosenberg und Silnkens, 1995).

Name	Spezies	Quelle	Zusammenhang	Referenz
Clusterin	<i>Ovis aries</i>	Samenflüssigkeit	Fortpflanzung	Blaschuk et al., 1983
GPIII	<i>Bos taurus</i>	Nebennierenmark	Chromaffine Granula	Fischer-Colbrie et al., 1984
SGP-2	<i>Rattus norvegicus</i>	Sertolizellen	Fortpflanzung	Collard und Griswold, 1987
TRPM-2	<i>Rattus norvegicus</i>	Prostata	Apoptose	Leger et al., 1987
gp80	<i>Canis lupus familiaris</i>	Nierenzellen	Vektorielle Sekretion	Urban et al., 1987
T64	<i>Coturnix coturnix</i>	Neuroretinale Zellen	Zelltransformation	Michel et al., 1989
SP-40,40	<i>Homo sapiens</i>	Leber (Serum)	Komplementregulation	Kirszbaum et al., 1989
CLI	<i>Homo sapiens</i>	Leber (Serum)	Komplementregulation	Jenne und Tschopp, 1989
Apo J	<i>Homo sapiens</i>	Blut	Lipidtransport	de Silva et al., 1990
pADHC-9	<i>Homo sapiens</i>	Gehirn	Alzheimer-Krankheit	May et al., 1990
NA1/NA2	<i>Homo sapiens</i>	Blut	Lipidtransport	James et al., 1991
pTB16	<i>Homo sapiens</i>	Gehirn	Gliome/Epileptische Foci	Danik et al., 1991
K611	<i>Homo sapiens</i>	Retina	Retinitis pigmentosa	Jones et al., 1992
pc38K	<i>Sus scrofa</i>	Vaskuläre glatte Gefäßmuskulatur	Knotenbildung <i>in vitro</i>	Diemer et al., 1992

1.2.1 Biogenese von sezerniertem Clusterin

Die Translation von sCLU startet von einem Startcodon auf Exon 2 der CLU-mRNA aus (im Folgenden sCLU-Startcodon genannt) und endet an einem Stoppcodon auf Exon 9 (vgl. 1.3.1). Das entstehende prä-Proprotein besteht somit aus 449 Aminosäuren (AS), ist ca. 52 kDa groß und wird im Folgenden CLU₁₋₄₄₉ abgekürzt. Die ersten 22 AS von CLU₁₋₄₄₉ stellen ein hydrophobes Signalpeptid dar. Dieses bindet das Signalerkennungspartikel (engl. *signal recognition particle*, SRP), das den Komplex aus Ribosom und mRNA an die Translokons auf der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) dirigiert und so die co-translationale Translokation von CLU₁₋₄₄₉ in das ER-Lumen ermöglicht. Hier wird das Signalpeptid durch eine Signalpeptidase entfernt und insgesamt fünf Disulfidbrücken (Cys_{102~313}, 113~305, 116~302, 121~295, 129~285) ausgebildet (Choi-Miura et al., 1992b). Durch N-Glykosylierung an sechs Asparagin-Resten (Asn₈₆, 103, 145, 291, 354, 374) entsteht aus dem so modifizierten Polypeptid ein mannosereiches (engl. *high mannose*) Vorläuferprotein (engl. *pre-secretory CLU*, psCLU) mit einem Molekulargewicht von ca.

60 kDa (Urban *et al.*, 1987; Lakins *et al.*, 1998). Dieses wird weiter in den Golgi-Apparat transportiert, wo durch terminale Glykosylierung komplexere Polysaccharidstrukturen entstehen, welche Galactose, Fucose, Mannose, N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuraminsäure enthalten. Die Zusammensetzung und das Ausmaß der psCLU-Glykosylierung hängen vom exprimierenden Gewebe ab und können bis zu 30% des Molekulargewichts ausmachen (Kapron *et al.*, 1997; Sabatte *et al.*, 2012). Schließlich entstehen durch Schnitt einer Furin-ähnlichen Proprotein-Konvertase zwischen Arg₂₂₇ und Ser₂₂₈ eine N-terminale, 24,2 bis 31,3 kDa große α -Kette und eine C-terminale, 32,8 kDa große β -Kette, welche über die Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Das reife sCLU wird schließlich als 58,5 bis 63,5 kDa großes Glykoprotein sezerniert (Urban *et al.*, 1987; Kapron *et al.*, 1997).

Zu beachten ist, dass die oben angegebenen Molekulargewichte per Massenspektroskopie ermittelt wurden. Im Rahmen von SDS-PAGE-Analysen, wie sie z.B. in dieser Arbeit durchgeführt werden, weicht das Laufverhalten der einzelnen CLU Formen von diesen Werten ab. So wird man auf einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE psCLU als 60 bis 80 kDa große Bande und reifes sCLU als 80 kDa große Bande erkennen. Letzteres trennt sich unter reduzierenden Bedingungen in die α - und die β -Kette, welche als 34-36 kDa bzw. 37-39 kDa große Banden erscheinen.

1.2.2 Struktur von sezerniertem Clusterin

Die Primärstruktur von sCLU ist zwischen verschiedenen Spezies stark konserviert, sodass zwischen den evolutionär sehr weit entfernten Spezies *Homo sapiens* und *Danio rerio* immer noch eine Homologie von über 40% besteht, die insbesondere im Bereich Cystein-Cluster, welche an der Ausbildung der Disulfidbrücken beteiligt sind, ausgeprägt ist. Nachdem die Isolation aus der Samenflüssigkeit von *Ovis aries* gelang, konnte sCLU ein hydrophober Charakter zugeschrieben werden (Blaschuk *et al.*, 1983). Weiterhin erkannte man, dass es sich um ein azides Glykoprotein (pI=4,0) handelt, welches unter physiologischen Bedingungen sowohl als Monomer, Dimer, Tetramer sowie auch in höher oligomeren Formen vorliegt (Blaschuk *et al.*, 1983; Fritz und Murphy, 1993; Matsubara *et al.*, 1995; Wyatt *et al.*, 2009b). Mittels Circular dichroismus- und Infrarot-Spektroskopieanalysen konnte man die Sekundärstrukturelemente eingängiger charakterisieren. So lässt sich für humanes sCLU ein α -Helix Anteil von ca. 35%, ein β -Faltblatt Anteil von ca. 21%, ein β -Schleifen Anteil von ca. 15% sowie ca. 28% ungeordnete Sekundärstrukturen kalkulieren (gemittelt aus Zlokovic *et al.*, 1996; Calero *et al.*, 1999; Hochgrebe *et al.*, 2000; Stewart *et al.*, 2007; Wyatt *et al.*, 2009b). Diese Werte decken sich sehr gut mit Sekundärstrukturanalysen von murinem sCLU (Bailey *et al.*, 2001). Es konnten *in silico* fünf potentielle α -Helices vorhergesagt werden (Tyr₄₁-Leu₆₁, His₁₇₁-Leu₁₉₀, Asn₂₃₉-Gln₂₅₆, Leu₃₃₁-Gln₃₄₉, Lys₄₂₉-Lys₄₄₄) welchen ein amphipatischer Charakter zuzuschreiben ist. Auf Ebene der Tertiärstruktur scheint sCLU, neben einigen hoch organisierten Abschnitten im Bereich der Cystein-Cluster, einen hohen Anteil an sogenannten *molten globule* Domänen zu besitzen. Darunter versteht man Abschnitte, die keine definierte Tertiärstruktur besitzen, sondern ungeordnet sind, z.B. hydrophobe Bereiche frei nach außen exponieren. Prominente Beispiele für solche „an sich unstrukturierten Proteine“ (engl. *intrinsically disordered proteins*) bzw. solche, die entsprechende Domänen besitzen, sind Calcineurin, Tau-Protein, Tumorprotein 53 (p53) oder Hitzschockprotein 27 (Hsp27). Da diesen Proteinen in Teilen geordnete Tertiärstrukturen fehlen, wird ihnen eine erhöhte Flexibilität zugeschrieben. Des Weiteren

ermöglichen die ungeordneten Bereiche ein breites Interaktionsspektrum mit anderen Proteinen oder Lipiden über hydrophobe Wechselwirkungen. Dementsprechend geht man bei sCLU davon aus, dass es durch seine *molten globule* ähnliche Tertiärstruktur im Stande ist, eine Reihe von anderen Proteinen zu binden und sie so zu solubilisieren. Auf diese Eigenschaft, welche sCLU u.a. mit Hsp27 teilt, wird später noch näher eingegangen (vgl. 1.5). Vermutlich aufgrund des großen Anteils an ungeordneten Domänen war es bisher auch nicht möglich eine Kristallstrukturanalyse von sCLU durchzuführen (Carver *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2008).

1.3 Eigenschaften des Clusterin-Gens und der transkribierten mRNAs

Neben sCLU sind auch nicht-sezernierte Formen bekannt, welche im Rahmen dieser Arbeit eingehend beleuchtet werden. Die folgenden Abschnitte sollen einen Überblick über die Genetik von CLU geben. Anschließend werden die derzeit in der Literatur verankerten Hypothesen zur Entstehung von nicht-sezernierten CLU-Formen vorgestellt (vgl. 1.4). Nach einer kurzen Zusammenfassung der bekannten Funktionen von CLU (1.5) werden schließlich die verschiedenen CLU-Formen spezifisch im Hinblick auf ihre Aktivität als molekulare Chaperone, auf ihre Rolle bei apoptotischen Prozessen sowie auf ihre Eigenschaft als Modulatoren der zellulären Signaltransduktion beleuchtet (vgl. 1.6, 1.7, 1.8).

1.3.1 Der Clusterin-Genlocus codiert für mehrere mRNA-Varianten

Das humane CLU-Gen wurde Anfang der 1990er Jahre als 17,8 Kilobasen (kb) langer Abschnitt auf Chromosom 8 (8p21-p12) identifiziert (Purrello *et al.*, 1991; Tobe *et al.*, 1991; Fink *et al.*, 1993; Wong *et al.*, 1993; Wong *et al.*, 1994). Zur gleichen Zeit konnten unter anderem auch die CLU-Genloci in *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* lokalisiert werden (Jordan-Starck *et al.*, 1994; Rosemblyt und Chen, 1994). Mittlerweile sind die genauen Loci des CLU-Gens in einer Vielzahl von Tieren bekannt, wobei es sich ausschließlich in Vertebraten findet. So sind der Zebrafisch *Danio rerio* und die Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss* als die von *Homo sapiens* evolutionär am weitesten entfernten Verwandten zu nennen, in denen das CLU-Gen identifiziert werden konnte (Londou *et al.*, 2008).

Das Gen gehört zu den *single-copy* Genen, d.h. es kommt nur jeweils eine Kopie im haploiden Genom vor. Es codiert bei *Homo sapiens* für mindestens drei mRNA Varianten, welche alle in der *NCBI-GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) aufgelistet sind: Variante 1 (NM_001831.3), Variante 2 (NR_038335.1) und Variante 3 (NR_045494.1). Diese besitzen dieselben Exons 2 bis 8, unterscheiden sich jedoch in ihrer Exon 1-Sequenz voneinander (Exon 1a, 1b oder 1c; vgl. Abb. 1.1). Charakteristische Abschnitte auf den mRNAs sind zum einen der Bereich, der für eine Signalsequenz codiert (engl. *signal sequence coding region*, SSCR) und sich auf Exon 2 befindet. Die SSCR wird zur Signalsequenz (Signalpeptid) translatiert, die die co-translationale Translokation des sCLU prä-Proteins ins ER ermöglicht (vgl. 1.2.1). Des Weiteren ist das sCLU-Startcodon auf Exon 2 unmittelbar vor der SSCR zu nennen, welches die Translation von sCLU initiiert (in Abb. 1.1 in roter Schrift dargestellt). Weitere potentielle Startcodons befinden sich auf Exon 1a, Exon 1c und Exon 3. Inwiefern diese Translationsstartpunkte genutzt werden, wurde in der Literatur diskutiert und im Laufe dieser Arbeit eingehend analysiert.

Die Tatsache, dass alle drei CLU-mRNAs ein unterschiedliches Exon 1 besitzen, lässt vermuten, dass die Transkription der Varianten von verschiedenen Promotoren ausgeht (alternative Transkriptionsinitiation), was *in silico* für die Varianten 1 und 2 postuliert wurde (Rizzi *et al.*, 2009b). Ein ähnlicher Fall ist u.a. beim humanen Aldolase-Gen bekannt, das mehrere aktive Promotoren besitzt, die zur Transkription von mRNAs mit unterschiedlichen Exon 1-Sequenzen beitragen (Mukai *et al.*, 1991). Strukturelle Analysen des CLU-Promotorbereichs wurden vor allem im Genom von *Rattus norvegicus* durchgeführt, jedoch weisen die Bereiche zwischen -306 bis -48 Nukleotiden (nt) und -1297 bis -1238 nt relativ zu Exon 1a bei *Homo sapiens* einen hohen Grad an Homologie (>83 %) auf (Wilson *et al.*, 1995). Als wichtigste der bekannten regulatorische Sequenzen sind, neben einer TATA-Box, Konsensussequenzen für die Transkriptionsfaktoren AP-1, AP-2 und Sp1 (Wong *et al.*, 1994; Jin und Howe, 1999), B-MYB (Cervellera *et al.*, 2000), CBF (Lymar *et al.*, 2000), NF- κ B (Li *et al.*, 2002; Saura *et al.*, 2003) und TCF-1 (Schepler *et al.*, 2007) zu nennen. Zudem legen unterschiedliche Promotormethylierungszustände, die mit dem Ausmaß der CLU-Expression in verschiedenen Geweben von *Homo sapiens* und *Rattus norvegicus* korrelieren, eine epigenetische, DNA-methylierungsabhängige Regulation von CLU nahe (Rosembly und Chen, 1994; Nuutinen *et al.*, 2005; Lund *et al.*, 2006; Suuronen *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2009).

Besonderes Augenmerk liegt in dieser Arbeit auf dem Promotorelement CLE (engl. *Clusterin element*). CLE ist ein sogenanntes *heat shock element* (HSE) und beinhaltet eine bis auf ein Nukleotid perfekte Konsensussequenz zur Bindung der Transkriptionsfaktoren HSF-1 und HSF-2 (engl. *heat shock factors*). Diese ermöglichen die verstärkte Transkription von Hitzeschockproteinen im Rahmen der zellulären Stressantwort (vgl. 1.6.1). Auch eine Induktion von CLU durch HSFs ist bekannt (Michel *et al.*, 1997; Viard *et al.*, 1999; Loison *et al.*, 2006). Bevor auf diese Aspekte eingegangen wird, soll zuerst ein Überblick über die einzelnen CLU-mRNA-Varianten gegeben werden.

1.3.2 Variante 1

Die CLU-mRNA-Variante 1 konnte zuerst 1989 von Kirszbaum *et al.* im Rahmen der Charakterisierung des CLU Homologen SP-40,40 aus Leberzellen (vgl. Tab. 1.1) beschrieben werden (Kirszbaum *et al.*, 1989). 1994 stellten Wong *et al.* eine Sequenz mit einem 30 nt längeren 5' Bereich fest (Wong *et al.*, 1994), jedoch wurde es versäumt, diese Sequenz in die Datenbank einzustellen. So ging die von Kirszbaum *et al.* gefundene Sequenz als X14723.1 in die *NCBI-GenBank* ein. Diese wurde bis ins Jahr 2004 als *reference sequence* (RefSeq) NM_001831.1, eine generierte Konsensussequenz, die sich aus Sequenzierungen des gleichen Bereichs aus verschiedenen Quellen zusammensetzt, geführt. Da im Laufe der Jahre Massensequenzierungstechnologien routinemäßig genutzt wurden, kamen eine Fülle (>600) an cDNA-Sequenzen und sogenannte ESTs (engl. *expressed sequence tags*; kurze, sequenzierte Abschnitte des Transkriptom) von CLU-Variante 1 zur *NCBI-GenBank* hinzu (einsehbar über den *UCSC Genome Browser*, <http://genome-euro.ucsc.edu/>). Der RefSeq-generierende Algorithmus bindet alle zur Verfügung stehenden Informationen ein und so wurde seit 2004 eine neue RefSeq der CLU-Variante 1 (NM_001831.2) geführt, die ein um 140 nt längeres 5'-Ende als NM_001831.1 aufweist (vgl. Abb. 1.1 A, rosa vs. violett gefärbter Bereich des Exon 1a). 2011 wurde diese RefSeq nochmals leicht

modifiziert (NM_001831.3). Gleiches gilt u.a. auch für die CLU-mRNAs von *Pan troglodytes*, *Mus musculus* und *Rattus norvegicus*, die seit entsprechenden Datenbankaktualisierungen ein bis zu 450 nt-umfassendes Exon 1 aufweisen.

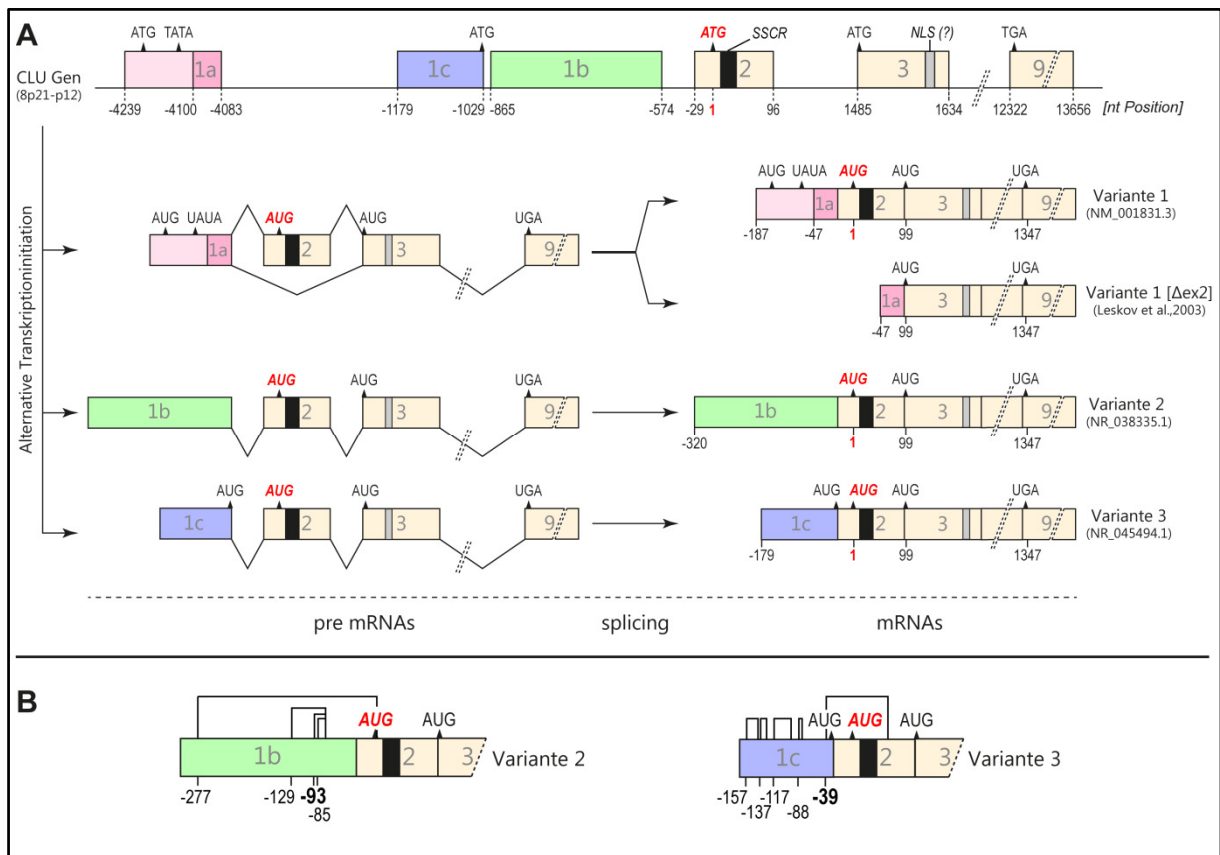


Abb. 1.1: Übersicht der bekannten CLU-mRNA Varianten. (A) Das humane CLU-Gen befindet sich auf Chromosom 8p21-p12 und codiert für mindestens 3 prä-mRNAs, welche durch alternative Transkriptionsinitiation entstehen. Sie besitzen alle eine spezifische Exon 1-Sequenz (Exon 1a, 1b, 1c), sind aber von Exon 2 bis Exon 9 identisch. Exon 2 enthält das sCLU-Startcodon (rot, nt-Position=1) und die *signal sequence coding region* (SSCR, schwarze Box). Die in der NCBI-Datenbank vorhandene RefSeq von Variante 1 wurde im Jahr 2004 reevaluiert und enthält nun ein 5'-verlängertes Exon 1a (rosa vs. violett gefärbter Bereich), wodurch ein *in-frame* Startcodon *upstream* des sCLU-Startcodons nun Teil der mRNA ist. Eine ähnliche Konstellation ist bei Variante 3 erkennbar. Durch *Exon 2-skipping* entsteht, nach Leskov *et al.*, ausgehend von der Variante 1-prä-mRNA die Variante 1 [Δex2], der das Exon 2 und somit die SSCR fehlt. Dadurch gelangt ein *in-frame* Startcodon auf Exon 3 sowie ein potentielles, kryptisches *nuclear localization signal* (NLS, graue Box) an das 5'-Ende der mRNA. Variante 1 [Δex2] wurde vor der Erneuerung der Variante 1-RefSeq postuliert. **(B)** Variante 2 und Variante 3 besitzen in ihrem Exon 1 eine Reihe von uORFs (vgl. 1.3.4.2), wobei jeweils der Längste das sCLU-Startcodon überspannt. Die durch fette Zahlen hervorgehobenen uORFs sind laut der Software *NetStart 1.0 Prediction* die mit der höchsten Translationswahrscheinlichkeit (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetStart/>).

Bei Variante 1 von *Homo sapiens* ist die TATA-Box als eigentlich typisches Promotorelement nun Bestandteil des Exon 1a der mRNA. Des Weiteren ist ein Startcodon *upstream* des sCLU Startcodons in erster Position vorhanden. Sollte dieses Startcodon die Translation einleiten können ist unklar, ob die nun recht weit interne SSCR bzw. das von ihr codierte Signalpeptid aktiv bleibt um weiterhin eine korrekte co-translationale Translokation des sCLU-prä-Proteins ins ER zu ermöglichen. Angesichts dieser ungewöhnlichen Konstellation ist fraglich, ob es sich bei NM_001831.3 um die tatsächliche Sequenz von mRNA Variante 1 handelt, oder ob ein Sequenzierungsartefakt vorliegt. Die Identifikation des genauen 5'-Endes von CLU-Variante 1 ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.3.3 *Alternatives Splicing von Variante 1*

Im Jahr 2003 tauchten erste Anzeichen in der Literatur auf, dass eine alternative Form von CLU-mRNA Variante 1 über alternatives Splicing gebildet werden kann. Konkret handelt es sich dabei um eine mRNA, der durch Exon-*skipping* das für die SSCR-codierende Exon 2 fehlt (Variante 1 [Δ ex2], vgl. Abb. 1.1 A). Diese wurde in der Brustkrebszelllinie MCF-7 mittels reverser Transkription und PCR identifiziert: durch Anwendung eines Exon 1a-spezifischen *forward*-Primers und eines Exon 4-spezifischen *reverse*-Primers zeigte sich neben dem PCR-Produkt bestehend aus den Exons 1-2-3-4 noch ein kürzeres, das nur die Exons 1-3-4 enthielt (Leskov *et al.*, 2003). Die Autoren legten ihren Untersuchungen die zu dieser Zeit aktuelle RefSeq NM_001831.1 (vgl. 1.3.2) zugrunde. Sie postulierten, da sich das auf Exon 3 befindende Startcodon nun in vorderster Position findet, dass das entstehende 47 kDa große CLU-Protein durch Fehlen eines Signalpeptids nicht mehr ins ER transloziert wird. Vielmehr ging man in dieser und anderen Studien davon aus, dass, wenn man die Zellen einem gewissem Stress, z.B. ionisierender Strahlung, aussetzt, das Protein durch Vorhandensein mehrerer potentieller Kernlokalisierungssignale (engl. *nuclear localization signals*, NLS) in den Nukleus transloziert wird (Leskov *et al.*, 2003; Leskov *et al.*, 2011). Es bleibt jedoch unklar, inwieweit dies zutrifft, wenn man die aktualisierte Variante 1 (RefSeq NM_001831.3) als Ausgangspunkt für das Exon-*skipping* zugrunde legt: in diesem Fall wäre nicht das Startcodon auf Exon 3, sondern das auf Exon 1a in vorderster Position, was den N-Terminus sowie das Molekulargewicht des entstehenden Proteins massiv verändern würde (Rizzi und Bettuzzi, 2008). Dieser Gedanke wird später im Zusammenhang mit der Entstehung von intrazellulären CLU-Formen nochmals aufgegriffen (vgl. 1.4.1.2).

Seit der Entdeckung von Variante 1 [Δ ex2] kam es zu Kontroversen, da andere Arbeitsgruppen die Existenz dieser mRNA mit ähnlichen experimentellen Ansätzen nicht bestätigen konnten (Andersen *et al.*, 2007; Schepeler *et al.*, 2007; Rizzi *et al.*, 2009b). Daher ging man entweder davon aus, dass sich die Expression von Variante 1 [Δ ex2] auf MCF-7-Zellen beschränkt oder es sich dabei gar um ein experimentelles Artefakt handelt (Rizzi *et al.*, 2009a; Rizzi *et al.*, 2009b; Rizzi und Bettuzzi, 2010).

1.3.4 *Variante 2*

1.3.4.1 *Expression von Variante 2*

CLU-mRNA-Variante 2 wurde erstmals im Jahr 1989 erwähnt und im Rahmen dieser Untersuchungen kloniert. Sie stellt chronologisch gesehen die erste bekannte CLU-mRNA-Sequenz dar (Jenne und Tschopp, 1989). Interessanterweise wurde für diese Analysen die gleiche cDNA-Datenbank benutzt, die auch Kirszbaum *et al.* zur Klonierung von Variante 1 verwendeten (Kirszbaum *et al.*, 1989). Dies würde für die oben beschriebene Theorie sprechen, dass die Transkription der verschiedenen mRNAs von distinkten Promotoren ausgeht. Entsprechender Fall ist beim CLU-Gen von *Coturnix coturnix* bekannt, von dem zwei Transkripte zu jeweils gleichen Teilen exprimiert werden (Michel *et al.*, 1995). Nimmt man jedoch die Datenbank an gegenwärtig bekannten humanen CLU cDNAs und ESTs als Grundlage (einsehbar über den *UCSC Genome Browser*), so erkennt man, dass die Fülle dieser Sequenzen die mRNA Variante 1 repräsentieren (vgl. 1.3.2). Somit sollte Variante 2 im Vergleich zu Variante 1

deutlich geringer exprimiert sein, da nur wenig Sequenzierdaten bekannt sind. In der Tat konnte durch quantitative PCR-Analysen verschiedener (Krebs-)Gewebzellen bestätigt werden, dass 10^6 - bis 10^8 -mal mehr Kopien von Variante 1 als von Variante 2 vorhanden sind (Scheperle *et al.*, 2007). Die Tatsache, dass trotz alledem Variante 2 vor Variante 1 kloniert wurde, kann nur auf ein Zufallsereignis zurückzuführen sein. Ein analoger Fall ist bei der Klonierung der CLU-mRNA aus *Rattus norvegicus* aufgetreten. Hier wurde eine stark unterrepräsentierte mRNA (Collard und Griswold, 1987) vor der eigentlich dominanten mRNA (Leger *et al.*, 1987; Bettuzzi *et al.*, 1989) isoliert. Jedoch wird hier die, im Vergleich zu Variante 1 unterrepräsentierte, mRNA nicht mehr in der *NCBI-GenBank* geführt, vermutlich wegen mangelnder Sequenzdaten.

1.3.4.2 Exon 1b codiert für mehrere uORFs

Wie bereits erwähnt, unterscheidet sich Variante 2 von Variante 1 im Exon 1b. Dies enthält kein Startcodon im CLU-Leserahmen, sodass man davon ausging, diese Variante müsse gleichermaßen zur Expression von sCLU beitragen, da das sCLU-Startcodon auf Exon 2 weiterhin in vorderster Position ist (Trogakos *et al.*, 2009a; Rizzi und Bettuzzi, 2010). Experimentelle Daten, welche diese Hypothese stützen, fehlen jedoch bislang. Zudem wurde außer Acht gelassen, dass Exon 1b insgesamt vier Startcodons außerhalb des CLU Leserahmens aufweist, die alle den Anfang eines zwischen 12 und 228 nt langen, geschlossenen Leserahmens darstellen (vgl. Abb. 1.1B). Man bezeichnet solche Leserahmen im Englischen als *upstream open reading frames* (uORFs), da sie oberhalb des Hauptleserahmens (hier CLU) im 5'-untranslatierten Bereich liegen. Ähnliche uORFs sind bereits bei anderen mRNAs aus unterschiedlichen Taxa identifiziert worden, wo sie regulatorische Funktionen besitzen (Meijer und Thomas, 2002). Ein Beispiel ist die mRNA des Transkriptionsfaktors GCN4 aus *Saccharomyces cerevisiae*, dessen Translation durch uORFs reguliert wird (Miller und Hinnebusch, 1989; Meijer und Thomas, 2002). Eine entsprechende Wirkung der Exon 1b uORFs auf die Translation von CLU-Protein wird zurzeit diskutiert (Rizzi *et al.*, 2009b), experimentelle Daten stehen jedoch noch nicht zur Verfügung. Die *NCBI-GenBank* führt die Variante 2 aufgrund der vorhandenen uORFs als „nicht-proteincodierend“, da diese die mRNA potentiell für den NMD (engl. *nonsense mediated mRNA decay*)-vermittelten Abbau markieren (Ruiz-Echevarria und Peltz, 2000; Maquat und Carmichael, 2001).

1.3.5 Variante 3

Über Clusterin mRNA Variante 3 ist von allen erwähnten Varianten am wenigsten bekannt. Die Existenz von Variante 3 wurde 2007 von Andersen *et al.* über *in silico* Analysen postuliert und im Rahmen dieser Studie auch dessen Expression in Gewebeproben der kolorektalen Schleimhaut mittels quantitativer PCR bestätigt; quantitative Aussagen wurden keine getroffen (Andersen *et al.*, 2007). Die veröffentlichte Sequenz ging in die *NCBI-GenBank* ein, wurde jedoch umgehend als „nicht-proteincodierend“ deklariert. Analog zu Variante 2 lässt sich dies auf das Vorhandensein von fünf uORFs auf Exon 1c zurückführen, die eine Größe zwischen 6 und 126 nt aufweisen (vgl. Abb. 1.1B). Interessanterweise ist noch ein weiteres Startcodon auf Exon 1c lokalisiert, welches im CLU Leserahmen liegt (vgl. Abb. 1.1A). Sollte dieses Startcodon aktiv sein, tritt hier ein ähnlicher Fall ein wie bereits für Variante 1 (NM_001831.3) geschildert: das durch die SSCR codierte Signalpeptid findet sich nun nicht mehr am

N-Terminus des Proteins, was seine korrekte Funktion in Frage stellt (vgl. 1.3.2). Somit bleibt auch hier offen, für welche Proteinformen Variante 3 codiert bzw. ob die vorhandenen uORFs einen Einfluss auf die Translation des Hauptleserahmens haben.

1.4 Nicht-sezernierte Formen von Clusterin

Bis Mitte der 1990er Jahre waren sCLU und seine Vorläuferproteine als die einzigen CLU-Formen bekannt. Jedoch wurden seither Beobachtungen gemacht, welche eine Assoziation von Clusterin mit dem Nukleus in traumatischen Zellen nahelegten (Wilson *et al.*, 1995; Reddy *et al.*, 1996a). Man ging davon aus, das u.a. eine kryptische NLS auf Exon 3 aktiv wird, sobald die Translation an dem davorliegenden Startcodon (Exon 3 Startcodon, vgl. Abb. 1.1) initiiert. Genaue Mechanismen wie dies passiert waren nicht bekannt. Dies sollte sich 2003 ändern, als Leskov *et al.* die Expression einer nukleären CLU-Form durch das vorrausgehende Exon 2-*skipping* von Variante 1 postulierten (Variante 1 [Δ ex2], vgl. 1.3.3). Fortan wurde in einer Reihe von Publikationen, die sich mit der Expression der nukleären CLU Form befassten, versucht ihre Charakteristiken zu erforschen (vgl. Anhang. Tab. 8.1). Häufig konnte in all diesen Untersuchungen ein Zusammenhang mit der zellulären Apoptose festgestellt werden, was wiederum manche Forscher zur Reevaluation alter Daten veranlasste (Bettuzzi *et al.*, 1989; Bettuzzi und Rizzi, 2009). Neben der nukleären wurden weitere, nicht-sezernierte CLU Formen, d.h. weder zellassoziertes psCLU noch sCLU, beschrieben, deren Auftreten ebenfalls eng mit Zellstress assoziiert ist (z.B. Balantinou *et al.*, 2009; Rizzi *et al.*, 2009a).

Tab. 8.1 (vgl. Anhang 8.2) fasst die am häufigsten zitierten Publikationen zusammen, welche sich mit der Expression nicht-sezernierter CLU-Formen beschäftigen. Hier wird ersichtlich, dass es bezüglich der Biogenese, der Lokalisation und der Funktionen dieser Proteine keinen Konsens gibt. Entsprechende Punkte wurden in der vorliegenden Arbeit eingängig erforscht und Teile der gewonnenen Daten bereits publiziert (Prochnow *et al.*, 2013). In den folgenden Abschnitten soll ein Überblick über die wichtigsten Hypothesen zur Biogenese potentiell nicht-sezernierter CLU-Formen gegeben und deren postulierte Funktionen zusammengefasst werden.

1.4.1 Verschiedene Hypothesen zur Biogenese intrazellulärer Clusterin-Formen

Eine Möglichkeit, wie es zur Expression nicht-sezernierter CLU-Formen kommen kann, wurde bereits genannt (Exon 2-*skipping*), jedoch werden zurzeit mindestens vier Hypothesen diskutiert. Diese werden hier alle eingängiger beleuchtet und im Rahmen diese Arbeit ausführlich analysiert und diskutiert. Sie beinhalten transkriptionell (vgl. 1.4.1.2), translational (vgl. 1.4.1.1) sowie post-translational (vgl. 1.4.1.3 und 1.4.1.4) regulatorische Mechanismen. Abb. 1.2 gibt eine Darstellung dieser verschiedenen Mechanismen wieder.

1.4.1.1 Alternative Translationsstartpunkte

Wie aus Tab. 8.1 (vgl. Anhang 8.2) ersichtlich, ging man in den ersten Arbeiten bezüglich nicht-sezernierter CLU-Formen davon aus, dass durch Translationsinitiation am Exon 3 Startcodon auf der CLU-

mRNA ein Polypeptid entsteht, das mehrere kryptische NLS trägt. Eine davon, nahe am N-Terminus, hat ausgeprägte Homologien zur NLS des großen T-Antigens des *simian virus 40*. Somit könne das entstehende CLU-Polypeptid, welches aus den AS 34 bis 449 (CLU₃₄₋₄₄₉) ausgehend vom sCLU-prä-Protein besteht, in den Nukleus translozieren (Reddy *et al.*, 1996a). Diese Theorie wurde in weiteren Publikationen immer wieder aufgegriffen, jedoch konnte man nie erklären, wie es zu der internen Translationsinitiation kommt (Yang *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000; Leskov *et al.*, 2001; Moretti *et al.*, 2007). Potentielle Möglichkeiten stellen das im englischen als *leaky scanning* bekannte Model oder die sogenannten internen ribosomalen Eintrittsstellen (engl. *internal ribosomal entry sites*, IRES) dar (vgl. Abb. 1.2 A). Im ersten Fall müsste man davon ausgehen, dass die Translationsinitiation am sCLU Startcodon auf Exon 2 nicht absolut ist und so ein geringer Teil der Ribosomen erst am Exon 3 Startcodon initiiert (Kozak, 2002). Eine Isoform des eukaryontischen Transkriptionsfaktors E2F-3, i.e. E2F-3B, wird über diesen Mechanismus synthetisiert, was in einem kürzeren N-Terminus resultiert. Interessanterweise dient hier ein unkonventionelles ACG Triplet als Startcodon der E2F-3B Isoform (He *et al.*, 2000). Der zweite Fall setzt das Vorhandensein einer IRES voraus um die Translation am Exon 3 Startcodon der CLU-mRNA zu gewährleisten. Eine IRES stellt ein definiertes mRNA-Sekundärstrukturmotiv dar, welches eine Gruppierung des Ribosoms an einer internen Stelle der mRNA ermöglicht. Das Vorhandensein einer IRES ist jedoch aufgrund ihrer Komplexität kaum *in silico* vorherzusagen und experimentell schwer zu beweisen (Baird *et al.*, 2006). Beispiele für eukaryontische IRES sind in den mRNAs von *c-myc* (engl. *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) und FGF-2 (engl. *fibroblast growth factor-2*) zu finden, welche die Expression verschiedener Isoformen ermöglichen und teilweise auch unkonventionelle Triplets (CUG) als Startcodons besitzen (Vagner *et al.*, 1995; Stoneley *et al.*, 1998).

Neben dem Exon 3 Startcodon wurde auch die alternative Translationsinitiation an den Startcodons auf Exon 1a (nur auf CLU Variante 1 NM_001831.3, vgl. Abb. 1.1) bzw. auf Exon 1c (nur auf CLU Variante 3, vgl. Abb. 1.1) zur Biosynthese nicht-sezernerter CLU-Formen diskutiert (vgl. Abb. 1.2. B). Laut *in silico* Analysen sollten die von diesen Startcodons aus gebildeten Proteine eine cytoplasmatische bzw. nukleäre Lokalisation aufweisen (Rizzi *et al.*, 2009b). Experimentelle Daten hierzu gibt es bislang keine.

1.4.1.2 Exon-skipping

Wie bereits geschildert, wurde das Exon-*skipping* für CLU-mRNA-Variante 1 (NM_001831.1) in MCF-7-Zellen beschrieben und führt zu einem Verlust von Exon 2 (Variante 1 [Δex2], vgl. 1.3.3). Da Exon 2 für das ER-Signalpeptid codiert und dieses entsprechend auf Variante 1 [Δex2] fehlt, ist das Exon 3 Startcodon nun in vorderster Position und somit die folgende NLS am N-Terminus des entstehenden Polypeptids (vgl. Abb. 1.2 C). Dies bedeutet, dass das Exon 2-*skipping* letztendlich zum selben Protein führen würde (CLU₃₄₋₄₄₉), das auch potentiell durch interne Translationsinitiation auf Exon 3 gebildet wird (Leskov *et al.*, 2003). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass in murinen Spezies kein Startcodon auf Exon 3 der mRNA vorhanden ist. Dafür findet sich ein weiteres Startcodon *downstream* der SSCR auf Exon 2. Somit würde ein Exon 2-*skipping* hier nicht die Expression eines nicht-sezernierten Proteins ermöglichen. Des Weiteren muss die Exon-*skipping* Hypothese auch für *Homo sapiens* validiert werden: auf Grundlage von Variante 1 NM_001831.3, deren Existenz 2003 noch nicht bekannt

war, würde ein Fehlen von Exon 2 nicht das Exon 3 Startcodon in die vorderste Position bringen, da nach wie vor ein auf Exon 1 liegendes Startcodon vorhanden ist (vgl. 1.3.2).

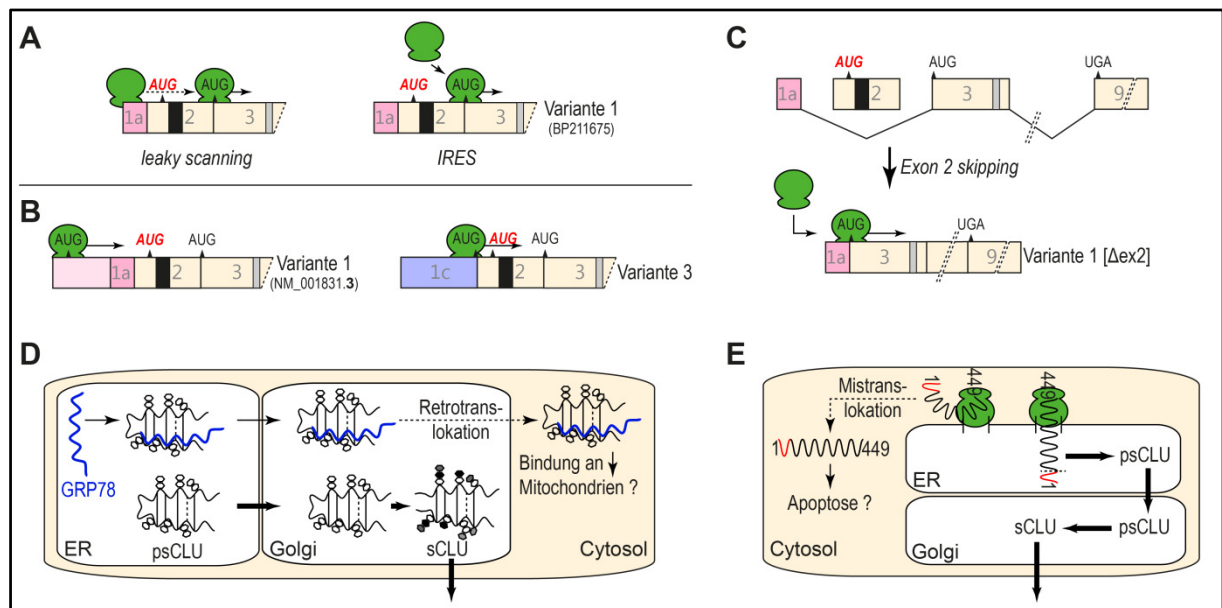


Abb. 1.2: Hypothesen zur Entstehung nicht-sezernerter CLU-Formen. (A) Durch interne Translationsinitiation, die potentiell auf allen CLU-mRNA-Varianten stattfinden könnte, wird ein Signalsequenz-looses Protein (i.e. CLU₃₄₋₄₄₉) ausgehend von Exon 3 gebildet, welches eine potentielle NLS am N-Terminus trägt. Dies kann durch ausbleibende Translationsinitiation am sCLU-Startcodon geschehen (*Leaky scanning*) oder durch eine kryptische *internal ribosome entry site* (IRES) erreicht werden. (B) Translationsstart an alternativen Startcodons auf Variante 1 (NM_001831.3) und Variante 3 könnte zur Synthese von Proteinen mit noch unbekannter Lokalisation führen. (C) Die durch *Exon 2-skipping* hervorgehende Variante 1 [Δex2] codiert für ein Signalsequenz-looses Protein (i.e. CLU₃₄₋₄₄₉). (D) Ein geringer Teil des psCLU könnte in Zellstress-Situationen vom ER/Golgi-Kompartiment ins Cytosol translozieren (Retrotranslokation) und dort potentiell an Mitochondrien binden. Begünstigt wird dies möglicherweise durch das Co-Chaperon GRP78. (E) Aufgrund der nicht absoluten Affinität der Signalsequenz zum Translokator auf der ER-Membran könnten geringe Anteile des sCLU-prä-Proteins im Cytosol akkumulieren (Mistranslokation) und dort potentiell pro-apoptotisch wirken.

1.4.1.3 Retrotranslokation von hypoglykosyliertem psCLU

Einen gänzlich anderen Mechanismus zur Entstehung nicht-sezernerter CLU-Formen beschreibt die Retrotranslokations-Hypothese (vgl. Abb. 1.2 D). Man geht bei diesem post-translational wirkenden Mechanismus davon aus, dass unter ER-Stresssituationen psCLU (60 kDa) vom distalen Golgi-Apparat ins Cytosol translozieren kann (Nizard *et al.*, 2007). Im Normalfall würden solche retrotranslozierten Formen umgehend ubiquitiniert und proteasomal verdaut werden (engl. *endoplasmic reticulum associated protein degradation*, ERAD). Sollte infolge massiven Stresses das Proteasom überlastet oder gar geblockt sein, so kommt es zu einer Akkumulation dieser CLU-Formen, welche im Vergleich zum reifen sCLU eine geringere Glykosylierung aufweisen. In weiteren Arbeiten wurde vermutet, dass das ER/Golgi-ständige Chaperon GRP78 (engl. *glucose-regulated protein*, 78 kDa) für die Translokation dieser hypoglykosylierten psCLU-Formen eine zentrale Rolle spielt. Es wird ebenso wie CLU unter ER-Stressbedingungen aufreguliert, bindet an psCLU und erleichtert dessen Retrotranslokation ins Cytosol. Auf diese Weise translozierte Proteine könnten die Assoziation von 60 kDa CLU-Formen mit Mitochondrien erklären (Zhang *et al.*, 2005; Trougakos *et al.*, 2009b; Li *et al.*, 2012, vgl. 1.4.2.2). Auch die beobachtete Bindung von intrazellulärem 60 kDa großen CLU mit der cytoplasmatischen Domäne des TGF-β-Rezeptors lässt sich durch eine vorrausgehende Retrotranslokation von psCLU interpretieren (Reddy *et al.*, 1996b; Nizard *et al.*, 2007).

1.4.1.4 Mistranslokation des sCLU prä-Proteins CLU₁₋₄₄₉

Die aktuellste Hypothese zur Biogenese nicht-sezernierter CLU-Formen geht davon aus, dass das ER-Signalpeptid im Vergleich zu anderen Signalpeptiden, z.B. dem des Prolaktins, eine ineffizientere co-translationale Translokation des prä-Proteins CLU₁₋₄₄₉ vermittelt (Choi *et al.*, 2013). Das bedeutet, dass Teile des prä-Proteins nicht ins ER synthetisiert werden, sondern im Cytosol akkumulieren könnten (vgl. Abb. 1.2 E). Diese Mistranslokation ist auch bei anderen Proteinen zu beobachten, die ein ähnlich schwaches Signalpeptid aufweisen, so z.B. Prion Protein (engl. *major prion protein*, PrP), Interferon- γ , Angiotensinogen oder Calreticulin (Kim *et al.*, 2002; Shaffer *et al.*, 2005; Orsi *et al.*, 2006). Interessant scheint die Tatsache, dass das Ausmaß der Mistranslokation nicht auf eine unterschiedliche Affinität verschiedener Signalpeptide zum SRP, sondern auf die Affinität des Signalpeptid-SRP Komplexes zum Translokon Sec61 in der ER-Membran zurückzuführen ist, wobei die genaue Ursache noch nicht aufgeklärt werden konnte. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das zyklische Oligopeptid Cotransin im Stande ist, die co-translationale Translokation zu blockieren und somit die Mistranslokation von CLU₁₋₄₄₉ massiv zu fördern (Choi *et al.*, 2013).

1.4.2 Postulierte Lokalisation, Struktur und Funktionen nicht-sezernierter Clusterin-Formen

1.4.2.1 Nukleäres Clusterin

Erste Berichte von nicht-sezernierten Clusterin-Formen, d.h. solche, die weder mit dem ER, dem Golgi-Apparat, mit sekretorischen Vesikeln oder dem extrazellulären Raum assoziiert sind, kamen Mitte der 1990er Jahre bei Studien an traumatischen Zellen auf. Konkret handelte es sich dabei um eine nukleäre Lokalisation von CLU (engl. *nuclear CLU*, nCLU). Im Laufe der folgenden Jahre wurde versucht, diese Beobachtungen zu verifizieren, jedoch besteht bis heute noch kein Konsens über die Größe, Struktur, Biogenese oder Funktion der nCLU-Isoform und auch nicht über die Umstände, unter denen diese auftritt (vgl. Anhang 8.2).

Die erste diesbezügliche Arbeit zeigte nach Behandlung der humanen Zelllinie HepG2 mit *Transforming growth factor*- β (TGF- β) die Lokalisation eines 43 kDa großen Proteins (CLU₃₄₋₄₄₉) in nukleären Extrakten (Reddy *et al.*, 1996a). Weitere Arbeiten zeigten, dass eine ähnliche CLU-Form die DNA-Reparatur durch Ku70/80, einem wichtigen Faktor beim sogenannten *non-homologous end joining*, inhibiert, was wiederum zum programmierten Zelltod führt (Yang *et al.*, 2000; Leskov *et al.*, 2001; Leskov *et al.*, 2003). In diesem Fall war keine Inkubation mit TGF- β , sondern die Behandlung der Zellen mit ionisierender Strahlung ausschlaggebend für das Auftreten von nCLU. Es wurde weiterhin vermutet, dass mehrere lysin- und argininhaltige NLSs, i.e. NLS₇₄₋₈₁, NLS₃₂₄₋₃₄₀, NLS₄₄₂₋₄₄₆ (jeweils relativ zu CLU₁₋₄₄₉), innerhalb des nCLU Polypeptids potentiell für die nukleäre Lokalisation verantwortlich sein könnten. Wie bereits angedeutet (vgl. 1.4.1.1 und 1.4.1.2), ging man davon aus, dass das nCLU-Vorläuferprotein vom Exon 3 Startcodon startend als cytosolisches 45 bis 49 kDa großes Protein translatiert wird (\cong CLU₃₄₋₄₄₉), welches wiederum durch post-translationale Mechanismen in unbekannter Weise modifiziert und schließlich als 55 kDa Protein in den Nukleus transloziert wird (Leskov *et al.*, 2001; Leskov *et al.*, 2003; Araki

et al., 2005; Leskov *et al.*, 2011). Dabei würden die NLSs durch sogenannte Importine auf der Kernmembran gebunden, welche die aktive Translokation, vermittelt durch die kleine GTPase Ran, des gesamten Proteinkomplexes ins Nukleoplasma ermöglichen. Ob im Falle von nCLU diese NLSs jedoch notwendig für die nukleäre Translokation sind, wird kontrovers diskutiert (Leskov *et al.*, 2003; O'Sullivan *et al.*, 2003; Scaltriti *et al.*, 2004b; Wei *et al.*, 2009). Unlängst wurde postuliert, dass eine Ubiquitinierung über Lys₆₃ die entscheidende Modifikation ist, die zur nukleären Akkumulation von CLU₃₄₋₄₄₉ beiträgt (Xue *et al.*, 2012).

Seit Veröffentlichung dieser Hypothesen wurde eine nukleäre Lokalisation von CLU auf verschiedenste Noxen hin berichtet: induzierter Zellstress durch Etoposid (Caccamo *et al.*, 2004; Scaltriti *et al.*, 2004a; Pajak und Orzechowski, 2007), IL-6, Somatostatin (Pucci *et al.*, 2009), Hitze (Caccamo *et al.*, 2006), Ca²⁺-Depletion (Caccamo *et al.*, 2005; Pajak und Orzechowski, 2007), Serumentzug (Caccamo *et al.*, 2003), Tumornekrosefaktor α (TNF- α , O'Sullivan *et al.*, 2003), Indocyaningrün (Ricci *et al.*, 2007), Proteasominhibierung (Rizzi *et al.*, 2009a), 5'-Fluorouracil, Fas-Rezeptor-bindenden Antikörper (Chen *et al.*, 2004) oder Vanadium-Behandlung sowie durch Überexpression von c-fos (Markopoulou *et al.*, 2009), IL-24 (Bhutia *et al.*, 2012) oder pVHL (Xue *et al.*, 2012), aber auch spontan (Chen *et al.*, 2004; Pucci *et al.*, 2004; Scaltriti *et al.*, 2004b; Moretti *et al.*, 2007; Pucci *et al.*, 2009; Moretti *et al.*, 2011, Chayka *et al.*, 2009). Das Ausmaß der zu beobachtenden nukleären Lokalisation ist dabei erheblich, teilweise wird das gesamte zellassozierte CLU im Nukleus bzw. in nukleären Zellfraktionen detektiert.

Über die Struktur der nukleären CLU-Form ist kaum etwas bekannt. Sekundärstrukturanalysen sind nicht verfügbar, lediglich *in silico* wurden potentielle *coiled-coil* Bereiche (Lee *et al.*, 2011), eine Ku70-Bindedomäne (Yang *et al.*, 2000) und eine BH3-Domäne (vgl. 1.7.2) postuliert. Weiterhin wurde, wie in Tab. 8.1 (vgl. Anhang 8.2) ersichtlich, in einer Reihe von Arbeiten versucht, nCLU funktionell zu charakterisieren. Dies erwies sich jedoch, allein wegen der mangelnden Strukturdaten, als schwierig. Es bestand somit kein Konsens bezüglich dessen Funktion; alle Bemühungen in diesem Punkt warfen umso mehr neue Fragen auf (Bettuzzi und Rizzi, 2009). Eine Gemeinsamkeit lässt sich dennoch aus der Fülle der gesammelten Daten ableiten: nCLU taucht nur im Zusammenhang mit zellulärem Stress auf (vgl. 1.7). In diesem Zusammenhang wurde zum einen postuliert, dass es selbst pro-apoptotisch wirkt, zum anderen wurde sein Auftreten als eine Konsequenz der Apoptose interpretiert. Daher scheinen vereinfachte aber weitverbreitete Hypothesen, welche versuchen sCLU als cytoprotektiv, nCLU hingegen als cytotoxisch darzustellen, fragwürdig (z.B. Trougakos und Gonos, 2006; Moretti *et al.*, 2007; Bettuzzi und Rizzi, 2009; Trougakos und Gonos, 2009; Trougakos, 2013).

1.4.2.2 Mitochondrial assoziiertes Clusterin

Neben dem nukleär assoziierten CLU wurden in den letzten Jahren vermehrt Beobachtungen gemacht, die eine Lokalisation des Proteins an Mitochondrien nahelegten (Debure *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005; Trougakos *et al.*, 2009b; Kim *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012). Dabei wurde häufig eine Interaktion von CLU mit den Apoptose-assoziierten Proteinen *Bcl 2-associated X protein* (Bax) oder *B-cell lymphoma 2-like 1* (Bcl-xL) identifiziert und ein Zusammenhang mit der zellulären Apoptose diskutiert. Es ist nicht genau klar, welche CLU-Form entsprechende Interaktionen eingeht. Manche Arbeiten gehen

von einer Bindung von CLU₃₄₋₄₄₉ an Bcl-xL (Kim *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011), andere von einer Bindung von sCLU bzw. psCLU an Bax aus (Zhang *et al.*, 2005; Trougakos *et al.*, 2009b), wobei wiederum nicht geklärt ist, wie diese ER/Golgi-ständigen Formen ins Cytosol bzw. zu den Mitochondrien gelangen. In einer neueren Veröffentlichung wird postuliert, dass mit Hilfe von GRP78 aus dem ER retrotransloziertes psCLU die mitochondriale Membran stabilisiert und so die durch das Cytostatikum Paclitaxel induzierte Apoptose vermindert. Eine Bindung von psCLU an Bax oder Bcl-xL wurde in diesem Zusammenhang jedoch nicht analysiert (Li *et al.*, 2012). Auf die mögliche Funktion von potentiell mitochondrial assoziiertem CLU während der Apoptose wird noch detaillierter eingegangen (vgl. 1.7.2)

1.5 Regulation, Funktionen und Bindungspartner von Clusterin

Bereits erste Untersuchungen legten den Schluss nahe, dass es sich bei sCLU um ein multifunktionelles Glykoprotein handelt, welches auf eine Vielzahl physiologischer (z.B. Komplementregulation, Lipid Transport) und pathophysiologischer Prozesse (z.B. Alzheimer Krankheit, Nierenversagen) einen Einfluss haben könnte (Rosenberg und Silkensen, 1995). In den letzten Jahren widmeten sich etliche Arbeitsgruppen dieser Thematik, sodass bis heute eine Fülle an Informationen und Daten bezüglich der Funktion von CLU gesammelt wurden, welche sich oft nur schwer zu einem Gesamtbild zusammenfügen lassen. Es konnte insbesondere als Bestandteil von HDL identifiziert werden, weshalb CLU auch Apolipoprotein J genannt wird, sowie eine Aktivität als molekulares Chaperon wahrnehmen. Weiterhin besteht ein Zusammenhang mit der zellulären Signaltransduktion und apoptotischen Prozessen. Bevor auf diese Punkte genauer eingegangen wird, soll ein kurzer Überblick über die Regulation, die relevanten Bindungspartner und die möglichen Einflüsse von CLU auf physiologische Prozesse bzw. bei bestimmten Krankheitsbildern gegeben werden.

1.5.1 Regulation der Expression von sezerniertem Clusterin

Wie bereits erwähnt besitzt der Promotor des CLU-Gens, der sich vor dem Transkriptionsstart von mRNA-Variante 1 befindet, eine Reihe an regulatorischen Elementen, wobei besonders eine TATA-Box, AP-1-Bindestellen, eine HSE-Sequenz und eine potentielle NF- κ B-Bindestelle zu nennen sind (vgl. 1.3.1). Alle diese Elemente vermitteln eine transkriptionelle Regulation von Variante 1 und damit, nachgewiesenermaßen, eine Regulation des sCLU-Spiegels. Die basale sCLU-Expression, welche konstitutiv in nahezu allen Geweben stattfindet, wird höchstwahrscheinlich über die TATA-Box gesteuert. Sie ist Zellzyklus abhängig (Bettuzzi *et al.*, 1999) und schwankt zwischen verschiedenen Zelltypen erheblich, weshalb von einer zelltyp- bzw. gewebsspezifischen Regulation ausgegangen werden muss (Rizzi *et al.*, 2009b). Das treibende Element der Zellstress-induzierten sCLU-Regulation ist die HSE-Sequenz, welche allgemein unter oxidativem Stress von HSFs gebunden wird und eine gesteigerte sCLU-Synthese vermittelt (Trougakos und Gonos, 2009; Wyatt *et al.*, 2009a, vgl. 1.6.1). Einen ähnlichen Stellenwert nimmt vermutlich auch das AP-1-Element ein (Gutacker *et al.*, 1999; Martindale und Holbrook, 2002). Weiterhin ist bekannt, dass sCLU in glatten Gefäßmuskelzellen durch nekrotisches Zellextrakt positiv reguliert wird. Der Schlüsselfaktor ist dabei doppelsträngige RNA, die an *Toll-like* Re-

zeptoren (TLRs), in diesem Fall TLR-3, bindet und über einen entsprechenden Signalweg die sCLU-Expression antreibt. Dabei spielt vermutlich das NF- κ B-Element im CLU-Promotor die ausschlaggebende Rolle (Baiersdörfer *et al.*, 2010).

Bei der Erforschung der sCLU-Expression wurde in etlichen Arbeiten der Einfluss von onkogenen Faktoren untersucht. Bereits Anfang der 1990er Jahre konnte in Tumorgewebe eine Dysregulation dieses Proteins festgestellt werden (Kyprianou *et al.*, 1990; Parczyk *et al.*, 1994). So scheint die sCLU-Expression durch die protoonkogenen Kinasen Ras (Klock *et al.*, 1998; Lund *et al.*, 2006) und Erk (Criswell *et al.*, 2005) sowie durch diverse Cytokine und Wachstumsfaktoren, u.a. NGF, EGF (Gutacker *et al.*, 1999), TGF- β (Laping *et al.*, 1994; Jin und Howe, 1999; Wegrowski *et al.*, 1999), TNF- α , IL-1 (Hardardottir *et al.*, 1994; Zwain *et al.*, 1994) und IL-6 (Pucci *et al.*, 2009) reguliert zu werden, wodurch eine Brücke zur Rolle von CLU bei Krebskrankheiten geschlagen wird (vgl. 1.5.4). Weitere Transkriptionsfaktoren, welchen ein Einfluss auf die Regulation von sCLU zugeschrieben wird, sind c-Myc, B-MYB, Egr-1, Stat-1, TCF-1 und GLI-2 (Sala *et al.*, 2009). Unter welchen Umständen genau diese Transkriptionsfaktoren eine Regulation der sCLU-Synthese vermitteln, ist kaum erforscht, zumal keine entsprechenden regulatorischen Sequenzen im CLU-Promotor bekannt sind.

1.5.2 Bekannte Bindungspartner von Clusterin

Ein Punkt, der die Erforschung der genauen Funktion von CLU erschwert, ist die große Zahl an Bindungspartnern, die für dieses Protein beschrieben sind. So kann sCLU an das Apolipoprotein A-I binden und so mit einer Unterklasse von HDL-Lipoproteinen assoziieren (Jenne *et al.*, 1991). Wie andere Apolipoproteine kann es Interaktionen mit Lipiden (Burkey *et al.*, 1992), Lipoproteinen und amyloiden Proteinen (Wyatt *et al.*, 2009a) eingehen. Weiterhin sind Bindungen an Heparin (Pankhurst *et al.*, 1998), Komponenten des Komplementsystems (Murphy *et al.*, 1988), Immunglobulinen (Wilson *et al.*, 1991), Immunrezeptoren (DC-SIGN, Sabatte *et al.*, 2012), Bestandteilen des Cytoskeletts (Kang *et al.*, 2005; Moretti *et al.*, 2007), Zellmembranen (Lemansky *et al.*, 1999) sowie mit synthetischen Chemotherapeutika wie Paclitaxel (Park *et al.*, 2008) bekannt. Darüber hinaus ist von Bindungen an Mediatoren der zellulären Signaltransduktion, wie TGF- β -Rezeptor (Reddy *et al.*, 1996b), NF- κ B (vgl. 1.8), Bcl-xL und Bax (vgl. 1.7) und an andere Proteine, z.B. GRP78 (vgl. 1.4.1.3) oder Ku70 (vgl. 1.4.2, 1.7.2), berichtet worden. Es ist jedoch bisher unklar ob in diesen Fällen sCLU die Interaktion eingeht oder nicht-sezernierte CLU-Formen eine Rolle spielen (vgl. 1.4.2). Insbesondere die Bindung an NF- κ B sowie an Bcl-xL oder Bax würde CLU selbst potentiell zu einem Mediator der zellulären Signaltransduktion sowie von apoptotischen Prozessen machen, was wiederum als Ansatzpunkt für Krebstherapien herangezogen wird (vgl. 1.5.4).

Neben seiner Funktion als Apolipoprotein ist eine weitere, eingehend analysierte und von sCLU ausgeübte Funktion dessen Bindung an verschiedenste fehlgefaltete Proteine. Dadurch kann es als molekulares Chaperon wirken und z.B. die Solubilisierung, Internalisierung und Beseitigung der denaturierten Proteine fördern (vgl. 1.6). In diesem Zusammenhang spielen Interaktionen von sCLU mit *Low Density Lipoprotein* (LDL)-Rezeptoren eine Rolle, wobei Megalin (auch bekannt als *LDL Receptor-related Protein 2*, LRP-2) der primäre sCLU-Rezeptor zu sein scheint (Kounnas *et al.*, 1995; Zlokovic *et al.*, 1996;

Bartl *et al.*, 2001). Weitere potentielle Rezeptoren sind *Very Low Density Lipoprotein Receptor* (VLDLR), LRP8 (Andersen *et al.*, 2003; Bajari *et al.*, 2003) und LRP1 (Bartl *et al.*, 2001). Auf die sCLU-Chaperonaktivität und die Rolle der Rezeptoren wird weiter unten genauer eingegangen (vgl. 1.6.3)

1.5.3 Einflüsse von Clusterin auf (patho-)physiologische Prozesse

Aufgrund der Menge an potentiellen CLU-Bindungspartnern ist es nicht verwunderlich, dass in einer Vielzahl von Forschungsberichten ein Zusammenhang mit diversen physiologischen Prozessen und damit einhergehenden Krankheitsbildern festgestellt wurde. Bereits Ende der 1980er Jahre wurde CLU mit Glomerulonephritis, einer Krankheit, die sich durch Entzündung der Nierenglomeruli äußert, assoziiert. Dabei konnte eine Zusammenlagerung mit Proteinen aus dem Komplementsystem festgestellt werden (Murphy *et al.*, 1988). Des Weiteren konnte bei CLU-defizienten Mäusen eine gesteigerte Tendenz zur Ausbildung von Nierenschädigungen (Glomerulopathien) beobachtet werden (Rosenberg *et al.*, 2002). Vermutlich tragen die fehlende Chaperonfunktion von sCLU und die damit einhergehende, mangelnde Entsorgung fehlgefalteter Proteine bei diesen Tieren zur Ausprägung der Krankheit bei.

Eine Reihe von Forschungsberichten assoziiert CLU mit Amyloidosen. So wurde es im Komplex mit dem Beta-Amyloid (A β) bei Alzheimer-Patienten gefunden (Choi-Miura *et al.*, 1992a; Ghiso *et al.*, 1993) und scheint die Zusammenlagerung von A β -Fibrillen (vgl. 1.6.2) sowie deren Transport über die Blut-Hirnschranke zu beeinflussen (Bell *et al.*, 2007). Auch eine Zusammenlagerung von CLU mit PrP, der Hauptkomponente der Proteinablagerungen bei transmissiblen spongiformen Enzephalopathien wie Creutzfeld-Jakob, BSE oder Scrapie, ist bekannt (Freixes *et al.*, 2004; Kempster *et al.*, 2004). Die Rolle von CLU bei Amyloidosen wird später nochmals aufgegriffen (vgl. 1.6.2). Weitere CLU-assoziierte Krankheiten sind u.a. Myokarditis, zerebrale Ischämie oder Arteriosklerose. Im Falle von Myokarditis wurde im Tiermodell festgestellt, dass wildtypische Mäuse im Vergleich zu CLU-*knock-out*-Tieren deutlicher weniger Schäden in den betroffenen Geweben zeigen, sodass CLU hier eine cytoprotektive Stellung einzunehmen scheint (McLaughlin *et al.*, 2000). Bei Ischämie sind die Befunde weniger eindeutig, da sowohl cytotoxische als auch cytoprotektive Effekte beschrieben wurden. Auf der einen Seite zeigten CLU-*knock-out*-Mäuse im Vergleich zu wildtypischen Mäusen 50% weniger Gehirnschädigung nach induzierter zerebraler Ischämie durch Ligatur der linken Kopfschlagader (Han *et al.*, 2001). Dies widerspricht jedoch auf der anderen Seite gänzlich Beobachtungen an transgenen Mäusen, die große Mengen an CLU exprimierten. Bei diesen Tieren korreliert die Menge an exprimiertem CLU negativ mit der Anzahl der durch Ischämie geschädigten Zellen (Wehrli *et al.*, 2001). Eine solche Diskrepanz lässt sich nur schwer erklären. Ein Ansatzpunkt wäre, dass möglicherweise verschiedene CLU-Isoformen für die zu beobachtenden Effekte verantwortlich sind. Ein ähnliches Szenario lässt sich im Falle von Arteriosklerose ausmachen. Bereits Anfang der 1990er Jahre wurde CLU in arteriosklerotischen Läsionen gefunden (Diemer *et al.*, 1992), jedoch besteht noch kein Konsens, ob es einen protektiven (Schwarz *et al.*, 2008; Baidersdörfer *et al.*, 2010) oder cytotoxischen Einfluss (Kim *et al.*, 2009; Hamada *et al.*, 2011) auf die umgebenden glatten Gefäßmuskelzellen hat, i.e. ob es die Verengung der Arterien fördert oder hemmt.

1.5.4 Clusterin bei Krebskrankheiten: Onkogen oder Tumorsuppressor?

Ein Großteil der Literatur im Feld der CLU-Forschung befasst sich mit dessen Rolle bei malignen Neoplasien (Krebs). Die meisten Forschungsberichte beziehen sich dabei auf die Funktion von CLU bei Prostatakrebs, dem am zweithäufigsten diagnostizierten Krebsleiden bei Männern (Jemal *et al.*, 2011). Weiterhin wird ein Zusammenhang mit Brustkrebs, Lungenkrebs und Darmkrebs diskutiert, wobei im folgenden Abschnitt nur die wichtigsten, allgemeinen Erkenntnisse zur Rolle von CLU bei Krebs genannt werden. Es sei außerdem gesagt, dass auch hier die Datenlage schwer überschaubar, teilweise kontrovers ist, wodurch die genaue Funktion von CLU bei dieser Art von Krankheit noch nicht abschließend geklärt werden konnte. Dies ist u.a. der Tatsache geschuldet, dass noch kein Konsens besteht, ob und in welcher Weise die Expression unterschiedlicher CLU-Isoformen mit dem malignen Charakter von Krebszellen korreliert. Dennoch herrscht seit längerem Klarheit darüber, dass CLU in einer Vielzahl verschiedener Tumore exprimiert (u.a. Kyprianou und Isaacs, 1989; Parczyk *et al.*, 1994; Rennie *et al.*, 1994) und dort, im Vergleich zu den nicht-transformierten Gewebszellen, dysreguliert ist (Sala *et al.*, 2009).

Ein Hauptmerkmal entarteter Zellen ist deren Eigenschaft, den programmierten Zelltod zu umgehen (Hanahan und Weinberg, 2011). Daher werden häufig die potentiellen Fähigkeiten von CLU, den Zellzyklus, die Apoptose sowie die zelluläre Signaltransduktion zu beeinflussen, als die Bindeglieder zur Krebskrankheit angesehen. Dabei wird nicht-sezerniertem CLU, i.e. nCLU (vgl. 1.4.2.1), zumeist ein proapoptotischer Effekt (Tumorsuppressor) zugeschrieben, wobei noch nicht geklärt ist, ob und wie genau dieser zustande kommen könnte (vgl. 1.7 und 1.8). Der Einfluss von sCLU auf die maligne Transformation ist ebenfalls nicht geklärt. Es wurde postuliert, dass eine Überexpression von sCLU den Zellzyklus verlangsamt und die DNA-Synthese verringert (Bettuzzi *et al.*, 2002; Scaltriti *et al.*, 2004a; Trougakos *et al.*, 2005). Allerdings scheinen sich manche Zellen an hohe sCLU-Mengen anzupassen und den Zellzyklus unkontrolliert fortzusetzen, was zur Entartung führen kann (Bettuzzi *et al.*, 2002; Trougakos *et al.*, 2005). Zudem wurde beobachtet, dass sCLU den Zelltod unter bestimmten Umständen, z.B. während der Behandlung mit Chemotherapeutika (Kalka *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004) oder bei einer induzierten Ischämie des Gehirns (Han *et al.*, 2001), fördern kann und cytotoxisch wirkt, wenn es intrazellulär akkumuliert (Debure *et al.*, 2003; Trougakos *et al.*, 2005; Rizzi und Bettuzzi, 2010). Auf Basis dieser und anderer Daten wurde sCLU als Tumorsuppressor eingestuft (Caporali *et al.*, 2004; Thomas-Tikhonenko *et al.*, 2004; Bettuzzi *et al.*, 2009; Chayka *et al.*, 2009)

Dem gegenüber stehen jedoch Daten, die durch transiente Überexpression von sCLU einen protektiven (Gleave und Miyake, 2005; Zhang *et al.*, 2005) bzw. durch Herabregulation oder Depletion (Cervellera *et al.*, 2000; Miyake *et al.*, 2000; Trougakos *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009) von sCLU einen toxischen Einfluss auf die Zellen nahelegen, sodass das Protein als Onkogen eingestuft wurde. Dies wird u.a. darauf zurückgeführt, dass sCLU die Krebszellen im Rahmen einer Chemotherapie schützen könnte, indem es an die Chemotherapeutika bindet und auf diese Weise deren Entsorgung initiiert (Park *et al.*, 2008). In fortgeschrittenen Krebsstadien könne sCLU weiterhin die Proliferation transformierter Zellen

fördern, indem es die Inhibition der Bax-abhängigen Apoptose vermittelt (vgl. 1.7.2) oder die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, welcher erwiesenermaßen als Protoonkogen eingestuft ist (Sarkar *et al.*, 2008; Trougakos und Gonos, 2009), begünstigen (vgl. 1.8.2).

Aufgrund der geschilderten Diskrepanzen wird mittlerweile davon ausgegangen, dass CLU weder ein klassisches Onkogen noch ein klassischer Tumorsuppressor sein könnte (Thomas-Tikhonenko *et al.*, 2004; Trougakos und Gonos, 2009; Rizzi und Bettuzzi, 2010). In frühen Stadien der Transformation könnte sCLU eine Tumorsuppressor-Rolle, genauer eine Tumor-Attenuator-Rolle einnehmen. Dies ist vor allem auf Grund seiner Eigenschaft, die Akkumulation fehlgefalteter Proteine zu verhindern (vgl. 1.6) und das Wachstum myc-transformierter Epithelzellen zu hemmen nachvollziehbar (Thomas-Tikhonenko *et al.*, 2004). In späteren Stadien könnten wiederum die angesprochenen cytoprotektiven bzw. proliferativen Eigenschaften von CLU ein Fortschreiten der Krebserkrankung begünstigen. Aus diesem Grund gilt es bereits seit längerem als attraktives Angriffsziel zur Krebstherapie. So wurde bereits in Phase 1- und Phase 2-klinischen Studien das spezielle CLU-*antisense* Oligodeoxynukleotid OGX-011 (Custirsen) in Kombination mit dem Cytostatikum Docetaxel als Therapeutikum gegen Prostatakrebs getestet (Chi *et al.*, 2005; Chi *et al.*, 2010; Saad *et al.*, 2011). Auch wenn erste Ergebnisse dieser Studien vielversprechend sind, so ist über den genauen Effekt, der durch die verminderte CLU-Expression in den Prostatakrebs-Patienten erzielt wird, kaum etwas bekannt. Die im Laufe dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse in Bezug auf nicht-sezernierte CLU-Isoformen könnten dazu beitragen, die Rolle verschiedener CLU-Isoformen bei dieser und anderen Krankheiten zu verstehen.

1.6 Funktion von Clusterin als molekulares Chaperon

Die am eingängigsten erforschte Funktion von CLU ist die als molekulares Chaperon. Diese wurde schon früh im Zusammenhang mit der Komplement-aktivierten Zellyse postuliert (Tschopp *et al.*, 1993) und konnte später bestätigt werden (Humphreys *et al.*, 1999). Dabei bindet CLU fehlgefaltete Proteine, solubilisiert diese und vermittelt schließlich die Internalisierung und die Degradation der entstandenen Komplexe. Der folgende Abschnitt fasst die grundlegenden Erkenntnisse auf diesem Gebiet zusammen, wobei die geschilderten Chaperonaktivitäten nur für sCLU bekannt sind. Ob nicht-sezernierte CLU-Formen eine ähnliche Funktion wahrnehmen können wird gegenwärtig diskutiert.

1.6.1 Chaperone sind Hitzeschockproteine

Chaperone gehören zur Gruppe der Hitzeschockproteine (Hsps), die vermehrt im Rahmen der sogenannten zellulären Hitzeschockantwort (engl. *heat shock response*) exprimiert werden. Die Hitzeschockantwort ist ein molekularer Abwehrmechanismus von Zellen, welche Stresssituationen ausgesetzt sind, beispielsweise induziert durch UV-Licht, ionisierende Strahlung, Hitze, Oxidantien, Schwermetalle oder durch bestimmte Medikamente, wie z.B. den Proteasom-Inhibitor MG-132 (Bush *et al.*, 1997; Pirkkala *et al.*, 2000; Trougakos und Gonos, 2009). Letztendlich führt dies zu Schäden an der DNA oder zur Ansammlung von fehlgefalteten Proteinen (proteotoxischer Stress), was zumeist auf eine erhöhte Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (z.B. Hydroperoxid-Anionen, H₂O₂) in den betroffenen Zellen zu-

rückzuführen ist. Die Zelle wiederum reagiert darauf mit der Expression von Hsps, zu denen proteolytische Enzyme, Stoffwechsel- oder DNA/RNA-modifizierende Enzyme, Entgiftungsproteine und molekulare Chaperone gehören (Richter *et al.*, 2010). Reguliert wird die Hitzeschockantwort u.a. durch den Transkriptionsfaktor HSF, zu dessen Zielgenen auch das CLU-Gen gehört. Die CLE-Sequenz innerhalb des Promotors ist hier für die Bindung des HSFs und somit für die Induktion von CLU auf zellulären Stress hin verantwortlich (vgl. 1.3.1 und 1.5.1).

Chaperone waren die ersten bekannten Hsps und tragen daher häufig auch entsprechende Bezeichnungen, z.B. Hsp70 (70 kDa großes Hitzeschockprotein). Sie lassen sich in mehrere Klassen unterteilen: Chaperonine, Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 und sHsps (engl. *small heat shock proteins*, z.B. Hsp27). Alle kommen intrazellulär vor und binden an fehlgefaltete Proteine, zumeist über hydrophobe Wechselwirkungen, selten über spezifische Peptidsequenzen. Sie können zum einen die Faltung von reifen Proteinen regulieren, zum anderen auch die Aggregation entfalteter oder denaturierter Proteine verhindern und teilweise deren Rückfaltung einleiten. Sie nehmen somit eine cytoprotektive Stellung ein. Alle Chaperone bis auf die sHsps arbeiten ATP-abhängig, tragen also aktiv zum Faltungsprozess von anderen Proteinen bei (daher im Englischen häufig als *foldases* bezeichnet). Die sHsps wiederum binden insbesondere über ihre ausgeprägten hydrophoben Bereiche an fehlgefaltete oder entfaltete Proteine und verhindern deren Aggregation, eine Eigenschaft, die sie mit sCLU teilen (Carver *et al.*, 2003, vgl. 1.6.2). Des Weiteren können sie auch als Co-Chaperone für die ATP-abhängigen Chaperone Hsp70 oder Hsp100 dienen, indem sie fehlgefaltete Proteine rekrutieren und in einer für Hsp70 bzw. Hsp100 zugänglichen Konformation halten (daher im Englischen oft *holdases* genannt, Richter *et al.*, 2010).

1.6.2 Sezerniertes Clusterin bindet an denaturierende Proteine und verhindert deren Aggregation

Eine Chaperonfunktion analog der von sHsps konnte für sCLU erstmals 1999 bestätigt werden (Humphreys *et al.*, 1999). Es war somit das erste bekannte extrazelluläre Chaperon, zu denen mittlerweile auch Haptoglobin (Yerbury *et al.*, 2005a) und α_2 -Makroglobulin (French *et al.*, 2008) zählen. Ermöglicht wird die Chaperonaktivität von sCLU durch dessen Struktur, die amphipatische α -Helices aufweist (vgl. 1.2.2). Man geht davon aus, dass die Bindung von sCLU mit entsprechenden Zielproteinen über die hydrophoben Bereiche der α -Helices vermittelt wird, welche innerhalb von *molten globule* Domänen lokalisiert sind und ihre hydrophobe Abschnitte nach außen exponieren (Law und Griswold, 1994; Bailey *et al.*, 2001; Poon *et al.*, 2002a; Wyatt *et al.*, 2009a). Die Bindung von sCLU erfolgt dabei insbesondere an jene Zielproteine, die sich kontemporär, z.B. infolge oxidativen Stresses oder Hitzeeinwirkung, entfalten, also ihrerseits hydrophobe Bereiche exponieren. Dabei bindet sCLU ATP-unabhängig, kann jedoch nicht eine vorhandene enzymatische Aktivität der denaturierenden Zielproteine erhalten (Humphreys *et al.*, 1999; Poon *et al.*, 2000). Interessanterweise scheint sCLU auch nicht im Stande zu sein Proteine zu binden, die schon entfaltet sind; man geht daher von einer Bindung an Zielproteine aus, die sich auf dem „*off-folding pathway*“ befinden (Poon *et al.*, 2002b). Die Chaperonaktivität von sCLU ist in besonderem Maße bei leicht sauren pH-Werten verbessert, jedoch scheint auch eine leicht erhöhte Temperatur einen positiven Einfluss zu haben (Poon *et al.*, 2002a). Weniger

ausschlaggebend ist in diesem Fall der Glykosylierungszustand von sCLU (Lakins *et al.*, 2002; Stewart *et al.*, 2007). Durch die Bindung von sCLU an die Zielproteine bilden sich lösliche, hochmolekulare Komplexe, die ein Chaperon/Zielprotein-Verhältnis zwischen 1:5,5 und 1:0,65 aufweisen (Matsubara *et al.*, 1995; Yerbury *et al.*, 2007; Wyatt *et al.*, 2009b). So wird eine unkontrollierte Aggregation der entfaltenden Proteine verhindert. Zu den bekannten Zielproteinen gehören verschiedene Albumine, Citrat-Synthase, γ -Crystallin, Fibrinogen, Glutathion-S-Transferase (GST), Immunglobulin γ (IgG), Katalase, Insulin und Lysozym (Humphreys *et al.*, 1999; Poon *et al.*, 2000; Lakins *et al.*, 2002; Poon *et al.*, 2002a; Poon *et al.*, 2002b; Wyatt *et al.*, 2009b). Ferner zeigt sCLU-depletiertes Humanserum eine deutlich höhere Tendenz zur Aggregation während Hitzebehandlung, was die Bedeutung von sCLU als extrazelluläres Chaperon bestätigt (Poon *et al.*, 2000).

Eine besondere Stellung kommt sCLU im Rahmen von Amyloidosen zu. Diese Ablagerungen von extrazellulären, fibrillären Proteinaggregaten sind eng mit degenerativen Krankheiten und damit einhergehendem Zelltod assoziiert, so z.B. bei der Alzheimer oder der Creutzfeldt-Jakob Krankheit. Es ist bekannt, dass sCLU mit einer Reihe verschiedenster amyloider Ablagerungen co-lokalisiert (Wyatt *et al.*, 2009a). So konnte u.a. nachgewiesen werden, dass sCLU im Stande ist, das mit der Alzheimer-Krankheit assoziierte A β zu binden und die Bildung amyloider A β -Fibrillen zu beeinflussen (Matsubara *et al.*, 1995; Oda *et al.*, 1995; Boggs *et al.*, 1996; DeMattos *et al.*, 2002; Yerbury *et al.*, 2007; Narayan *et al.*, 2011). Dabei scheint zum einen wichtig zu sein, zu welchem Zeitpunkt der fibrillären Aggregation sCLU wirkt, zum anderen in welchem relativen Verhältnis (sCLU/A β) das Chaperon während der fibrillären Aggregation vorliegt. Daher konnten sowohl aggregationsfördernde, die cytotoxische Wirkung von A β -Fibrillen verstärkende Effekte als auch aggregationsmindernde, cytoprotektive Effekte von sCLU auf Neurone beobachtet werden (Oda *et al.*, 1995; Boggs *et al.*, 1996; Yerbury *et al.*, 2007). Weiterhin scheint sCLU auch die Aggregation amyloider Fibrillen anderer Proteine zu beeinflussen (McHattie *et al.*, 1999; Hatters *et al.*, 2002; Kumita *et al.*, 2007; Yerbury *et al.*, 2007).

1.6.3 Sezerniertes Clusterin fördert die Aufnahme von fehlgefalteten Proteinen in Gewebszellen

Die aus *in vitro* Studien gewonnenen Erkenntnisse zur Chaperonaktivität von sCLU (vgl. 1.6.2) lassen sich auch *in vivo* nachvollziehen. Es wurde festgestellt, dass sCLU nicht nur im Stande ist, eine Reihe von denaturierten Zielproteinen zu binden, sondern auch deren Aufnahme in Gewebszellen zu vermitteln, um dort den lysosomalen Abbau zu gewährleisten. Dabei kann es sich um umliegende Gewebszellen handeln, die unmittelbar über die Blutbahn mit den sCLU/Zielprotein-Komplexen in Kontakt sind (z.B. Gefäßmuskelzellen), also die Funktion von endozytierenden Phagozyten übernehmen (Bartl *et al.*, 2001). Des Weiteren belegen der verminderte Abbau von totem, testikulärem Zellmaterial (Bailey *et al.*, 2002) und die erhöhte Akkumulation von unlöslichen, glomerulären Proteinablagerungen bei CLU-*knock-out*-Mäusen (Rosenberg *et al.*, 2002) sowie die bereits genannte *in vivo* Komplexbildung von sCLU mit amyloiden Proteinen (vgl. 1.6.2) die Funktion von sCLU bei der Protein Homöostase. Es ist bekannt, dass CLU an Rezeptoren aus der LRP-Familie, insbesondere Megalin (Kounnas *et al.*, 1995; Zlokovic *et al.*, 1996; Bartl *et al.*, 2001), aber auch den ApoE-Rezeptor 2 (LRP-8), den VLDL-Rezeptor (Bajari *et*

al., 2003) oder LRP-1 (Bartl *et al.*, 2001) bindet und so die rezeptorvermittelte Endocytose der Zielprotein-Komplexe fördert, welche schließlich über lysosomalen Abbau beseitigt werden. Dabei ist höchstwahrscheinlich, das sCLU nicht über seine *molten globule*-Domänen (vgl. 1.2.2), sondern über hochgeordnete Strukturbereiche eine Bindung an Rezeptoren eingeht (Lakins *et al.*, 2002). Bei *Mus musculus* ist die Aufnahme von intravenös injizierten sCLU/Zielprotein-Komplexen in spezialisierte Organe wie Leber oder Niere beobachtet worden, wo vermutlich auch ein entsprechender Abbau und eine Ausscheidung stattfinden (Yerbury *et al.*, 2005b). Die Aufnahme der injizierten Zielproteine in die Organe ist dabei in Gegenwart von sCLU signifikant erhöht, lässt sich aber über das Polysaccharid Fucoidan inhibieren. Dies deutet auf eine Beteiligung sogenannter *Scavenger*-Rezeptoren hin, welche die Endocytose des Proteinmaterials in die Gewebszellen vermitteln (Lakins *et al.*, 2002; Wyatt *et al.*, 2011). *Scavenger* Rezeptoren binden zwar präferentiell modifiziertes LDL, können aber auch Bindungen zu anderen Makromolekülen eingehen.

1.6.4 Wirken nicht-sezernierte Clusterin Formen als Chaperone?

Aufgrund der Tatsache, dass der Glykosylierungszustand von sCLU nicht ausschlaggebend für dessen Chaperonaktivität zu sein scheint (Lakins *et al.*, 2002; Stewart *et al.*, 2007), wurde jüngst postuliert, dass auch nicht-sezernierte CLU-Formen eine analoge Funktion wahrnehmen könnten (Trogakos, 2013). Experimentelle Daten dazu sind nicht vorhanden und angesichts der unklaren Biogenese und der daraus resultierenden mangelnden Sekundärstrukturinformationen sind solche Annahmen bei dem aktuellen Forschungsstand noch sehr vage. Die im Laufe der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente könnten dazu beitragen, diese Problematik aufzuklären.

1.7 Rolle von Clusterin während der Apoptose

1.7.1 Mechanismen der zellulären Apoptose

Als Apoptose bezeichnet man den programmierten, als Nekrose den zufälligen, traumatischen Zelltod. Im Unterschied zur Nekrose wird die Apoptose aktiv reguliert, sodass die betroffenen Zellen kontrolliert über Chromatinkondensation, Kern- und Zellfragmentierung abgebaut und von Makrophagen oder dem umgebenden Gewebe entsorgt werden können. Dadurch bleibt eine Entzündungsreaktion aus. Ein wesentlicher Mediator der Apoptose sind die Cysteinyl-Aspartatyl-spezifischen Proteasen (Caspasen). Diese teilt man in Initiatorcaspasen, z.B. Caspase 8 oder Caspase 9, und von diesen regulierte Effektorcaspasen, z.B. Caspase 3 oder Caspase 7, ein. Die Caspasen und damit die Apoptose werden von einer Reihe verschiedener Stimuli aktiviert, wobei ein extrinsischer und ein intrinsischer Weg bekannt sind.

Die intrinsische Aktivierung wird durch einen Ausstrom von Cytochrom C (Cyt C) aus den Mitochondrien ins Cytosol eingeleitet. Der Cyt C-Ausstrom wird durch zellulären Stress, ausgehend von UV- oder ionisierender Strahlung, Hitze, Oxidantien, Cytostatika oder Schwermetalle induziert. Der bekannteste, zur intrinsischen Apoptose führende Signalweg wird über p53 vermittelt. Dieser Stress-sensitive Transkriptionsfaktor induziert die Transkription des cytosolischen Proteins Bax (vgl. 1.4.2.2), das die Bildung

eines Kanals in der äußeren Mitochondrienmembran bewirkt (engl. *mitochondrial apoptosis-induced channel*, MAC), durch den Cyt C ausströmen kann. Cyt C bindet im Cytosol an einen multimolekularen Proteinkomplex, das Apoptosom mit dem Adapterprotein Apaf1 (engl. *apoptotic protease activating factor 1*). Apaf1 bewirkt nun die Aktivierung von Caspase 9 ausgehend von ihrem Zymogen. Die so aktivierte Initiatorcaspase spaltet ihrerseits die Zymogene der Caspasen 3 oder 7 (Caspase 3/7), wodurch diese ebenfalls in den aktiven Zustand versetzt werden (Boatright und Salvesen, 2003). Substrate von Caspase 3/7 sind z.B. Poly-ADP-Ribose-Polymerase, Caspase-aktivierte DNase, Aktin und Laminin. Poly-ADP-Ribose-Polymerase wird durch Caspase 3/7 inaktiviert, wodurch die DNA-Reparatur ausbleibt. Caspase-aktivierte DNase wiederum wird aktiviert und zerstört DNA. Aktin oder Laminin werden verdaut, was einen Abbau des Cytoskeletts und der Kernlamina bedeutet (Pop und Salvesen, 2009). Die geschilderte, Bax-abhängige Apoptose wird durch andere Proteine aus der Bcl-2 Familie, z.B. Bcl-xL, reguliert (vgl. Abb. 1.3). Bcl-xL sequestriert Bax im Cytosol, sodass dieses nicht die Ausbildung des MACs induzieren kann. Somit kann das Gleichgewicht Bax/Bcl-xL von großer Bedeutung für das Auslösen einer apoptotischen Signalkaskade sein (Dejean *et al.*, 2006). Neben der Bax-abhängigen Cyt C-Freisetzung sind auch Bax-unabhängige, intrinsische Mechanismen bekannt, die insbesondere durch den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel reguliert werden und ebenfalls einen Ausstrom von Cyt C aus den Mitochondrien zur Folge haben. Auf diese wird hier nicht näher eingegangen.

Bei der extrinsisch induzierten Apoptose wird über externe Signale ein apoptotischer Stimulus vermittelt. Prominentestes Beispiel ist der sogenannte Fas-Ligand, ein Transmembranprotein aus der TNF- α -Familie, welches durch Bindung an den Fas-Rezeptor eine Aktivierung der Caspasen 8 oder 10 in der Zielzelle bewirkt. Die Initiatorcaspasen aktivieren, analog zu Caspase 9, die Caspase 3/7, wodurch die extrinsische Apoptose letztendlich in denselben Signalweg wie die intrinsische mündet. Sie kann, neben Fas-Ligand, auch von anderen Mitgliedern der TNF- α -Familie ausgelöst werden (Dejean *et al.*, 2006).

1.7.2 Potentielle Modulation der intrinsisch induzierten Apoptose durch Clusterin

Eine Rolle von CLU während des programmierten Zelltods wurde bereits Ende der 1980er Jahre postuliert, als man eine erhöhte Expression von CLU in apoptotischem Gewebe feststellte (Buttayan *et al.*, 1989; Bettuzzi *et al.*, 1991; Wong *et al.*, 1993). Entsprechende Hypothesen zerschlugen sich jedoch relativ schnell, da in folgenden Arbeiten keine Korrelation zwischen CLU-Expression und Apoptose gezeigt werden konnte (Fritz und Murphy, 1993; Pilarsky *et al.*, 1993; Ahuja *et al.*, 1994; Marinelli *et al.*, 1994). Vielmehr fand man heraus, dass die CLU-Induktion auf vitale Zellen um den Apoptoseherd herum beschränkt ist, wodurch man CLU eine cytoprotektive Wirkung zuschrieb, z.B. indem es das Ablösen dieser Zellen verhindert (French *et al.*, 1994; Rosenberg und Silkensen, 1995; Koch-Brandt und Morgans, 1996). Mit der Entdeckung von nicht-sezernierten CLU-Formen wurde die Funktion von CLU in Bezug auf die Apoptose Ende der 1990er Jahre abermals relativiert. Die Gruppe um David A. Boothman analysierte nach Behandlung von Zellkulturen mit ionisierender Strahlung eine Bindung von CLU₃₄₋₄₄₉ mit Ku70/Ku80 (vgl. 1.4.2.1), einem DNA-Reparaturenzym, welches beim sogenannten *non homologous end joining* aktiv ist. Es bindet die zusammenzuführenden DNA-Enden, entwindet diese mittels seiner Helikaseaktivität und rekrutiert schließlich weitere, zur DNA-Reparatur erforderliche Enzyme.

Auch wenn bei diesen Arbeiten noch entscheidende Negativkontrollen fehlten, postulierten die Autoren, dass CLU₃₄₋₄₄₉ den Ku70/Ku80-Komplex sequestriert und somit die DNA-Reparatur massiv inhibiert, was wiederum Apoptose auslösen könnte (Yang *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000; Leskov *et al.*, 2001; Leskov *et al.*, 2011). Somit wurde die Hypothese aufgestellt, dass CLU₃₄₋₄₄₉ ein pro-apoptotisches Protein sei. Dies manifestierte sich durch Beobachtungen anderer Forschergruppen. So schien CLU₃₄₋₄₄₉ mit der durch Zellablösung induzierten Apoptose (Anoikis) zusammenzuhängen (Caccamo *et al.*, 2003; 2004; 2005) und eine Progression des Zellzyklus zu verhindern (Scaltriti *et al.*, 2004b).

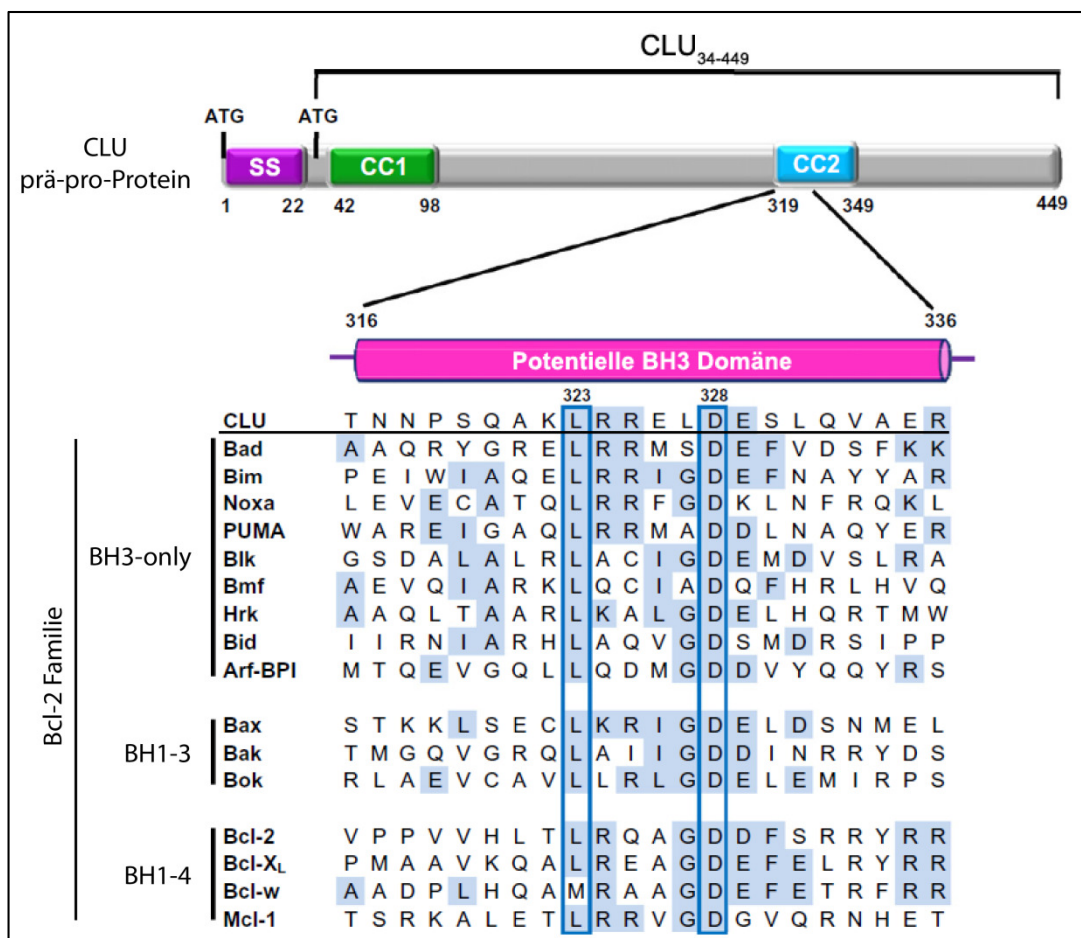


Abb. 1.3: CLU besitzt eine potentielle BH3-Domäne. BH3-Domänen kommen bei allen Proteinen der Apoptose assoziierten Bcl-2-Familie vor. Die Mitglieder der BH1-3-Subfamilie gelten als pro-apoptotisch und besitzen neben der BH3- auch eine BH1- und eine BH2-Domäne, was sie zur Multimerisierung befähigt und die Bildung eines MACs induziert. Zusätzliche BH4-Domänen kommen nur bei der antiapoptotischen BH1-4-Subfamilie vor und sind für deren Bindung an Proteine aus der BH1-3 Subfamilie essentiell. Die BH3-only Vertreter der Bcl-2-Familie besitzen lediglich die BH3-Domäne, interagieren wiederum mit den Komplexen aus BH1-3-/BH1-4-Proteinen und setzen auf diese Weise die pro-apoptotischen BH1-3-Proteine frei. Ihnen kommt daher ebenfalls eine pro-apoptotische Wirkung zu. CLU₃₄₋₄₄₉ wird eine ebensolche Funktion zugeschrieben, was auf die Gegenwart einer potentiellen BH3-Domäne (AS 316 bis 336) in einem *coiled-coil*-Bereich am C-Terminus (CC2) zurückgeführt wird. SS=Signalsequenz, CC=*coiled-coil*- α -Helix. Verändert nach Lee *et al.*, 2011.

Der Einfluss von CLU auf die intrinsische Apoptose wurde in späteren Arbeiten noch kontroverser diskutiert, als man erkannte, dass Ku70/Ku80 durch Bindung das pro-apoptotische Bax in einem inaktiven Zustand hält (Sawada *et al.*, 2003), diese Bindung jedoch durch CLU₃₄₋₄₄₉ verhindert wird. Zurückgeführt wurde das auf eine *in silico* postulierte Bcl-2 Homologie 3 (BH3)-Domäne im C-terminalen Bereich von CLU₃₄₋₄₄₉ (Lee *et al.*, 2011). Alle Mitglieder der Bcl-2-Familie besitzen BH3-Domänen, wobei sie insbesondere Mitglieder aus der BH3-only Subfamilie befähigt z.B. Bax aus seinem Komplex mit Bcl-xL durch

Bindung an letzteres zu lösen (vgl. Abb. 1.3). Eine entsprechende Funktion wurde demnach auch CLU₃₄₋₄₄₉ zugeschrieben, i.e. CLU₃₄₋₄₄₉ begünstigt eine Freisetzung von Bax durch Bindung an Bcl-xL (Kim *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011; Suk, 2012) oder Ku70/Ku80 (Yang *et al.*, 2000; Leskov *et al.*, 2003; Pucci *et al.*, 2009; Leskov *et al.*, 2011) und leitet somit die Apoptose ein. Die Datenlage dazu ist jedoch wegen der vielen *in silico* Analysen und der Unklarheit, wie die genaue Biogenese von CLU₃₄₋₄₄₉ vonstatten geht, sehr artifizial. Zudem wird, neben CLU₃₄₋₄₄₉, auch psCLU und sCLU ein direkter Einfluss auf den Bax-abhängigen Apoptoseweg zugeschrieben, wobei tendenziell eine anti-apoptotische Wirkung beobachtet wurde. Man geht entweder davon aus, dass psCLU den cytosolischen Ku70-Bax-Komplex stabilisiert (Pucci *et al.*, 2009; Trougakos *et al.*, 2009b) oder sCLU direkt mit Bax interagiert und dieses sequestriert (Zhang *et al.*, 2005). Ein offener Punkt, der in keiner dieser Arbeiten geklärt wird, ist, wie sCLU bzw. psCLU vom extrazellulären Raum bzw. dem ER/Golgi-Kompartiment ins Cytosol gelangen, um dort eine Bax-Bindung einzugehen (vgl. 1.4.2.2).

Zusammenfassend muss gesagt werden, dass trotz der Fülle an Berichten zur Rolle von CLU in der Apoptose diesbezüglich kein Konsens besteht. Die Thematik wird in der vorliegenden Arbeit aufgegriffen, wobei auf Vorarbeiten des AK Koch-Brandt zurückgegriffen wurde, die als Grundlage für die entsprechenden Experimente dienen (vgl. Diplomarbeit Matthias Hassemer).

1.8 Rolle von Clusterin im Rahmen der NF- κ B-vermittelten Signaltransduktion

1.8.1 Regulation des NF- κ B-Signaltransduktionswegs

Unter NF- κ B (engl. *nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells*) versteht man eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die in nahezu allen Zellen des menschlichen Organismus vorkommen und bereits bei den Nesseltieren zu finden sind. Sie spielen bei der Immunantwort, bei der Onkogenese und bei der Entwicklung eine Rolle und lassen sich in die Rel-Subfamilie und die ebenfalls unter dem Namen NF- κ B geführte Subfamilie einteilen. In die Rel-Subfamilie fallen die Proteine c-Rel, RelB und RelA (p65), in die NF- κ B-Subfamilie p105 und p100, welche durch Proteolyse in die aktiven Formen p50 bzw. p52 gespalten werden. Alle genannten Proteine können Homo- oder Heterodimere miteinander ausbilden, was wiederum für ihre Aktivität als Transkriptionsfaktor essentiell ist. Aktiver NF- κ B-Transkriptionsfaktor gelangt schließlich in den Zellkern, wo er, durch Bindung an eine 9-10nt lange Konsensussequenz (die κ B-sites) auf der DNA die Transkription von Zielgenen beeinflusst. Die eigentliche Aktivierung von NF- κ B kann über einen klassischen und einen alternativen Weg erfolgen. Im Folgenden wird nur der klassische Weg beleuchtet, da der alternative Weg primär bei der B- und T-Zellentwicklung relevant ist und daher im Rahmen dieser Arbeit keine Rolle spielt.

Der klassische NF- κ B-Signalweg wird durch Cytokinrezeptoren (z.B. TNF- α -Rezeptor) oder TLRs, welche z.B. bakterielle oder virale Antigene binden, aktiviert. Im ersten Schritt bindet der *inhibitor of kappa B*-Kinase (IKK)-Komplex über spezifische Adaptermoleküle an die cytosolische Domäne des jeweiligen, Liganden-gebundenen Rezeptors. Dadurch wird IKK aktiviert und phosphoryliert seinerseits den *inhi-*

inhibitor of kappa B (I κ B), welcher ein NF- κ B-Dimer, z.B. RelA/p50, im Cytosol sequestriert. Durch die Phosphorylierung kommt es zu einer Lys₄₈-Ubiquitinierung und anschließenden Degradation von I κ B, wodurch das NF- κ B-Dimer freigesetzt wird und in den Nukleus translozieren kann. Zielgene von NF- κ B sind in erster Linie Cytokingene, wobei auch andere Gene auf einer immer länger werdenden Liste zu finden sind (Gilmore, 2006).

1.8.2 Einfluss von CLU auf den NF- κ B-Signaltransduktionsweg

Eines der vielen durch NF- κ B regulierten Gene scheint auch das CLU-Gen zu sein, wobei keine entsprechende Konsensussequenz in dessen Promotor bekannt ist (Li *et al.*, 2002; Saura *et al.*, 2003). Viel interessanter ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass CLU selbst einen Einfluss auf den NF- κ B-Signalweg zu haben scheint. In einigen Arbeiten wird postuliert, dass CLU die NF- κ B-Aktivität durch Stabilisierung der I κ Bs negativ beeinflusst. Dies wurde per NF- κ B-Reporterassay (Santilli *et al.*, 2003; Bettuzzi *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009), RelA-spezifischen ELISA (Devauchelle *et al.*, 2006; Savkovic *et al.*, 2007) und Western-Blot (Takase *et al.*, 2008; Bettuzzi *et al.*, 2009) untersucht, wobei die Messungen zumeist an mit TNF- α -behandelten Zellen durchgeführt wurden um eine eindeutige NF- κ B-Antwort zu generieren. Ein zentraler Punkt, der in keiner der genannten Arbeiten geklärt wird ist, auf welche Art und Weise CLU die I κ Bs bindet. Es wird angedeutet, dass es sich dabei wohl um eine indirekte Interaktion handelt (Santilli *et al.*, 2003). Des Weiteren ist ungeklärt, welche CLU-Isoform die beschriebenen Effekte verursacht, da in den meisten Fällen nur allgemein von CLU-vermittelten Effekten gesprochen wird.

Im Gegensatz zu der potentiell inhibitorischen Wirkung von CLU auf den NF- κ B-Signalweg steht die Hypothese, dass CLU die NF- κ B-Aktivität verstärkt. Dies soll über direkte Bindung von sCLU an COMMD1, ein I κ B-stabilisierendes Protein, passieren. Dadurch könne dessen Ubiquitinierung und somit auch die Ubiquitinierung von I κ B beschleunigt werden, was eine erhöhte NF- κ B-Freisetzung zur Folge hat (Zoubeidi *et al.*, 2010a; Zoubeidi *et al.*, 2010b; Bartuzi *et al.*, 2013). Auch hier steht die offene Frage im Vordergrund, wie das sezernierte Protein sCLU ins Cytosol gelangt, um dort eine Bindung mit dem cytosolischen COMMD1 einzugehen.

1.9 Ziele der Arbeit

Das in den 1980er Jahren entdeckte Protein Clusterin (CLU), auch bekannt als Apolipoprotein J, wird bei Vertebraten von einer Vielzahl an Geweben exprimiert. Besonders unter Zellstressbedingungen ist die Expression erhöht, wodurch CLU mit verschiedensten Pathologien, darunter neurodegenerativen Erkrankungen, Ischämie und Krebs, in Zusammenhang gebracht wird. Das sezernierte Clusterin (sCLU), das ausgehend von einem ca. 50kDa großen prä-Proprotein über eine 60kDa ER/Golgi-Vorstufe zu einem 80kDa großen, heterodimeren Glykoprotein reift, ist eingehend erforscht. Es besitzt eine Chaperonaktivität und nimmt eine cytoprotektive Rolle bei der Proteinhomöostase ein, indem es die Beseitigung fehlgefalteter Proteine fördert. Neben sCLU sind jedoch auch nicht-sezernierte CLU-Formen bekannt. Deren Biogenese ist vergleichsweise schlecht charakterisiert, was insbesondere auf unterschiedliche, teilweise widersprüchliche Beobachtungen und auf daraus resultierende Hypothesen zurückzuführen ist. So werden alternatives Splicing, alternative Translationsstartpunkte und post-translationalen Modifikationen als mögliche Ausgangspunkte der Biogenese diskutiert. Auch bezüglich der subzellulären Lokalisation und der damit einhergehenden funktionellen Eigenschaften von nicht-sezerniertem CLU gibt es keinen Konsens. Man geht von einer cytotoxischen Wirkung dieser CLU-Formen aus, was u.a. auf deren potentiellen Einfluss auf die Ku70-vermittelte DNA-Reparatur, den NF- κ B-abhängigen Signaltransduktionsweg oder die Bax-induzierte Apoptose zurückgeführt wird.

Um die Biogenese der nicht-sezernierten CLU-Formen zu erforschen, sollte zunächst eine umfassende Analyse der CLU-mRNA-Varianten durchgeführt werden. Dabei wurden die drei in der *NCBI-GenBank* aufgelisteten Varianten, Variante 1 (NM_001831.3), Variante 2 (NR_038335.1) und Variante 3 (NR_045494.1), berücksichtigt. Diese besitzen alle 9 Exons, wobei sich nur das Exon 1 zwischen den einzelnen Transkripten unterscheidet (Exons 1a, b, c). Bei Variante 1 kam es jüngst zu Kontroversen bezüglich deren genauer Sequenz im 5'-Bereich. Daher sollte per 5'-RACE versucht, diesen Bereich der mRNA eindeutig zu charakterisieren. Anschließend wurde geplant, die Expression der CLU-mRNA-Varianten mit semi-quantitativen und quantitativen PCR-Methoden zu erforschen. Hier sollte zum einen das Ausmaß der Induktion einzelner Varianten auf zellulären Stress hin gemessen, zum anderen die Existenz der durch alternatives Splicing entstehenden mRNA Variante 1 [Δ ex2], welcher das Exon 2 und damit auch die Signalsequenz codierende Region (SSCR) fehlt, analysiert werden. Basierend auf den dort gewonnen Erkenntnissen konnten Transfektionsexperimente an HEK-293-Zellen ausgearbeitet werden. Durch transiente Überexpression distinkter cDNAs sollte überprüft werden, für welche CLU-Proteinformen die einzelnen mRNA-Varianten codieren. Weiterführende Ansätze mit *in vitro* mutagenisierten cDNAs sollten helfen, die Translationsstarts der entstehenden Isoformen zu identifizieren. Dabei waren, neben dem Startcodon auf Exon 2, welches den Translationsstart von sCLU darstellt, besonders Startcodons auf Exon 3 sowie auf Exon 1c interessant, da diese gegenwärtig als mögliche Translationsstarts für nicht-sezernierte CLU-Formen diskutiert werden. Des Weiteren sollten Deglykosylierung, Proteasominhibierung, Zellfraktionierung und LSM-gestützte Immunocytochemie Aussagen zum Glykosylierungsgrad, der post-translationalen Regulation sowie der subzellulären Lokalisation der einzelnen CLU-Formen ermöglichen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, die einzelnen CLU-Formen funktionell zu charakterisieren. Zum einen sollte durch *in vitro* Versuche deren Chaperonaktivität in Präzipitationsassays erforscht und zu diesem Zweck die entsprechenden Proteine aus überexprimierenden Zellen aufgereinigt werden. Dabei steht die Frage im Vordergrund, ob die vom sCLU ausgehende, aggregations-hemmende Wirkung auch von den nicht-sezernierten Formen ausgeübt wird. Zum anderen sollte der Einfluss der distinkten CLU-Formen auf die Apoptose sowie auf den NF- κ B-abhängigen Signaltransduktionsweg durch Überexpression der korrespondierenden cDNAs in HEK-293 und PC-3-Zellen *in vivo* untersucht und in diesem Zusammenhang insbesondere die potentiell cytotoxische Wirkung der nicht-sezernierten CLU-Formen überprüft werden.

2 MATERIAL

2.1 Laborgeräte

Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Gerätschaften ist in Tab. 2.1 gegeben. Standardlaborgeräte wie Kühl-/Gefrierschränke, Eismaschinen, Wasserbäder, Heizblöcke, Kipptische, Überkopfschüttler, Mikrowellen, Vortexer, Waagen oder Magnetrührer, allgemeine Plastik- und Glasgeräte (Flaschen, Trichter, usw.) sowie gängige EDV-Software sind nicht gesondert aufgeführt.

Tab. 2.1: Verwendete Laborgeräte und deren Hersteller

Typ	Name/Bemerkungen	Hersteller
Autoklav	FVA	Fedegari Autoklavi Spa
Brutschrank	BM600	Memmert
CD-Spektrometer	J-815 CD-Spectrometer	Jasco
CO ₂ -Inkubator	CB 210	Binder
Densitometrie-Software	Advanced Image Data Analyzer	Raytest
ELISA-Reader	PowerWave XS	BioTek
Flachbettscanner	CanoScan LiDE 210	Canon
Filtrationseinheit	Minimate™ TFF Capsule with 30 kDa Omega Membrane	Pall
FPLC-Anlage	Amersham Äktabasic 10	GE Healthcare (ehem. Amersham Pharmacia)
FPLC-Säulen	XK16/20 C10/10	GE Healthcare (ehem. Amersham Pharmacia)
Gel-/Blotdokumentation	Alphamager VersaDoc Gel Imaging System	Alpha Innotech Bio-Rad
Hämocytometer	Zählkammer Neubauer improved	Roth
Inkubationsschüttler	Ecotron	Infors HT
Kühlzentrifugen	Multifuge 15-R Bioblock scientific 3K15	Thermo Scientific / Heraeus Sigma
Laser Scanning Mikroskop	LSM SP5	Leica
Lichtmikroskop	Wilovert S	Hund
Luminometer	LUMIstar OPTIMA	BMG Labtech
Peristaltische Pumpe	MP-GE	Ismatec
pH-Meter	765 Calimatic	Knick
Photometer	BioPhotometer plus	Eppendorf
Pipetten (Kolbenhub)	10 ml, 5 ml, 1.000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl, 2 µl	Brand; Gilson; Eppendorf
Pipetten (elektronisch)	Multipette® Stream XPlorer® (8-Kanal)	Eppendorf Eppendorf
Pipettierhilfe	accu-jet®	Gilson
Pufferkammern für Agrosegele	(13 cm × 10 cm) (10 cm × 5 cm)	(Eigenkonstruktion)

Reinstwasseranlage	<i>Purelab maxima</i>	ELGA
SDS-PAGE-System	<i>Mini PROTEAN Tetra Cell</i>	Bio-Rad
Semi-dry Blottingsystem	<i>Carbo Glas</i>	Schleicher & Schuell
Spannungsgeräte	<i>LKB ECPS 3000/15</i>	GE Healthcare (ehem. Amersham Pharmacia)
	<i>ECPS 6011</i>	
	<i>Powerpack P25 T</i>	Biometra
Sterilbank	<i>UVF 6.12 S</i>	BDK
Statistiksoftware	<i>Prism 5</i>	Graph Pad
Thermo-/Lightcycler	<i>TPersonal</i>	Biometra
	<i>7500 Fast Real-Time PCR System</i>	Life Technologies
Tischzentrifugen	<i>Spectrafuge 24D</i>	Labnet
	<i>Spectrafuge Mini</i>	Labnet
Ultraschall	<i>Branson sonifier</i>	Branson
Vakuumfilter-Aufsatz	<i>PSF Reusable Bottle-Top Filter (45 mm neck), 500ml</i>	Thermo Scientific
Vakuumzentrifuge	<i>Concentrator plus</i>	Eppendorf

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Chemikalien wie Pufferkomponenten, Salze, Säuren, Basen o.ä. wurden von AppliChem, Calbiochem, Merck, Roth, Sigma oder vom Chemikalienlager der Universität Mainz bezogen. Spezielle Chemikalien wie z.B. DNA-Standards, Extraktionskits oder Zellkulturzusätze werden bei den entsprechenden Versuchen gesondert aufgeführt.

Relevante Verbrauchsmaterialien und Einwegartikel sind in Tab. 2.2 genannt. Allgemeine Plastik- und Glasgeräte (Flaschen, Trichter, usw.) Einwegpipetten, Spritzen oder Spritzflaschen sind nicht gesondert aufgeführt.

Tab. 2.2: Verbrauchsmaterialien

Typ	Bemerkung	Hersteller
Cryo-Röhrchen (Cryo.S™)	2 ml	Greiner bio-one
Detektionsplatten	96-Well (á 0,32 cm ²)	Greiner bio-one
	weiße 96-Well (á 0,32 cm ²)	Greiner bio-one
	AB1900 (qPCR 96-Well)	Thermo Scientific
Druckerfolien		Folex
Eppendorfreaktionsgefäße (Eppis)	2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml, 0,2 ml	Greiner bio-one
Filterpapier	Gel Blotting Papier BF-1, VE=100	Buddeberg
	Gel Blotting Papier BF-4, VE=25	
Petrischalen	58 cm ² (Ø 9,4 cm)	Greiner bio-one
Pipettenspitzen	blau, gelb, kristall	Greiner bio-one, StarLab
Polypropylen-Röhrchen	15 ml, 50 ml	Greiner bio-one
Reinstwasser (mpH ₂ O) ¹⁾	selbst hergestellt mit Reinstwasseranlage	-
Sterilfilter für Spritzen	Milllex®GP, 0,22 µm	Millipore

Sterilfiltermembranen	Cellulose Acetate Membrane Filter, 0,22µm	Sartorius
Zentrifugeneinheiten	Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-50 membrane Vivaspin 4 VS0413; 5,000 MWCO PES	Millipore Sartorius
Zellkulturflaschen	groß (175 cm ²) mittel (75 cm ²) klein (25 cm ²)	Greiner bio-one
Zellkulturplatten	6-Well (á 9,6 cm ²) 24-Well (á 1,9 cm ²) 96-Well (á 0,32 cm ²)	Greiner bio-one
Zellkulturschalen	Ø 9,4 cm (58 cm ²)	Greiner bio-one

¹⁾ im Folgenden als mpH₂O („millipore“ Wasser) bezeichnet. Dieses wurde, außer zu Reinigungszwecken, immer mit der Reinstwasseranlage hergestellt. Der Widerstand betrug >15 MΩ.

2.3 Biologisch aktive Substanzen

Unter diesem Punkt werden alle Substanzen zusammengefasst, die in verschiedener Art und Weise biologisch aktiv werden können. Dazu gehören neben bestimmten Enzymen auch DNA-Primer, Antikörper und Plasmidvektoren.

2.3.1 Antikörper

Antikörper wurden im Laufe der Arbeit für Western-Blots und immunocytochemische Färbungen eingesetzt. Die dabei verwendeten Antikörper sowie weitere Informationen sind in Tab. 2.3 und in Tab. 2.4 aufgeführt.

Tab. 2.3: Verwendete Primärantikörper. Detaillierte Informationen sind den Herstellerangaben zu entnehmen.

Name	Wirt	Epitop	Arbeitsverdünnung	Hersteller
<i>Anti-Clusterin α chain (human), clone 41D</i>	Maus, IgG monoklonal	Clusterin α-Kette (human)	1 : 1000 (Western-Blot)	Millipore (ehem. Upstate)
<i>Anti-V5 Antibody</i>	Maus, IgG monoklonal	V5-Epitop	1 : 5000 (Western-Blot) 1 : 200 (ICC)	Life Technologies (ehem. Invitrogen)
<i>Anti-α-Tubulin-Antibody</i>	Maus, IgG monoklonal	α-Tubulin (ubiquitär)	1 : 5000 (Western-Blot)	Sigma
<i>Calreticulin Antibody (SPC-122A)</i>	Kaninchen, IgG polyklonal	Calreticulin (ubiquitär)	1 : 2000 (Western-Blot)	Stressmarq
<i>GAPDH antibody</i>	Kaninchen, IgG monoklonal	GAPDH (human)	1 : 2000 (Western-Blot)	Epitomics
<i>sc-6419: Clusterin-α (C-18)</i>	Ziege, IgG polyklonal	Clusterin β-Kette (human) ²⁾	1 : 1000 (Western-Blot)	Santa Cruz

²⁾ Vorversuche des AK Koch-Brandt zeigten, dass das Epitop nicht die vom Hersteller angegebene α-Kette, sondern die β-Kette ist, was vermutlich mit einer unterschiedlichen Nomenklatur der einzelnen Kette zusammenhängt.

Tab. 2.4: Verwendete Sekundärantikörper. Detaillierte Informationen sind den Herstellerangaben zu entnehmen.

Name	Wirt	Konjugat	Epitop	Arbeitsverdünnung	Hersteller
<i>Anti-Goat IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody</i>	Kaninchen, IgG monoklonal	Meerrettich Peroxidase	Ziege-IgG	1:10000 (Western-Blot)	Sigma
<i>Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody</i>	Ziege, IgG monoklonal	Meerrettich Peroxidase	Kaninchen-IgG	1:10000 (Western-Blot)	NEB
<i>Donkey anti mouse IgG; Cy3 conj.</i>	Esel, IgG polyklonal	Cyanin 3	Maus-IgG	1:250 (ICC)	Dianova
<i>Peroxidase Conjugated Affinity Purified Anti-MOUSE IgG</i>	Ziege, IgG monoklonal	Meerrettich Peroxidase	Maus-IgG	1:10000 (Western-Blot)	Rockland

2.3.2 DNA-Primer

Alle DNA-Primer wurden von den Firmen MWG und Sigma bezogen. Die lyophilisiert gelieferte DNA wurde mit mpH₂O aufgefüllt, sodass sie in einer Konzentration von 100 µM vorlag. Die gelösten Primer wurden bei -20°C gelagert. Tabellen mit allen verwendeten DNA-Primern finden sich im Anhang (vgl. 8.2).

2.3.3 Enzyme

Alle im Laufe der Arbeit verwendeten Enzyme sowie die erforderlichen Reaktionsbedingungen sind den jeweiligen Versuchen (vgl. 3) zu entnehmen.

2.3.4 Plasmide

Für die rekombinante Expression von Proteinen in eukaryontischen Zellen wurden cDNAs in den Expressionsvektor pcDNA6/V5-His B (Life Technologies) kloniert. Als prokaryontischer Expressionsvektor wurde pQE-30 (Quiagen) und für die Bestimmung der NF-κB-Aktivität das Reporterplasmid pNFκB-Luc (Clontech) verwendet. Die Vektorkarten sind in Abb. 2.1 gezeigt.

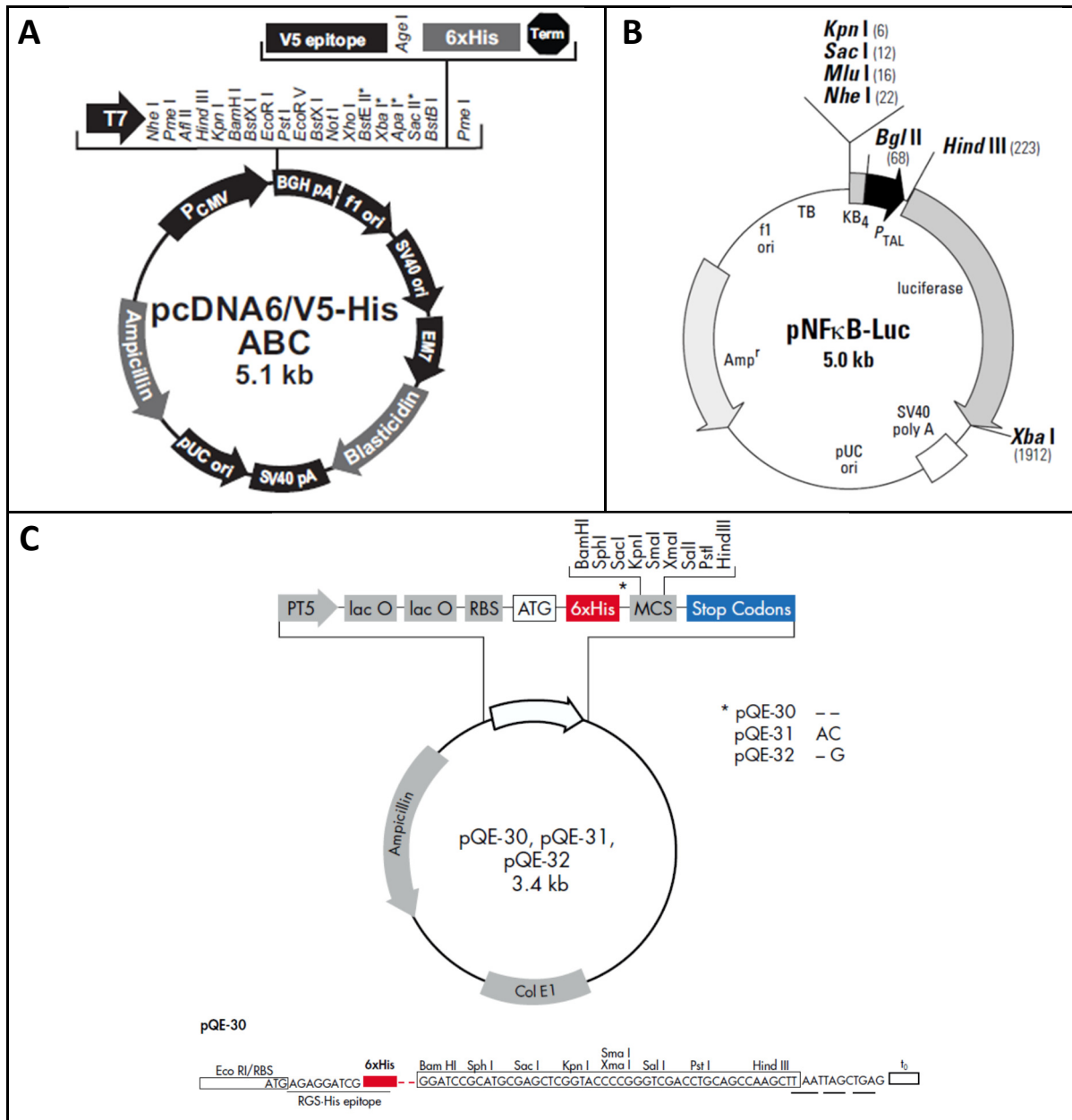


Abb. 2.1: Vektorkarten. (A) Der Expressionsvektor pcDNA6/V5-His. Das Plasmid ist in drei Isoformen (A, B und C) erhältlich, wobei sich diese in ihrer Sequenz nach der Schnittstelle für *XhoI* unterscheiden; Sequenzen von V5-Epitop (13 AS langes Oligopeptid aus *simian virus 5*), 6 × His und Term (Stoppcodon) befinden sich bei jeder Isoform in einem anderen der drei Leseraster. Für die hier durchgeführten Experimente musste das Plasmid pcDNA6/V5-His B verwendet werden, um das Stopcodon im richtigen Leseraster zu platzieren. **(B)** Das Reporterplasmid pNFκB-Luc. Der Abschnitt KB₄ beinhaltet sechs κB-sites, an die das aktive NF-κB-Dimer bindet. Der P_{TAL}-Abschnitt entspricht dem Minimalpromotor der *Herpes simplex*-Virus-Thymidinkinase. **(C)** Der Expressionsvektor pQE. Das Plasmid ist in den Isoformen 30, 31 und 32 erhältlich, wobei im Folgenden die Form pQE-30 verwendet wurde.

3 METHODEN

Sofern nicht explizit genannt wurden alle im Folgenden beschriebenen Schritte bei Raumtemperatur (20 bis 25°C) durchgeführt.

3.1 Arbeiten mit Zellkulturen

Kultiviert man Gewebszellen außerhalb eines Organismus, so spricht man von Zellkultur. Zellen lassen sich direkt aus einem Gewebe in Kultur nehmen (Primärkultur), sterben jedoch nach einer gewissen Zeit ab und müssen neu isoliert werden. Daher wird häufig auf immortalisierte Zelllinien zurückgegriffen. Diese wurden ausgehend von Primärkulturen selektioniert, sind unbegrenzt teilungsfähig und daher leicht in geeigneten Gefäßen zu kultivieren, bis sie infolge von Kontaktinhibitionen ihr Wachstum verlangsamen. Man spricht dann von konfluenten Zellen, wobei in dieser Arbeit ausschließlich adhärente, also auf einer festen Matrix wachsende Zellen Verwendung fanden. Ein essentieller Zusatz für diese Art von Zellkultur ist Serum, im Speziellen fetales Kälberserum (FKS). Als Serum bezeichnet man den löslichen Anteil geronnenen Bluts. Es beinhaltet hohe Mengen an Wachstumsfaktoren, insbesondere den *platelet-derived growth factor*.

3.1.1 Aussaat, Kultur und Konservierung von Zelllinien

Für die hier durchgeführten Experimente wurden hauptsächlich vier verschiedene humane Zelllinien kultiviert: HEK-293, PC-3, MCF-7 und Caco-2. Die erste stellt eine durch virale Modifikation immortalisierte Zelllinie dar, die anderen drei sind Krebszelllinien, stammen also aus Tumoren. Des Weiteren wurde biologisches Material aus den Zelllinien HeLa, Hep G2 und EA.hy926 verwendet. Diese mussten jedoch nicht extra kultiviert werden, da entsprechende Proben bereits in präparierter Form vorlagen. Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter der Sterilbank durchgeführt, alle dafür verwendeten Materialien und Reagenzien waren steril. Die kultivierten Zelllinien wurden regelmäßig unter dem Lichtmikroskop beobachtet und beim Erreichen der Konfluenz standardmäßig passagiert.

Material und Reagenzien

Dimethylsulfoxid (DMSO) [Roth]

.....
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), enthält 4,5 g/l Glucose [Sigma]

.....
 FKS (superior) [Biochrom]

.....
 L-Glutamin: 200 mM L-Glutamin mpH₂O [Biochrom]

.....
Minimal essential medium (MEM)-Earle (10×) [Biochrom]

.....
 NaHCO₃: 7,5% (w/v) NaHCO₃ in mpH₂O [Biochrom]

.....
 Natriumpyruvat: 100 mM Natriumpyruvat in mpH₂O [Biochrom]

.....
 Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) (100×) [Biochrom]

.....
 Penicillin/Streptomycin: 10.000 U/ml Penicillin
 10.000 µg/ml Streptomycin
 in mpH₂O [Biochrom]

.....
Phosphate buffered saline (PBS): PBS (w/o Mg, w/o Ca), Pulver (10×) [Biochrom], gelöst nach Angaben

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium [Biochrom]

Trypsinlösung (10×): 0,5% (w/v) Trypsin
 0,2% (w/v) Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
 in PBS (10×) [Biochrom], gelöst nach Angaben

Zellkultur

Die adhärenenten Zellen wuchsen im CO₂-Inkubator bei 37°C, wassergesättigter Atmosphäre und einem CO₂-Gehalt von 5%. Standardkulturgefäße waren 175 cm² Flaschen (Menge Kulturmedium: 30ml), 75 cm² Flaschen (15 ml), 25 cm² Flaschen (5 ml), 58 cm² Schalen (10 ml), 6-Well Platten (1,5 ml), 24-Well Platten (1 ml) und 96-Well Platten (100µl). Dabei wurden Flaschen und Schalen meist zur fortlaufenden Kultivierung oder zur Anzucht großer Zellmengen verwendet, wohingegen Zellen für experimentelle Analysen i.d.R. in Platten kultiviert wurden. Die Zusammensetzung der verschiedenen Kulturmedien ist in Tab. 3.1 aufgelistet. Alle Medien enthielten den pH-Indikator Phenolrot, der eine Übersäuerung durch Umschlag von Rot zu Gelb anzeigt, wobei in gegebenen Fall die Zellen passagiert werden sollten (s.u.). Die fortlaufende Zellkultur fand stets mit serumhaltigem Kulturmedium statt. Für Experimente wurden i.d.R. serumfreie Bedingungen gewählt. Hierauf wird an entsprechenden Stellen nochmals explizit hingewiesen.

Tab. 3.1: Zusammensetzung der Medien für die Kultur verschiedener Zelllinien.

Reagenz	HEK-293	PC-3	MCF-7	Caco-2
mpH ₂ O	-	-	-	182,5 ml
DMEM	250 ml	250 ml	-	-
RPMI 1640	-	-	250 ml	-
MEM-Earl (10×)	-	-	-	25 ml
L-Glutamin	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
NaHCO ₃	-	-	-	7,5 ml
Natriumpyruvat	2,5 ml	-	-	2,5 ml
NEA	-	-	-	2,5 ml
Penicillin/Streptomycin	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
FKS	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml

Passagieren von Zellen

Zum Transferieren (Passagieren) der Zellen von einem Kulturgefäß in ein anderes wurde zuerst das Kulturmedium abgezogen, die Zellen kurz mit PBS gewaschen und anschließend für 10s mit Trypsinlösung (1×) überschichtet. Die Protease spaltet die Adhäsionsmoleküle, welche die adhärenenten Zellen am Substrat verankern (Trypsinisieren). Nach Entfernen der Trypsinlösung und anschließender Inkubation für 5 bis 15 min (je nach Zelltyp) bei 37°C konnten die Zellen durch Auf- und Abpipettieren in frischem Kulturmedium vereinzelt, verdünnt und in das gewünschte Zielgefäß übertragen werden. Die Zellen mussten mindestens einmal pro Woche passagiert werden, wobei ausgehend von einer 100% konfluenten Flasche ein Passageverhältnis zwischen 1:25 (HEK-293) und 1:10 (PC-3, MCF-7, Caco-2) zur fortlaufenden Kultur gewählt wurde. Das Passageverhältnis wurde erhöht, um die Zellen innerhalb von 24h in gewünschter Konfluenz bzw. Zellzahl für ein Experiment heranwachsen zu lassen. In diesem

Fall betrug das Passageverhältnis zumeist 1:4 (HEK-293) oder 2 : 3 (PC-3, MCF-7, Caco-2). Dabei war bei Passagen zwischen verschiedenen großen Kulturgefäßen stets der Flächenfaktor (Flächenverhältnis zwischen den Kulturgefäßen) einzukalkulieren. Waren exakte Zellzahlen gewünscht, so konnten die Zellen mit Hilfe eines Häemocytometers gezählt werden. Auf dieses Objektträger-ähnliche Glas-Präzisionsmessgerät sind insgesamt 8 Großquadrate graviert, welche nochmals in je 16 Kleinquadrate unterteilt sind. Die zu zählende Zellsuspension wurde empirisch in Kulturmedium verdünnt und zwischen das Häemocytometer und ein aufliegendes Deckglas gegeben. Die Zellzahl sollte nun ca. 15 bis 30 Zellen pro Großquadrat betragen. War dies nicht der Fall, musste die Verdünnung angepasst werden. Nach dem Zählen der Zellen unter dem Lichtmikroskop konnte ein Mittelwert aus den acht Großquadraten errechnet werden. Die absolute Zellzahl ergab sich nach folgender Formel:

$$\text{absolute Zellzahl} = \frac{\text{gezählte Zellzahl}}{\text{Anzahl Großquadrate}} \cdot 10^4 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Konservierung und Aussaat von Zellen

Alle Zelllinien konnten in Form von sogenannten *Cryostocks* bei -80°C konserviert und bei Bedarf auch wieder aus selbigen in Kultur genommen werden. Um z.B. *Cryostocks* aus einer konfluent bewachsenen 175 cm^2 Flasche anzulegen, wurden die Zellen trypsinisiert (s.o.), in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, 10 min bei $200\times g$ pelletiert und das Medium verworfen. Anschließend konnten die Zellen in 4,5 ml FKS resuspendiert werden. Nach Zugabe von 0,5 ml DMSO wurde die Zellsuspension in Cryo-Röhrchen á 1 ml aliquotiert, in einer isolierten Schachtel schonend auf -80°C herabgekühlt und bei dieser Temperatur gelagert. Wenn *Cryostocks* aus anderen Kulturgefäßen angelegt werden sollten, wurde der Ansatz entsprechend angepasst.

Um Zellen aus *Cryostocks* auszusäen wurden diese schonend bei 37°C aufgetaut und in Kulturmedium aufgenommen. Handelte es sich um neuere *Cryostocks*, so konnten die Zellen durch 10 min Zentrifugation bei $200\times g$ pelletiert und anschließend das Medium mitsamt dem noch enthaltenen DMSO verworfen werden. Die Zellen wurden dann in ein entsprechendes Kulturgefäß in frischem Kulturmedium vereinzelt und in Kultur genommen. Bei älteren *Cryostocks* entfiel der Zentrifugationsschritt und die Zellen wurden direkt in Kultur genommen. Nach 24 h musste dann das Kulturmedium durch frisches Medium ersetzt werden, um potentiell toxisches DMSO zu entfernen.

3.1.2 Behandlung von Zellen mit MG-132, H_2O_2 und erhöhter Temperatur

Die Substanz N-(benzyloxycarbonyl)leucinylleucinylleucinal (MG-132) ist ein effektiver, reversibler Proteasominhibitor. Da sie recht leicht die Zellmembran von lebenden Zellen penetrieren kann, reicht eine bloße Zugabe zum Kulturmedium einer Zellkultur aus, um die zelluläre Proteasomaktivität nahezu vollständig zu inhibieren. Aufgrund der Blockade des Proteasoms akkumulieren sämtliche Proteine innerhalb der Zellen, welche eigentlich durch eine Ubiquitinierung für den Abbau markiert waren. Somit löst MG-132 in den Zellen einen proteotoxischen Stress und eine Hitzeschockantwort aus (Bush *et al.*, 1997). Neben MG-132 wurden bestimmte Zellen auch mit H_2O_2 behandelt oder erhöhten Temperaturen ausgesetzt. Die verschiedenen Behandlungen dienten zur anschließenden Untersuchung des CLU-

mRNA- und Proteingehalts in den Zellen, dessen Expression bekanntermaßen durch zellulären Stress beeinflusst wird.

Material und Reagenzien

DMSO [Roth]

H₂O₂-Lösung (100 mM): 8,56 µl H₂O₂ (35 % v/v) [Roth] in 1 ml mpH₂O

MG-132-Lösung: 2,5 mM MG-132 [Calbiochem] in DMSO

Durchführung

Die Zellen konnten sowohl in serumhaltigem als auch in serumfreiem Kulturmedium mit MG-132 behandelt werden, was im jeweiligen Versuchsteil nochmals explizit erwähnt wird. Generell wurde eine Endkonzentration von 10 µM angewendet, d.h. die entsprechende Menge MG-132-Lösung in Kulturmedium vorverdünnt und in das bereits auf den Zellen vorhandene Medium gegeben. Für HEK-293-Zellen musste, wegen der hohen Toxizität der Substanz, eine maximale Behandlungszeit von 10h eingehalten werden. MCF-7- und PC-3-Zellen wurden für 18h, Caco-2-Zellen für 24h behandelt. Das Kulturmedium von Kontrollzellen wurde, anstelle von MG-132, mit äquivalenten Mengen an DMSO versetzt. Zur H₂O₂-Behandlung von HEK-293-Zellen konnte die entsprechende Menge, analog zu MG-132, direkt ins Kulturmedium gegeben werden, wobei Endkonzentrationen von 1 mM oder 2 mM eingehalten wurden. Die Inkubationszeit betrug in diesem Fall 24h, wobei bei den hier durchgeführten Experimenten ausschließlich serumfreie Bedingungen herrschten. Die Kultur bei erhöhter Temperatur wurde ebenfalls nur für HEK-293-Zellen durchgeführt und zwar bei exakt 45°C. Dazu wurden die Zellen mit serumfreiem Medium für genau 60, 90 oder 120 min in einem separaten CO₂-Inkubator kultiviert und anschließend wieder bis zu einer Gesamtzeit von 24h bei 37°C inkubiert. Kontrollzellen zur H₂O₂- und 45°C-Behandlung wurden serumfrei für 24h bei 37°C kultiviert.

3.1.3 Transiente Transfektion von Zellkulturen mit Expressionsplasmiden

In Zellkulturen kann mit Hilfe bestimmter Techniken Fremd-DNA zur Expression gebracht werden. Man spricht von Transfektion (Kunstwort für engl. *infection by transformation*). Dabei gibt es mehrere Möglichkeiten, so kann die DNA über chemische Methoden (z.B. Calcium-Phosphat-Präzipitation, Liposomen), physikalische Methoden (z.B. Elektroporation, Mikroinjektion) oder biologische Methoden (z.B. virale Vektoren, rezeptorvermittelte Transfektion) in die eukaryontische Zelle eingebracht werden. Es eignet sich jedoch nicht jede Methode für jeden Zelltyp. In dieser Arbeit wurde auf eine chemische Transfektion mit kationischen Polymeren zurückgegriffen, welche unter verschiedenen Markennamen von verschiedenen Anbietern erhältlich sind. Im Speziellen wurde hier das Transfektionsreagenz *TurboFect* der Firma *Thermo Scientific* verwendet, das die einzubringende Plasmid-DNA komplexiert und so eine Endocytose der entstehenden Komplexe in die Zellen ermöglicht. Ein geringer Prozentsatz der aufgenommenen Plasmid-Komplexe erreicht den Zellkern, wo die ektopische DNA entsprechend transkribiert werden kann. Die so eingebrachten Plasmide werden innerhalb von 72 h von der Zelle abgebaut, man bezeichnet diesen Vorgang daher als transiente (vorrübergehende) Transfektion.

Durch die transiente Transfektion sollte insbesondere eine Überexpression der einzelnen CLU-cDNAs (vgl. 3.4.7) in HEK-293-Zellen erreicht werden um dann Proteinexpressionsanalysen (vgl. 3.5.3) durchführen zu können.

Material und Reagenzien

Opti MEM[®] [Life Technologies]

Plasmid-DNA, 250 µg/ml in 10 mM Tris/HCl (pH 8,5)

TurboFect Transfection Reagent [Roth]

Durchführung

4 × 10⁵ HEK-293 wurden für 24 h in 6-Well-Platten kultiviert (vgl. 3.1.1). Für einen Transfektionsansatz wurden 200 µl *Opti Mem*[®] in einem Eppi vorgelegt, 2 µg Plasmid-DNA zugegeben und der Ansatz für 5 min inkubiert. Anschließend kamen 4 µl *TurboFect* dazu. Nach ausgiebigem Auf- und Abpipettieren konnte der Ansatz nach 20 min Inkubation tropfenweise in je ein *Well* zu den Zellen gegeben werden. Es folgte eine 6-stündige Inkubation der Zellen im CO₂-Inkubator, während derer die eigentliche Transfektion stattfand. Da das Transfektionsreagenz einen leicht toxischen Effekt auf die Zellen ausübt, musste nach Ablauf der Zeit das Kulturmedium gegen 1,5 ml serumfreies Medium/*Well* gewechselt werden. Schließlich wurden die Zellen für 24 h unter den serumfreien Bedingungen kultiviert um sie anschließend ernten zu können (vgl. 3.1.5).

Transfektionen in 96-Well Platten waren für Caspase-Assays (vgl. 3.1.6) notwendig. Dazu wurden 1,5 × 10⁴ HEK-293 pro *Well* (100 µl Kulturmedium) mit 20 µl *Opti Mem*[®], 200 ng Plasmid-DNA und 0,3 µl *TurboFect* wie oben beschrieben transfiziert und nach 6 h Kultur das Medium ohne Waschschrift gegen 50 µl serumfreies Medium gewechselt.

Für NF-κB-Reporterassays (vgl. 3.1.7) mussten Zellen in 24-Well mit zwei Plasmiden (Co-Transfektion) transfiziert werden. Für diesen Ansatz wurden 4 × 10⁵ HEK-293 pro *Well* in 1 ml kultiviert. Für die Transfektionen kamen 300 ng pNFκB-Luc und 700 ng CLU-cDNA in pcDNA6 in 200 µl *Opti Mem*[®]. Nach 6 h Transfektion wurde auf 400 µl serumfreies Medium gewechselt.

3.1.4 Selektion eines sCLU-überexprimierenden Einzelklons

In eukaryontische Zellen transfizierte Plasmide werden, wie bereits erwähnt, innerhalb von 72 h abgebaut (vgl. 3.1.3). Ein Bruchteil wird von einigen Zellen zufällig durch ungerichtete Rekombination ins Genom integriert. Solche stabil transfizierten Zellen können mit Antibiotika positiv selektioniert werden, da die eingebrachte Plasmid-DNA i.d.R. ein Selektionsgen, das für ein Antibiotikum-abbauendes Enzym codiert, enthält. Im Folgenden wurde für diese Zwecke das Antibiotikum Blasticidin S verwendet, welches die Translation über Bindung an Ribosomen hemmt. Zellen, die kein Resistenzgen in ihr Genom integriert haben, sterben somit in Gegenwart von Blasticidin S ab.

Eine stabil transfizierte Zelllinie wurde ausgehend von HEK-293-Zellen selektioniert, die zuvor mit dem Plasmidkonstrukt pcDNA6/CLU-Variante 1 (vgl. 3.4.7) transfiziert wurden. Die selektionierten Zellen exprimieren hohe Mengen an rekombinantem sCLU. Durch Vereinzeln dieser Zelllinie konnte ein Klon

isoliert werden, dessen sCLU-Expression nochmals deutlich gesteigert ist. Dieser wurde im Folgenden für die sCLU-Aufreinigung eingesetzt (vgl. 3.5.8).

Material und Reagenzien

Blasticidin S-Lösung (1000×): 10mg/ml Blasticidin S-Hydrochlorid [AppliChem] in mpH₂O

Selektion einer stabil transfizierten HEK-293 Mischkultur

4×10^5 HEK-293 wurden standardmäßig mit 2 µg pcDNA6/CLU-Variante 1 transfiziert (vgl. 3.1.3), das Medium anschließend jedoch nicht durch serumfreies, sondern durch normales, serumhaltiges ersetzt. Nach 48-72h Kultur, also nach Abklang der transienten Expression, konnten die Zellen direkt von dem 6-Well in eine 75 cm² Kulturflasche passagiert werden, wobei das Wachstumsmedium nun Blasticidin S-Lösung (1 ×) enthielt (Selektionsmedium). In den folgenden Tagen starben große Mengen an Zellen ab. Das Selektionsmedium wurde alle 48-72h gewechselt und die Zellen in 175 cm² Kulturflaschen überführt. Nach zwei Wochen Kultur war die Selektion abgeschlossen und es konnten *Cryostocks* der erhaltenen, sCLU-exprimierenden Mischkultur angelegt werden (vgl. 3.1.1).

Isolation und Kultur eines hoch-exprimierenden sCLU-Einzelklons

Die in einer selektionierten Mischkultur enthaltenen Zellen exprimieren alle unterschiedliche Mengen an sCLU, da die Rekombination der Plasmid-DNA zufällig an verschiedene Stellen des Genoms erfolgt. Um einen Einzelklon zu isolieren wurden die Zellen der Mischkultur ausgezählt und eine Verdünnung mit 140 Zellen/12 ml Selektionsmedium angesetzt. Diese wurden mit Hilfe einer elektronischen Mehrkanalpipette zu 100 µl in eine 96-Well Platte ausgesät. Statistisch befanden sich nun 1,17 Zellen pro Well. Durch ständige Kontrolle per Lichtmikroskopie konnten Wells, in denen nur ein einzelner Focus heranwuchs, ausgemacht werden. Diese wurden nach Erreichen der Konfluenz in ein 24-Well und anschließend in ein 6-Well, jeweils mit Selektionsmedium, passagiert. Ausgehend von den konfluenten 6-Wells kam ein Teil der Zellen in ein neues 6-Well, der Rest in eine 58 cm² Kulturschale. Letztere wurden im konfluenten Zustand als *Cryostocks* konserviert (vgl. 3.1.1). Von den Zellen im 6-Well wurden, nach Erreichen der Konfluenz und 24h Kultur unter serumfreien Bedingungen, Zelllysate und Überstände geerntet (3.1.5) und im Speziellen die Überstände via Western-Blot auf CLU-Expression hin überprüft (vgl. 3.5.3). Die Auftragsmengen der Überstände für die SDS-PAGE musste dabei relativ zu den per Bradford-Assay bestimmten Proteinkonzentrationen (vgl. 3.5.1) der Zelllysate angepasst werden. So kristallisierte sich aus 50 isolierten Einzelklonen die Zelllinie HEK-293+sCLU-BG3 heraus, die extrem hohe Mengen an rekombinantem sCLU sezerniert. Für die Nickel-Affinitätschromatographie (vgl. 3.5.8) wurde diese bis zur Konfluenz in zehn 175cm² Flaschen kultiviert, anschließend für 60h unter serumfreien Bedingungen gehalten (Anreicherung von sCLU) und das Zellkulturmedium geerntet (vgl. 3.1.5).

3.1.5 Ernten von Gesamtzelllysaten und Zellkulturüberständen

Um die Proteinexpression in Zellkulturen untersuchen zu können, muss ein Zellaufschluss gemacht werden. Die Zellen werden mit Hilfe von Detergentien lysiert und die Zellextrakte gesammelt. Zuvor ist es, z.B. im Falle der Clusterinexpression, sinnvoll, auch das Zellkulturmedium zu sammeln, um die

Expression sezernerter Proteine untersuchen zu können. Da die dem normalen Wachstumsmedium zugesetzten Serumproteine für spätere Versuche hinderlich sind, mussten alle im Folgenden zu analysierenden Zellen vor dem Ernten unter serumfreien Bedingungen kultiviert werden.

Material und Reagenzien

Zellysepuffer: 50mM Tris/HCl (pH 8)
150mM NaCl
1% (v/v) Triton X[®]-100
in mpH₂O

Durchführung

Wenn nicht anders angegeben, wurden die konfluenten Zellen in 6-Well-Platten für 24h mit 1,5ml serumfreien Medium kultiviert. Die Zellen konnten z.B. zuvor transfiziert (vgl. 3.1.3) oder mit MG-132 behandelt worden sein (vgl. 3.1.2). Zuerst wurde das serumfreie Zellkulturmedium abgenommen, in 2ml Eppis überführt und abschwimmende Zellen für 10min bei 200×g pelletiert. Der geklärte Überstand konnte anschließend abgenommen und bei -20°C gelagert werden. Die Zellen in der 6-Well wurden mit Zellysepuffer überschichtet, wobei dessen Volumen empirisch angepasst werden musste, um im Folgenden eine ausreichend hohe Proteinkonzentration zu erhalten. So betrug es für HEK-293-Zellen 200-250µl, für MCF-7 und PC-3-Zellen 100µl und für Caco-2-Zellen 50µl. Das Zellysate wurde schließlich mit einem Zellschaber eingesammelt, in ein 1,5ml Eppi überführt, mit den aus dem Zellkulturmedium pelletierten Zellen vereint und für 1h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach abschließender Zentrifugation für 30min bei 4°C und 20.000×g, bei der nicht-lösliche Bestandteile abgetrennt wurden, konnte das geklärte Zellysate bei -20°C gelagert werden.

3.1.6 Bestimmung der Caspase 3/7-Aktivität

Caspase 3 bzw. Caspase 7 sind Effektorcaspasen und werden während der zellulären Apoptose über den extrinsischen und den intrinsischen Weg gleichermaßen aktiviert (vgl. 1.7.1). Sie setzen dabei eine Reihe verschiedenster Substrate um. Man kann den Caspasen auch synthetisches Substrat anbieten, welches gleichermaßen umgesetzt, i.e. proteolytisch C-terminal von Aspartat gespalten wird. Im Folgenden wurde ein Aspartat-haltiges, Caspase 3/7-spezifisches Peptid eingesetzt, an das eine lumino-gene Gruppe gebunden war. Die aktive Caspase spaltet das Luminol ab, welches in Gegenwart von ATP, Mg²⁺, O₂ und einer Luciferase eine Lichtreaktion hervorruft. Diese kann in einem Luminometer quantifiziert werden und stellt somit ein Maß für die Caspase-Aktivität dar.

Material und Reagenzien

Caspase-Glo[®] 3/7 Assay [Promega]

Durchführung

Die in 96-Well-Platten transfizierten HEK-293- oder PC-3-Zellen wurden nach 18h serumfreier Kultur bei Bedarf für weitere 10h bzw. 18h mit DMSO oder MG-132 behandelt (vgl. 3.1.2), sodass sich in allen Fällen ein Gesamtvolumen von 70µl pro Well befand. Der *Caspase-Glo*[®] 3/7 Assay, welcher bereits alle

nötigen Reagenzien zur Messung der Caspase-Aktivität enthielt, wurde nach Herstellerangaben vorbereitet und jeweils 70 µl der angesetzten Assaylösung direkt zu den 70 µl Kulturmedium in die 96-*Wells* gegeben. Nach 30 min Inkubation unter Lichtausschluss, in denen die Zellen durch das im Assaypuffer enthaltene Detergenz lysieren, konnte die Lumineszenz in einem Luminometer bestimmt werden. Dazu kamen je 100 µl der Suspension in ein weißes 96-*Well*. Für die Messung der Lumineszenz, welche nach 30 und 60 min erfolgte, wurde die Luminometer Steuerungssoftware *Analysis Mars* (BMG Labtech) unter dem Modus „Endpoint“ verwendet. Die Daten aus je 3 unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst und die Caspase-Aktivität als Säulendiagramm mit eingerechneter Standardabweichung dargestellt (s.u.). Dabei wurde die Aktivität einer bestimmten Probe fixiert und die der anderen relativ darauf bezogen. Dies ist im Ergebnisteil entsprechend vermerkt.

3.1.7 Bestimmung der NF-κB-Aktivität

Der Transkriptionsfaktor NF-κB transloziert nach Aktivierung als dimeres Protein in den Zellkern um dort über Bindung an die NF-κB-*sites* auf der DNA die Transkription von Zielgenen zu regulieren. Eine Aussage über die Aktivität des Transkriptionsfaktors erhält man, wenn man als Zielgen ein Reporter gen verwendet, z.B. ein Luciferasegen. Die Menge an gebildeter Luciferase ist dann abhängig von dem Ausmaß der Aktivierung des Transkriptionsfaktors. Im Folgenden wurde ein Reporterplasmid (pNFκB-Luc) in HEK93-Zellen eingebracht, welches vor dem Luciferasegen den Minimalpromotor der *Herpes simplex*-Virus-Thymidinkinase enthält, der wiederum durch mehrere *upstream* κB-*sites* (Konsensussequenz: GGGAATTTCC) reguliert wird. Nach Aktivierung von NF-κB steigt die Menge an Luciferase in den Zellen an. Durch Zelllyse und Zugabe eines Luminols lässt sich im Luminometer eine Lichtreaktion detektieren, die als Maß für die Aktivität des Transkriptionsfaktors herangezogen werden kann. Analoge Reportersysteme sind auch für andere Transkriptionsfaktoren erhältlich, vorausgesetzt entsprechende Konsensussequenzen derer DNA-Bindestellen sind bekannt.

Material und Reagenzien

BSA-Lösung: 1 mg/ml Albumin Fraktion V [Roth] in mpH₂O

Luciferase Assay System [Promega]: Luciferase Assay Buffer
Cell Culture Lysis Reagent (5×)

TNF-α-Lösung: 1 µg/ml TNF-α [Sigma]
in BSA-Lösung

Durchführung

Das *Luciferase Assay System*-Kit wurde nach Herstellerangaben vorbereitet. Den in 24-*Well* Platten transfizierten HEK-293-Zellen wurde nach 18 h serumfreier Kultur 10 ng/ml TNF-α bzw. eine äquivalenten Menge BSA-Lösung zugesetzt, sodass das Gesamtvolumen an Medium auf den Zellen 500 µl betrug. Nach anschließender Kultur für 24 h konnte das Medium verworfen und die Zellen in 100 µl *Cell Culture Lysis Reagent* (1×) lysiert werden. Um dies zu erreichen erfolgte ein Schockgefrieren der *Wells* bei -80°C mit darauffolgender, 30-minütiger Inkubation auf einem Schütteltisch. Für die Bestimmung der Lumineszenz wurden je Probe 5 µl Zelllysate aus dem 24-*Well* in ein weißes 96-*Well* umpipettiert. Die Zugabe von 50 µl *Luciferase Assay Buffer* erfolgte durch die Einspritzvorrichtung des Luminometers

zwischen jeder Messung separat zu jeder einzelnen Probe. Nach kurzem automatisiertem Schütteln wurde die Lumineszenz über 30s in einem Abstand von 1s vermessen (Einstellung: „Well-Mode“). Die gewonnen Mittelwerte aus vier unabhängigen Messungen konnten zusammengefasst und die relative Luciferase-Aktivität als Säulendiagramm mit eingerechneter Standardabweichung dargestellt werden. Dabei wurde die Aktivität der BSA-behandelten, *mock*- (i.e. pcDNA6-) transfizierten Probe auf „1“ gesetzt und alle anderen Werte relativ darauf bezogen.

3.2 Arbeiten mit Bakterien

In der vorliegenden Arbeit wurden Bakterien der Art *Escherichia coli* verwendet um Plasmidmoleküle zu vervielfältigen und rekombinante Proteine für Aufreinigungszwecke zu exprimieren. Der spezielle Stamm DH5 α ist ein klassischer Klonierungsstamm, der für die Amplifikation von Plasmiden optimiert wurde. *Escherichia coli* SG13009 stellen einen Expressionsstamm dar, der entsprechend zur Biosynthese von rekombinanten Proteinen herangezogen werden kann. Im Laufe der Arbeit wurden eine Reihe an Bakterien mit entsprechenden Plasmiden transformiert und daraus Einzelklone selektioniert. Diese konnten schließlich als Dauerkulturen konserviert werden.

3.2.1 Kultur, Transformation und Konservierung von Bakterien

Die folgenden Arbeiten wurden alle auf Eis durchgeführt. Das Bakterienwachstum erfolgte generell bei 37°C im Inkubationsschüttler. Nachdem die Bakterienstämme DH5 α und SG13009 durch Behandlung mit CaCl₂ chemisch kompetent gemacht wurden(vgl. Diplomarbeit Hans Prochnow), konnten sie über das sogenannte Hitzeschockverfahren mit Plasmidvektoren transformiert werden. Diese wurden teilweise unmittelbar zuvor per Ligation hergestellt (vgl. 3.4.5) und in solchen Fällen der gesamte Ligationsansatz in die Zellen transformiert. Durch die Transformation mit den in dieser Arbeit verwendeten Vektoren pcDNA6 oder pQE-30 wurde eine Ampicillinresistenz in die Bakterien eingebracht. Der Bakterienstamm SG13009 ist durch das bereits integrierte Repressorplasmid (pREP4) resistent gegen Kanamycin.

Material und Reagenzien

Ampicillin-Lösung: 100 mg/ml Ampicillin[Roth] in mpH₂O, steril

Escherichia coli Stämme: DH5- α [Life Technologies]
SG13009(pREP4) [Qiagen]

Kanamycin-Lösung: 25 mg/ml Kanamycin [Roth] in mpH₂O, steril

LB-Agarplatten: 4 % (w/v) LB-Agar [Roth] in mpH₂O, steril
gegossen in 58 cm² Petrischalen

LB-Medium: 2,5 % (w/v) LB-Medium [Roth] in mpH₂O, steril

LB-Medium/Glycerin: 50 % LB-Medium/50% Glycerin, steril

Transformation

200 μ l chemisch kompetente DH5 α oder SG13009 wurden in einem 2 ml Eppi vorgelegt und der Ligationsansatz dazugegeben. In manchen Fällen wurden bereits vorhandene Plasmide transformiert, in

diesem Fall jedoch nur 1 ng DNA eingesetzt. Es folgten eine 30 min Inkubation auf Eis sowie der anschließende Hitzeschock für 90 s bei exakt 42°C im Wasserbad. Daraufhin wurde der Ansatz wieder 5 min auf Eis gehalten, 1 ml vorgewärmtes LB-Medium zugesetzt und alles zusammen 1 h bei 37°C im Bakterienrührer inkubiert. Es schloss sich eine 10 min Zentrifugation bei 4.600 × g an. 1 ml des Überstandes wurde verworfen und die Bakterien in den restlichen 200 µl resuspendiert. Nach Ausstreichen der Bakterien auf den vorgewärmten, antibiotikahaltigen (DH5α: + 400 µg/ml Ampicillin; für SG13009: zusätzlich + 50 µg/ml Kanamycin) LB-Agarplatten und anschließender Inkubation für mindestens 16 h bei 37°C konnten i.d.R. Kolonien ausgemacht werden.

Isolation von DH5-α Einzelklonen

In ein 1,5 ml Eppi wurden 30 µl mpH₂O, in ein 15 ml Röhrchen 5 ml LB-Medium (+ 200 µg/ml Ampicillin) vorgelegt. Daraufhin wurde mit einer 1-10 µl Pipettenspitze eine Bakterienkolonie von der bewachsenen LB-Agar Platte gepickt, in dem mpH₂O resuspendiert und sofort 5 µl davon in die 5 ml LB-Medium überführt. Um die Chance auf einen Klon mit korrektem Integrat zu erhöhen wurden zwischen 10 und 20 Kolonien gepickt. Die in den 30 µl mpH₂O vorhandene Bakterien suspension wurde per Kolonie-PCR (vgl. 3.4.6.2) auf das korrekte Integrat hin überprüft. Die mit den Bakterien angeimpften 15 ml Röhrchen wurden für mindestens 16 h im Inkubationsschüttler bei 37°C inkubiert (Übernachtkultur), anschließend 500 µl der Suspension in ein frisches 1,5 ml Eppi überführt und mit 500 µl LB-Medium/Glycerin versetzt. Nach Durchmischen konnten die so hergestellten Bakterienstocks bei -80°C gelagert und davon jederzeit wieder ein Teil in frisches LB-Medium angeimpft und kultiviert werden. Die restlichen 4,5 ml der Übernachtkultur wurden bei Bedarf direkt zur Plasmidpräparation (vgl. 3.2.2) eingesetzt.

3.2.2 Plasmidpräparation aus transformierten DH5α Bakterien

Der Bakterienstamm DH5α ist ein Klonierungsstamm und darauf ausgelegt große Mengen an Plasmid-DNA zu amplifizieren. Die Bakterien wurden entweder in 15 ml Röhrchen für eine Mini- oder 100 ml Schikanekolben für eine Midi-Präparation kultiviert und die Plasmide aus den dicht bewachsenen Kulturen mit Hilfe entsprechender Extraktionskits, die sich alkalischer Lyse und DNA-Chromatographie-säulchen bedienen, aus den Zellen extrahiert.

Material und Reagenzien

Plasmidextraktionskits: *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* [Thermo Scientific]
NucleoBond® Xtra Midi [Macherey-Nagel]

Tris-Puffer: 10 mM Tris (pH 8,5) in mpH₂O

Durchführung

Zur Plasmidpräparation mussten die entsprechenden DH5α-Bakterienklone in Kultur genommen werden. Dies geschah indem von einer -80°C Dauerkultur (vgl. 3.2.1) ein Teil mit einer Pipettenspitze entnommen und in LB-Medium (+ 200 µg/ml Ampicillin) überimpft wurde. Nach mindestens 16 h Übernachtkultur lagen die Bakterien in ausreichender Menge vor und konnten bei 4.600 × g für 10 min pelletiert werden. Nach Entfernen des LB-Mediums wurde die Plasmidextraktion nach Herstellerangaben mit dem jeweiligen Plasmidextraktionskit durchgeführt. Die isolierten Plasmide wurden in Tris-Puffer

eluiert, anschließend per Photometrie quantifiziert (vgl. 3.4.1) und auf eine Konzentration von 250 ng/μl eingestellt.

3.2.3 Selektion und Stimulation von *CLU*₂₁₋₄₄₉- und *CLU*₃₄₋₄₄₉-überexprimierenden SG13009 Bakterien

Der Bakterienstamm SG13009 eignet sich für die rekombinante Expression von Proteinen und besitzt ein sogenanntes Repressorplasmid (pREP4). Dieses kodiert für den *lac*-Repressor, ein Protein, das an den *lac*-Operator bindet. Der *lac*-Operator ist ein regulatorischer DNA-Abschnitt, der durch Bindung des *lac*-Repressors die Expression des *downstream* gelegenen Gens inhibiert. In diesem speziellen Fall handelt es sich um die *CLU*-cDNA, die in das Expressionsplasmid pQE-30 inkloniert wurde und ebenfalls unter der Kontrolle eines *lac*-Operators steht. Das Glykosid Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) vermittelt die Abspaltung des *lac*-Repressors vom *lac*-Operator, sodass die Expression der cDNA voranstehen kann. Die mit pQE-30/*CLU*-cDNA transformierten Bakterien bilden daraufhin rekombinantes Protein, das einen C-terminalen His-Tag trägt (vgl. 3.4.7) und entsprechend über Ni-Affinitätschromatographie (vgl. 3.5.8) aufgereinigt werden kann.

Die in dieser Arbeit aufzureinigenden *CLU*-Isoformen bildeten innerhalb der Bakterien sogenannte *inclusion bodies* aus, was wohl auf den hydrophoben Charakter dieser Proteine zurückzuführen ist. Für die Extraktion solcher *inclusion bodies* müssen hochmolare Harnstoffpuffer eingesetzt werden.

Material und Reagenzien

Dithiothreitol (DTT)-Lösung: 2 M DTT [Roth] in mpH₂O

IPTG-Lösung: 1 M IPTG [Roth] in mpH₂O

Lysis/Equilibration/Wash (LEW)-Puffer: Vgl. 3.5.8

LEW-T-U-Puffer: 2 % (v/v) Polysorbat 20 (Tween® 20) [Roth]
2 M Harnstoff [Roth]
in LEW

LEW/Harnstoff-Puffer: 8 M Harnstoff [Roth] in LEW

Lysozym-Lösung: 10 mg/ml Lysozym [Roth] in LEW-Puffer

Material für Kolonie-Blot: Vgl. F2-Praktikum Christina Dal Magro

Kolonie-Blot

Chemisch kompetente SG13009-Bakterien wurden mit *CLU*-cDNAs transformiert (vgl. 3.2.1, 8.3.3), die entweder für die *CLU*-Isoform *CLU*₂₁₋₄₄₉ oder für *CLU*₃₄₋₄₄₉ codieren. Da sich so eine Mischkultur aus Bakterien ergibt, die das rekombinante Protein unterschiedlich stark exprimieren, musste im nächsten Schritt ein Einzelklon isoliert werden. Dies geschah über einen sogenannten Kolonie-Blot. Auf eine, mit rekombinanten SG13009 Bakterien bewachsene LB-Agarplatte (+ 400 μg/ml Ampicillin; + 50 μg/ml Kanamycin), wurde eine kreisrunde Nitrocellulosemembran gelegt und so ein Abklatsch der Platte gemacht. Die Membran wurde für 1 h auf einer frischen LB-Agarplatte (1 mM IPTG) inkubiert und konnte anschließend u.a. mit SDS-haltigen Puffern behandelt werden um schließlich einen Proteinnachweis analog zu einem Western-Blot durchführen zu können (vgl. 3.5.3). Auf diese Weise wurden *CLU*₂₁₋₄₄₉- bzw. *CLU*₃₄₋₄₄₉-überexprimierende Einzelklone isoliert und konserviert (SG13009-*CLU*₂₁₋₄₄₉ und

SG13009-CLU₃₄₋₄₄₉). Die Methode des Kolonie-Blots ist in anderen Arbeiten detailliert beschrieben (vgl. F2-Praktikum Christina Dal Magro).

Induktion der rekombinanten Proteinexpression

50 ml Übernachtskultur (+200 µg/ml Ampicillin; +25 µg/ml Kanamycin) SG13009-CLU₂₁₋₄₄₉ oder SG13009-CLU₃₄₋₄₄₉ wurden zu gleichen Teilen auf je 100 ml frisches, antibiotikahaltiges LB Medium verteilt, sodass sich zwei identische Ansätze von je 125 ml ergaben. Nach einer Stunde Wachstum wurde die OD_{600nm} bestimmt, die nun im optimalen Fall zwischen 0,5 und 0,6 lag. Es konnte dann für eine weitere Stunde 1 mM IPTG zugesetzt werden. In dieser Zeit fand die Expression des rekombinanten Proteins statt. Im letzten Schritt wurden die Zellen für 10 min bei 4.600 × g pelletiert und das LB-Medium verworfen. Die identischen Ansätze wurden zusammen in 5 ml LEW-Puffer resuspendiert.

Isolation von inclusion bodies

Alle folgenden Zentrifugationsschritte fanden für 30 min bei 20.000 × g in 2 ml Eppis statt. Alle folgenden Sonifikation wurden in einem Schraubdeckelglaschen mit dem *Branson sonifier* und einem spitzen Aufsatz durchgeführt. Es wurde immer 3 × 4 min sonifiziert und dazwischen jeweils 1 min auf Eis gekühlt. Die Einstellungen am Gerät waren *duty cycle* „2“ und *output* „4“.

Zu den 5 ml Bakteriensuspension wurden 1 mg/ml Lysozym zugegeben und der Ansatz unter Schütteln für 30 min bei 4°C inkubiert. Es kamen 25 mM DTT hinzu, worauf der Ansatz sonifiziert und abzentrifugiert werden konnte. Nach Separation des Überstands (= Extrakt 1) musste das Pellet zweimal kurz mit LEW gewaschen und anschließend in 5 ml LEW-T-U-Puffer resuspendiert werden. Es folgten wieder der Sonifikations- sowie der Zentrifugationsschritt. Der Überstand (= Extrakt 2) wurde wieder separiert, das Pellet kurz mit LEW-T-U-Puffer gewaschen und die geschilderte Prozedur wiederholt, sodass man schließlich Extrakt 3 erhielt. Das Pellet enthielt nun fast ausschließlich die *inclusion bodies*. Diese konnten in 1 ml LEW/Harnstoff-Puffer resuspendiert werden. Nach einem abschließenden Sonifikations- und Zentrifugationsschritt erhielt man ein Extrakt, indem die in den *inclusion bodies* enthaltenen Proteine (i.e. CLU₂₁₋₄₄₉- bzw. CLU₃₄₋₄₄₉) gelöst vorlagen. Dieses konnte nun wie unten geschildert isoliert werden (vgl. 3.5.8).

3.3 RNA-Analytik

3.3.1 RNA-Präparation

Gesamtzell-RNA wurde aus Zellkulturen (hier: HEK-293, PC-3, MCF-7 und Caco-2) mit Hilfe eines speziellen Extraktionskits gewonnen. Über eine erste Chromatographiesäule wurde genomische DNA abgetrennt, über eine zweite schließlich die RNA aufgereinigt. Die so extrahierte RNA wurde im Anschluss photometrisch quantifiziert und konnte für Erststrangsynthesen eingesetzt werden. Nach Aufschluss der Zellen muss eine Kontamination mit allgegenwärtigen Ribonukleasen (RNasen), die die Hydrolyse von RNA katalysieren, vermieden werden. Zwar werden RNase Inaktivatoren wie Diethylpyrocarbonat (DEPC) eingesetzt, trotzdem sollte in besonderem Maße auf eine saubere Arbeitsweise geachtet werden.

Material und Reagenzien

DEPC-H₂O: 0,01 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) in mpH₂O, autoklaviert
 innuPREP RNA-Mini-Kit [Analytik Jena]

Durchführung

Die Zellen wurden aus einer konfluent bewachsenen 6-Well Platte trypsinisiert, in PBS gesammelt und schonend bei 200×g abzentrifugiert. Aus dem Pellet wurde die RNA mit dem innuPREP RNA-Mini-Kit nach Herstellerangaben extrahiert. Die Gesamtzell-RNA konnte im letzten Schritt mit 30µl (Caco-2), 50µl (MCF-7, PC-3) oder 100µl DEPC-H₂O (HEK-293) von der Säule eluiert werden. Daran schloss sich in allen Fällen eine photometrische Quantifizierung an (vgl. 3.3.2).

3.3.2 Quantifizierung von RNA-Lösungen

Die in Nukleinsäuren vorhandenen Nukleobasen sind zyklische Ringsysteme, die monochromatisches Licht bei 260 nm absorbieren. Das Ausmaß der Absorption (auch optische Dichte genannt, OD) hängt von der Konzentration der Lösung, deren Extinktionskoeffizienten und der Strecke ab, die das Licht durch die Lösung nehmen muss (Bouguer-Lambert-Beersches Gesetz). Da i.d.R. die Konzentration die einzige Unbekannte ist, lässt sich der Sachverhalt wie folgt vereinfachen:

$$c(\text{RNA}) = OD_{260\text{nm}} \cdot 40 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$c(\text{DNA}) = OD_{260\text{nm}} \cdot 50 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Neben der OD_{260nm} wurden die OD_{280nm}, die OD_{230nm} und die OD_{340nm} bestimmt. Diese Werte gaben lediglich Aufschluss über die Reinheit einer Nukleinsäurelösung. Die Messungen in dieser Arbeit zeigten stets eine hohe Reinheit an. Es wird nicht weiter auf diese Werte eingegangen. Zur Quantifizierung wurde je 2 µl Nukleinsäurelösung in 198 µl mpH₂O verdünnt und die Absorptionen dieser Lösung im Duplikat bestimmt. Gemessen wurde mit dem BioPhotometer plus, das neben allen wichtigen Absorptionen auch alle relevanten Daten wie Konzentration und Reinheitswerte direkt ausgibt.

3.3.3 Erstrangsynthese

Unter Erstrangsynthese versteht man die reverse Transkription (RT) von RNA in DNA. Diese Reaktion wird von dem retroviralen Enzym Reverse Transkriptase katalysiert. Der Erststrang ist also ein Hybrid aus einem RNA-Molekül und dem dazu komplementären cDNA-Molekül (engl. *complementary DNA*). In dieser Arbeit wurde als Matrize stets Gesamtzell-RNA (vgl. 3.3.1) eingesetzt. Um die RT ausschließlich von mRNAs zu ermöglichen, wird als Primer für die Reverse Transkriptase der sogenannte oligo-dT-Primer eingesetzt, ein Thymin-Oligomer. In Ausnahmefällen wurden jedoch auch Genspezifische Primer verwendet, sodass nur eine spezifische mRNA in cDNA umgeschrieben wird (vgl. 3.4.6.3). Im Folgenden wird nur der Ansatz mit oligo-dT-Primer ausgeführt, wobei dieser durch jeden beliebigen Primer ersetzt werden kann.

Material und Reagenzien

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), 10 mM [Thermo Scientific]

Oligo-dT-Primer: poly d(T)12-18 Primer [Roth], 100 μ M

Reverse Transkriptase: *M-MuLV Reverse Transcriptase* [Thermo Scientific]

Durchführung

In ein 0,5 ml Eppi wurden 5 μ g Gesamtzell-RNA (in mpH₂O) vorgelegt und anschließend mit der Vakuumzentrifuge komplett eingengt. Anschließend wurde die eingengte RNA in 11 μ l mpH₂O aufgenommen und 1 μ l oligo-dT-Primer zugesetzt. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei 65°C um Sekundärstrukturen in der RNA zu denaturieren und eine kurze Inkubation auf Eis. Danach wurden 4 μ l Reverse Transkriptase Puffer (5 \times) und 2 μ l dNTPs zugesetzt. Nach kurzer Erwärmung auf 42°C wurde schließlich 1 μ l Reverse Transkriptase zugegeben und mit dem Ansatz gut vermischt. Die Reaktion erfolgte bei 42°C für 60 min. Anschließend konnte die Reverse Transkriptase für 15 min bei 72°C inaktiviert werden. Der Reaktionsansatz wurde dann auf insgesamt 250 μ l mit mpH₂O aufgefüllt, sodass sich eine Endkonzentration von 20 ng/ μ l an revers transkribierter RNA (Erststrang) einstellte.

3.4 DNA-Analytik

3.4.1 Quantifizierung von DNA-Lösungen

Die Quantifizierung von DNA-Lösungen wurde analog zur Quantifizierung von RNA-Lösungen durchgeführt und lediglich die für DNA geltenden Umrechnungsfaktoren berücksichtigt (vgl. 3.3.2).

3.4.2 Sequenzierung von DNA-Molekülen nach Sanger

Das von Frederick Sanger entwickelte Kettenabbruchverfahren ist die am häufigsten verwendete Methode zur Ermittlung einer, bis ca. 1500 Basenpaare (bp) langen DNA-Sequenz ausgehend von einem spezifischen Primer. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sequenzierungen (Extended HotShot) wurden von der Firma SeqLab in Göttingen übernommen und lieferten optimale Ergebnisse. Dazu wurden 5 μ l DNA-Lösung, welche idealerweise 500ng DNA enthalten sollte, in ein 0,2ml Eppi vorgelegt und mit 2 μ l Primerlösung (10 μ M) versetzt. Die Proben wurden auf dem Postweg zu SeqLab gesendet und die in Auftrag gegebenen Sequenzierungen i.d.R. innerhalb eines Werktages durchgeführt.

3.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-haltige Proben wie Plasmidlösungen, PCR-Lösungen oder Oligonukleotide wurden mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese analysiert (analytische Agarosegele). Das Polysaccharid Agarose stellt im polymerisierten Zustand ein molekulares Sieb dar, durch das nach Anlegen einer Spannung DNA-Moleküle der Größe nach aufgetrennt werden können. Die negativ geladene DNA wandert dabei stets zur Anode. In den hier durchgeführten Versuchen wurde der Farbstoff Ethidiumbromid (EtBr) zur Visualisierung der DNA eingesetzt. Zur weiteren Verwendung können die so erhaltenen DNA-Fragmente auch wieder aus dem Agarosegel extrahiert werden (präparative Agarosegele).

Material und Reagenzien

DNA-Gelladepuffer (6×): 10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) (pH 7,6)
 0,15% (w/v) Orange G
 0,03% (w/v) Xylen Cyanol FF
 60 mM EDTA
 60% (v/v) Glycerin
 in mpH₂O

DNA-Größenstandards: *GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder* [Thermo Scientific]
MassRuler™ Express Forward DNA Ladder Mix, ready-to-use [Thermo Scientific]
DNA Molecular Weight Marker VII [Roche]

Ethidiumbromid (EtBr)-Lösung: 0,07 % (w/v) EtBr in mpH₂O

Gelextraktionskit: innuPREP Gel Extraction Kit [Analytik Jena]

SeaKem® LE Agarose [Lonza]

TAE-Puffer (50 ×): 50 mM EDTA
 2 M Tris
 1 M Eisessig
 in mpH₂O

Tris-Puffer: 10 mM Tris (pH 8,5) in mpH₂O

Durchführung der Elektrophorese

Die gewünschte Menge an Agarose (vgl. Tab. 3.2) wurde in einem Erlenmeyerkolben eingewogen. Danach wurde mit 1 × TAE-Puffer auf 50 ml für große und 25 ml für kleine Gelkammern aufgefüllt und der Kolben gewogen. Es wurde ca. 50 ml mpH₂O zugegeben und die Agaroselösung für mehrere Minuten in der Mikrowelle aufgekocht. Nach dem Aufkochen sollte das Ausgangsgewicht wieder erreicht sein bzw. etwaiger Gewichtsverlust durch mpH₂O kompensiert werden. Anschließend wurde 1 µl/ml Agarosegel EtBr-Lösung zugesetzt. Das Gel wurde entweder in 13 cm x 10 cm (große) oder 10 cm x 5 cm (kleine) Pufferkammern zwischen zwei *Spacer* gegossen, sodass es eine Dicke von ca. 1 cm hatte. Die eingesetzten Gelkämme besaßen 7, 12 oder 14 Taschen. Nach 20 minütigem Aushärten des Gels wurde die Pufferkammer mit 1 × TAE-Puffer gefüllt und das Gel leicht überschichtet.

Tab. 3.2: Auftrennungsbereiche von DNA-Fragmenten bei unterschiedlicher Agarosekonzentration. Aufgeführt sind die während der Arbeit verwendeten Agarosekonzentrationen. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde die Agarosekonzentration von Versuch zu Versuch variiert.

Agarosekonzentration (w/v)	Anwendungsbereich
2 %	≤ 400 bp
1,5 %	≤ 600 bp
1 %	≤ 2.000 bp
0,7 %	≤ 10.000 bp

Je nach Volumen der aufzutragenden DNA-Lösung musste 6× DNA-Gelladepuffer zugesetzt werden, sodass dieser in der Endkonzentration 1× vorlag. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde ein geeigneter DNA-Größenstandard gewählt. Die eingesetzten Volumina sind Tab. 3.3 zu entnehmen. Die eigentliche Gelelektrophorese fand bei einer fixierten Spannung von 80 V für 45–60 min statt. Anschließend konnten die fluoreszierenden DNA-Banden mit der AlphaImager Geldokumentation fotografiert werden.

Gelextraktion aus Agarosegelen

Gelextraktionen wurden wie im Protokoll des innuPREP Gel Extraction Kits angegeben durchgeführt, wobei für Gelstücke >300 mg die Menge an *Gel Solubilizer* und *Binding Optimizer* extrapoliert wurde. Die Elution der DNA erfolgte stets mit Tris-Puffer anstelle des mitgelieferten Elutionspuffers.

Tab. 3.3: Präparation der DNA-Größenstandards für Agarose-Gelelektrophorese. Die Bandenmuster und Fragmentgrößen der einzelnen Standards sind dem Anhang zu entnehmen. Ausführliche Information finden sich in den Herstellerangaben.

DNA-Größenstandard	Eingesetzte Menge	Volumen Gelladepuffer
<i>GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder</i>	500 ng (\pm 1 μ l); ad 10 μ l mit mpH ₂ O	2 μ l
<i>MassRuler™ Express Forward DNA Ladder Mix</i>	282,5 oder 565 ng (\pm 5 μ l oder 10 μ l)	-
<i>DNA Molecular Weight Marker VII</i>	750 ng (\pm 3 μ l); ad 10 μ l mit mpH ₂ O	2 μ l

3.4.4 Restriktion und Dephosphorylierung von DNA

Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme) spalten doppelsträngige DNA an definierten Stellen. Festgelegt werden diese meist durch eine palindromische Sequenz von vier, sechs oder acht Nukleotiden, jedoch sind auch Restriktionsenzyme bekannt, die an nicht palindromische Sequenzen binden. Der Schnitt erfolgt i.d.R. innerhalb der Erkennungssequenz und produziert entweder 5'- bzw. 3'-überhängende Enden (engl. *sticky ends*) oder glatte Enden (engl. *blunt ends*). Auch hier sind Ausnahmen bekannt, d.h. Restriktionsenzyme, welche nicht innerhalb, sondern *upstream* oder *downstream* der Erkennungssequenz schneiden. Das Enzym Alkalische Phosphatase kann im Anschluss an Restriktionen eingesetzt werden, um die freie 5'-Phosphatgruppe der DNA zu entfernen (Dephosphorylierung). Das macht besonders bei Plasmiden Sinn, die nur mit einem Restriktionsenzym behandelt wurden, aber anschließend für eine Ligation eingesetzt werden sollen. Nach Dephosphorylierung können sie nicht mehr mit sich selbst ligieren (vgl. 3.4.5)

Material und Reagenzien

Alkalische Phosphatase: FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase [Thermo Scientific]

DNA: PCR-Fragmente, Plasmide, Hybridierte Oligonukleotide

Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme) [Thermo Scientific]

Restriktionspuffer, 10 \times [Thermo Scientific]

Durchführung

Restriktionen wurden in 1,5 ml Eppis angesetzt. Dabei hat sich bewährt 1 μ g DNA-Template in einem Gesamtvolumen von 50-100 μ l zu restringieren bzw. für größere DNA-Mengen das Volumen entsprechend zu erhöhen. Ansonsten wurde exakt nach den Herstellerangaben für das jeweilige Restriktionsenzym verfahren. Bei Bedarf wurden auch Doppelrestriktionen angesetzt, d.h. zwei Restriktionsenzyme zusammen in einen Ansatz gegeben. Die dazu optimierten Parameter sind der Internetseite *Double Digest* (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest/>) zu entnehmen. War

eine Dephosphorylierung vorgesehen, wurde anschließend direkt 1 µl AP/100 µl Restriktionsansatz zugesetzt. Tab. 3.4 führt exemplarisch zwei gängige Restriktionsansätze auf. Abschließend wurden die gewünschten Restriktionsfragmente mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 3.4.1) aufgereinigt.

Tab. 3.4: Exemplarische Ansätze für Einzel- bzw. Doppelrestriktion von Plasmiden. Die angegebenen Restriktionspuffer sind die für das entsprechende Restriktionsenzym vom Hersteller vorgeschlagenen. Bei Verwendung anderer Restriktionsenzyme ändert sich auch der zugehörige Puffer. Nähere Angaben sind den Gebrauchsanweisungen des Herstellers zu entnehmen bzw. auf der Internetseite *Double Digest* nachzulesen.

Einzelrestriktion		Doppelrestriktion	
Reagenz	Menge	Reagenz	Menge
mpH ₂ O	ad 100 µl	mpH ₂ O	ad 100 µl
Restriktionspuffer R (10 ×)	10 µl	Restriktionspuffer <i>Bam</i> HI (10 ×)	10 µl
Plasmid	2 µg	Plasmid	2 µg
Restriktionsenzym <i>Hind</i> III	1 µl	Restriktionsenzym <i>Hind</i> III	2 µl
		Restriktionsenzym <i>Bam</i> HI	1 µl
2 h Inkubation bei 37°C			
Optional: + 1 µl Alkalische Phosphatase, 15 min Inkubation bei Raumtemperatur			

3.4.5 Ligation kompatibler DNA-Enden

Das Enzym DNA-Ligase katalysiert, unter ATP-Verbrauch, die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem freien 5'-Phosphat und einem freien 3'-OH Ende linearer DNA-Stränge (kompatible Enden). Auf diese Weise können die DNA-Stränge miteinander verbunden werden. Die Hauptanwendung der Ligation während dieser Arbeit war das Verbinden von *sticky ends*, die durch vorrausgehende Restriktion entstanden. Dies geschah insbesondere beim Klonieren von Integraten (z.B. cDNA-Fragmente) in Plasmidvektoren (vgl. 3.4.7). Die partiellen, zueinander komplementären Einzelstränge der *sticky ends* garantieren dabei eine hohe Spezifität der Ligation, vorausgesetzt sie wurden mit demselben Restriktionsenzym erstellt (vgl. 3.4.4). Zwar können auch *blunt ends* per Ligation verbunden werden, dies sollte aber, wenn möglich, umgangen werden, da in diesem Fall keine Spezifität mehr gegeben ist.

Die im Fall von cDNA/Plasmid-Ligationen eingesetzten linearen Plasmide waren stets dephosphoryliert. Zwar kann dann nur ein Einzelstrang zwischen Integrat und Plasmid eine Phosphodiesterbindung ausbilden, dies ist jedoch ausreichend, um ein zirkuläres, transformierbares Plasmid zu erhalten. Der gesamte Reaktionsansatz wurde nach abgeschlossener Ligation in Bakterien transformiert (vgl. 3.2.1) und per Kolonie-PCR die so erhaltenen Einzelklone analysiert (vgl. 3.4.6.2).

Material und Reagenzien

DNA: restringierte PCR-Fragmente
 restringierte Plasmide (dephosphoryliert)
 restringierte hybrdisierte Oligonukleotide

 T4 DNA Ligase mit Puffer[Thermo Scientific]

Polyethylenglycol (PEG) 4000: 50 % (w/v) PEG 4000 in mpH₂O

Ligasepuffer, 10 × [Thermo Scientific]

Durchführung

Ligationsansätze wurden in einem Reaktionsvolumen von 10 µl angesetzt. Im Fall von cDNA/Plasmid-Ligationen war es dabei entscheidend, ein optimales molares Plasmid/Integrat Verhältnis einzuhalten (1:3 für *sticky ends*; 1:7 für *blunt ends*). Als fixe Plasmidmenge wurden 30 ng eingesetzt. Somit berechnete sich die Menge an Integrat nach folgender Formel:

$$\text{sticky ends: } m(\text{Integrat})[\text{ng}] = 3 \cdot m(\text{Plasmid})[\text{ng}] \cdot \frac{\text{Anzahl bp (Integrat)}}{\text{Anzahl bp (Plasmid)}}$$

$$\text{blunt ends: } m(\text{Integrat})[\text{ng}] = 7 \cdot m(\text{Plasmid})[\text{ng}] \cdot \frac{\text{Anzahl bp (Integrat)}}{\text{Anzahl bp (Plasmid)}}$$

Überschritt die Menge an Integrat dabei 10 µl, wurde das benötigte Volumen komplett eingeeengt. Speziell bei *blunt end* Klonierungen kam PEG 4000 mit zum Ligationsansatz. Dies setzt die Diffusionsrate herab und senkt somit die Wahrscheinlichkeit, dass mehrere Integrate in ein Plasmidmolekül ligiert werden. Die Ligation selbst wurde in allen Fällen bei Raumtemperatur für min. 1 h durchgeführt. Tab. 3.5 listet exemplarisch Ansätze für cDNA/Plasmid-Ligationen von *sticky ends* und *blunt ends* auf.

Tab. 3.5: Exemplarische Ansätze für cDNA/Plasmid-Ligationen. Die Menge an Integrat wurde gemäß oben stehender Formel berechnet. Es ist zu beachten, dass die Reaktionsdauer min. 1 h für *sticky end* Ligationen betrug, für *blunt ends* jedoch längere Inkubationszeiten von min. 4 h gewählt wurden. Inkubationen bis zu 24 h beeinträchtigten den Erfolg der Ligation nicht.

<i>Sticky ends</i>		<i>Blunt ends</i>	
Reagenz	Menge	Reagenz	Menge
mpH ₂ O	ad 10 µl	mpH ₂ O	ad 10 µl
T4 DNA Ligasepuffer (10 ×)	1 µl	T4 DNA Ligasepuffer (10 ×)	1 µl
Plasmid (restringiert, dephosphoryliert, 30 ng/µl)	1 µl	Plasmid (restringiert, dephosphoryliert, 30 ng/µl)	30 ng
Integrat	x µl	Integrat	x µl
		PEG 4000	1 µl
min. 1 h Inkubation bei Raumtemp.		min. 4 h Inkubation bei Raumtemp.	

3.4.6 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR) dient der Vervielfältigung (Amplifikation) spezifischer DNA-Fragmente. Dabei werden thermostabile DNA-Polymerasen (z.B. *Taq* oder *Pfu*) aus thermophilen Prokaryoten eingesetzt, die eine zügige und exponentielle Amplifikation der DNA gewährleisten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden als DNA-Matrizen, d.h. Ausgangsmoleküle, meist Plasmide oder Erststränge eingesetzt. Im speziellen wurden präparative PCRs, Kolonie-PCRs, 5'-RACE-PCRs, *in vitro* Mutagenesen, sowie semi-quantitative und quantitative PCRs durchgeführt, deren Ansätze im Folgenden aufgeführt sind.

3.4.6.1 Präparative PCR

Präparative PCRs dienen der Herstellung großer Mengen an DNA speziell für Klonierungen (vgl. 3.4.7). Dafür wurde das Enzym *Pfu* DNA-Polymerase eingesetzt. Dieses besitzt eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die wiederum eine sehr geringe Fehlerrate während der Amplifikation garantiert.

Material und Reagenzien

DNA-Matrizen: Erststrang (20 ng/μl oligo-dT revers transkribierte RNA)
 Plasmid (1 ng/μl)
 PCR-Fragment (ca. 20 ng/μl)

 dNTPs, 10 mM [Thermo Scientific]

Pfu DNA-Polymerase [Thermo Scientific]

Pfu-Puffer: *Pfu* DNA Polymerase Puffer +MgCl₂ [Thermo Scientific]

Primer: *Forward*- und *reverse*-Primer jeweils 10 μM, Primersequenzen vgl. 8.2

Durchführung

Der gängige Ansatz für eine präparative PCR ist in Tab. 3.6 wiedergegeben. Die eigentliche Reaktion fand im Thermocycler T_{Personal} statt. Im Anschluss an die PCR wurden die gewünschten DNA-Fragmente mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt (vgl. 3.4.1).

Tab. 3.6: Ansatz und Programm für präparative PCRs. Pro PCR wurde jeweils eine der aufgeführten Matrizen verwendet. Die Annealingtemperatur (50-60°C) wurde den Schmelztemperaturen der Primer, die wiederum dem vom Hersteller mitgelieferten Synthesebericht zu entnehmen waren, angepasst.

PCR-Ansatz		PCR-Programm	
Reagenz	Menge	Temperatur	Zeit
mpH ₂ O	ad 50 μl	95°C	3 min
<i>Pfu</i> -Puffer	5 μl	95°C	30 s
<i>Forward</i> -Primer	2,5 μl	50-60°C	30 s
<i>Reverse</i> -Primer	2,5 μl	72°C	2 min/1 kb
dNTPs	1 μl	72°C	5 min
Matrize	100 ng Erststrang/ 1 ng Plasmid/ 1 ng PCR-Fragment	15°C	-
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	1 μl		

3.4.6.2 Kolonie-PCR

Um eine Vorauswahl erfolgreich transformierter Bakterienkolonien (vgl. 3.2.1) im Hinblick auf korrektes Plasmidkonstrukt treffen zu können, wurde die sogenannte Kolonie-PCR angewendet. Dazu wurden die zur Weiterkultur von LB-Agarplatten gepickten Bakterien kurz in 30 μl mpH₂O resuspendiert. Ein Teil dieser Suspension, welche u.a. das Plasmid des entsprechenden Bakterienklons enthält, konnte als Matrize für eine PCR eingesetzt werden. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass das entstehende Produkt eine der Klonierungsschnittstellen überspannt. In Ausnahmefällen musste jedoch die komplette *multiple cloning site* amplifiziert werden, besonders dann, wenn das Integrat sehr kurz war.

Material und Reagenzien

DNA-Matrize: Gepickte Bakterien in Suspension (ca. 30 μ l mpH₂O)

Primer: *Forward* und *reverse*-Primer jeweils 10 μ M, Primersequenzen vgl. 8.2

Taq Hot Start Mix: *Maxima Hot Start Green PCR Master Mix* [Thermo Scientific]

Durchführung

Der Ansatz für die Kolonie-PCR ist in Tab. 3.7 wiedergegeben. Die eigentliche Reaktion fand im Thermocycler T_{Personal} statt. Bakterienklone, von denen kein korrektes PCR-Fragment amplifiziert werden konnte, wurden aussortiert. Im Zweifelsfall wurde die Kolonie-PCR mit anderen Primern wiederholt.

Tab. 3.7: Ansatz und Programm für Kolonie-PCRs. Die Annealingtemperatur (50-60°C) wurde den Schmelztemperaturen der Primer angepasst (vgl. Tab. 3.6).

PCR-Ansatz		PCR-Programm	
Reagenz	Menge	Temperatur	Zeit
mpH ₂ O	3 μ l	95°C	15 min
<i>Taq Hot Start Mix</i>	10 μ l	95°C	30 s
<i>Forward</i> -Primer	1 μ l	50-60°C	30 s
<i>Reverse</i> -Primer	1 μ l	72°C	30 s/1 kb
Bakteriensuspension	5 μ l	72°C	5 min
		15°C	-

} 25 Zyklen

3.4.6.3 5'-Rapid Amplification of cDNA-ends

Um die exakte Sequenz am 5'-Bereich einer spezifischen mRNA zu erfassen, bietet sich die *5'-Rapid Amplification of cDNA-ends* (5'-RACE) an. Diese Methode beinhaltet neben einer PCR auch eine RT mit anschließendem *Cytosin(C)-Tailing*. Bei letzterem wurde das Enzym Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) verwendet, das Nukleotide (hier: dCTP) spezifisch an das 3'-Ende von DNA-Strängen anfügt. Da sich nun das 5'-Ende der cDNA amplifizieren lässt, kann ausreichend Matrize für eine Sanger-Sequenzierung hergestellt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die Clusterin-mRNA mit Hilfe der 5'-RACE untersucht.

Material und Reagenzien

Desoxycytosin (dCTP), 2 mM [Thermo Scientific]

Enzyme: *Maxima Hot Start Green PCR Master Mix* [Thermo Scientific]

M-MuLV Reverse Transcriptase [Thermo Scientific]

Terminal Transferase (TdT) [Thermo Scientific]

Gesamtzell-RNA: aus HEK-293, PC-3, MCF-7, Caco-2, HeLa, Hep G2, EA.hy926

DNA-Säulchen: *High Pure PCR Product Purification Kit* [Roche]

Primer (forward): Abridged Anchor Primer (AAP)
Abridged Universal Amplification Primer (AUAP)
jeweils 10 μ M

Primer (reverse): CLU-GSP I; CLU-GSP II; CLU-GSP III (vgl. Tab. 8.3)
jeweils 10 μ M

Tailing Puffer: 50 mM Tris (pH 8,4 mit HCl)
125 mM KCl
7,5 mM MgCl₂
im mpH₂O

Tris-Puffer: 10 mM Tris in mpH₂O
mit HCl auf pH 8,5

Durchführung

Der gesamte Ablauf der 5'-RACE ist in Abb. 3.1 schematisiert.

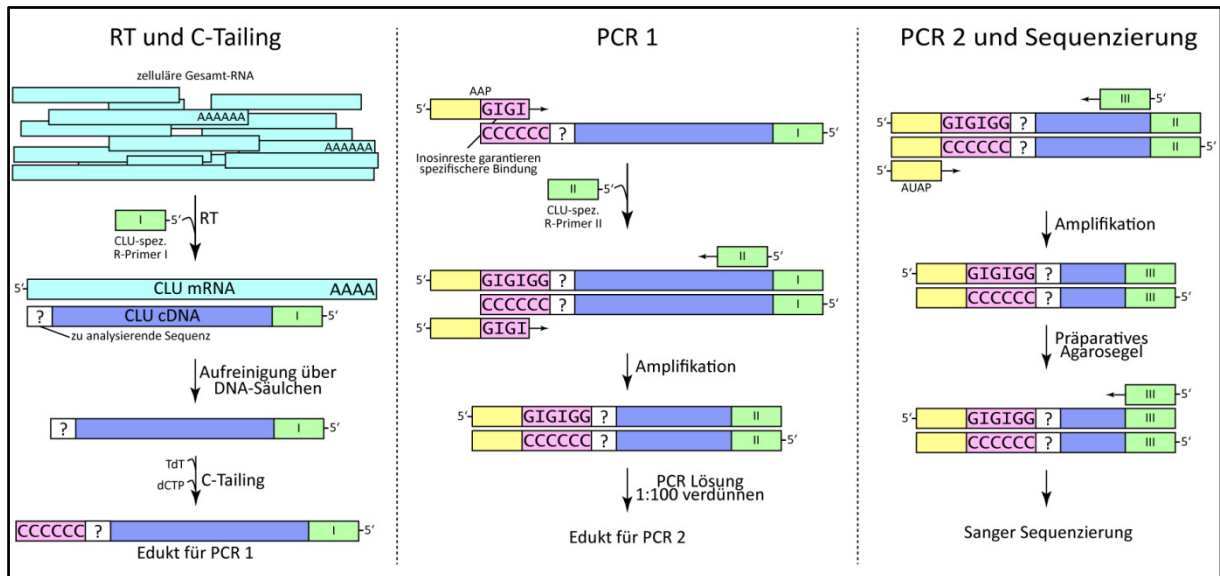


Abb. 3.1: Schematischer Ablauf einer 5'-RACE. Die präparierte Gesamt-RNA wird mit Hilfe eines CLU-spezifischen R-Primer (GSP I) revers transkribiert. An die so erhaltene CLU-cDNA wird mit Hilfe der TdT am 3'-Ende ein poly-C-Rest angefügt (*C-Tailing*). Die CLU-cDNA wird im Anschluss zwei aufeinander folgenden PCRs unterzogen (PCR 1 und PCR 2). Hier werden verschiedene CLU-spezifische R-Primer verwendet (GSPs II und III), sowie der AAP, welcher den *C-Tail* bindet und einen Adapter an die cDNA anfügt bzw. der AUAP, welcher an den Adapter bindet. So erhält man am Ende ein distinktes DNA-Fragment, das den kompletten 5'-Bereich der CLU-mRNA (cDNA) aufweist. Dieser kann dann per Sanger-Sequenzierung erfasst werden.

Im ersten Schritt musste ein Erststrang aus Gesamtzell-RNA hergestellt werden (vgl. 3.3.2). Dabei wurde lediglich die CLU-mRNA revers transkribiert, d.h. es kam nicht der oligo-dT-Primer zum Einsatz, sondern der CLU-spezifischer R-Primer (GSP I). Dieser wurde nur 10 µM konzentriert eingesetzt. Da es essentiell ist, überschüssige Primer und dNTPS vor dem *C-Tailing* zu entfernen, wurde der fertig synthetisierte Erststrang mit mpH₂O auf 100 µl aufgefüllt, per DNA-Säulchen aufgereinigt und in 50 µl Tris-Puffer eluiert. Das *C-Tailing* selbst wurde wie in Tab. 3.8 gezeigt durchgeführt.

Nach abgeschlossenem *C-Tailing* wurde die erste PCR zur Amplifikation des 5'-Endes der CLU-cDNA durchgeführt (PCR 1). Als Primer wurden hier der GSP II und der AAP eingesetzt. Letzter enthält einen Adapter, sowie eine alternierende Abfolge aus Guanin- und Inosinresten, welche, im Vergleich zu Homo-Guanin-Sequenzabfolgen, eine verminderte Affinität zu Cytosin besitzen. Hierdurch wird sichergestellt, dass nur ein *Annealing* am *C-Tail* stattfindet, nicht jedoch an internen, C-reichen Abschnitten auf der cDNA. Der Erfolg der PCR 1 wurde mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 3.4.1) überprüft und anschließend ein Aliquot 1:100 mit mpH₂O verdünnt.

Tab. 3.8: Ansatz für das C-Tailing. Die Inkubationsschritte wurden im Thermocycler T_{Personal} durchgeführt.

Reagenz	Eingesetzte Menge
mpH ₂ O	6,5 µl
Tailing Puffer	5 µl
dCTP	2,5 µl
Aufgereinigter Erststrang	10 µl
→ 3 min 94°C, 1 min auf Eis	
TdT	1 µl
→ 10 min 37°C, 10 min 65°C	

Diese Verdünnung diente als Edukt für den zweiten Amplifikationsdurchlauf (PCR 2). Primer waren hier der AUAP, welcher an den durch AAP eingebrachten Adapter hybridisiert und einer von drei verfügbaren GSP III. Entsprechende Ansätze von PCR 1 und PCR 2 sowie das dazugehörige PCR-Programm finden sich in Tab. 3.9. Die abgeschlossene PCR 2 wurde mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 3.4.1) aufgereinigt. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden schließlich unter Verwendung des jeweiligen GSP III per Sanger-Sequenzierung (vgl. 3.4.2) analysiert.

Tab. 3.9: Ansätze und Programm für PCR 1 und PCR 2. Für PCR 2 wurden mehrere Ansätze durchgeführt, wobei jeweils ein anderer von insgesamt drei verfügbaren CLU-spezifischen R-Primer III verwendet wurde. Das PCR Programm war für beide PCRs dasselbe.

PCR-Ansätze			PCR-Programm	
Reagenz	Menge		Temperatur	Zeit
mpH ₂ O	10 µl		95°C	15 min
Taq Hot Start Mix	25 µl		95°C	30 s
PCR 1 CLU-spez. R-Primer II	5 µl		55°C	30 s
AAP	5 µl		72°C	30 s
C-tailed cDNA	5 µl		72°C	5 min
mpH ₂ O	18 µl		15°C	-
Taq Hot Start Mix	25 µl			
PCR 2 CLU-spez. R-Primer III	1 µl			
AUAP	1 µl			
PCR 1 (1:100)	5 µl			

3.4.6.4 "Site-directed" in vitro Mutagenese

Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine Reihe von cDNAs konstruiert, die eine oder mehrere Punktmutationen aufweisen. Eingefügt wurden diese gezielt durch die "Site-directed" in vitro Mutagenese. Diese PCR-Methode bedient sich Primern, die für die entsprechende Position das gewünschte *mismatch* tragen. Um eine Mutation an einer Position einzufügen sind insgesamt vier verschiedene Primer und drei separate PCRs notwendig. Als Matrize für die PCR wurden bereits klonierte cDNA/pcDNA6-Plasmide verwendet. Eine Übersicht der punktmultierten cDNAs sowie der Primer, mit deren Hilfe sie synthetisiert wurden, ist dem Anhang zu entnehmen (vgl. Tab. 8.2).

Material und Reagenzien

DNA-Matrize: cDNA/pcDNA6-Plasmide (1 ng/μl)

dNTPs, 10 mM [Thermo Scientific]

Pfu DNA Polymerase [Thermo Scientific]

Pfu Puffer: *Pfu* DNA Polymerase Puffer +MgCl₂ [Thermo Scientific]

Primer: flankierende *forward* und *reverse*-Primer, jeweils 10 μM
Forward und *reverse*-Primer mit Punktmutationen (mut), jeweils 10μM
 Primersequenzen/Primerkombinationen vgl. Tab. 8.2

Durchführung

Der Gesamttablauf der *in vitro* Mutagenese ist in Abb. 3.2 skizziert. Die PCR-Ansätze wurden analog zur präparativen PCR (vgl. 3.4.6.1) zusammengesetzt.

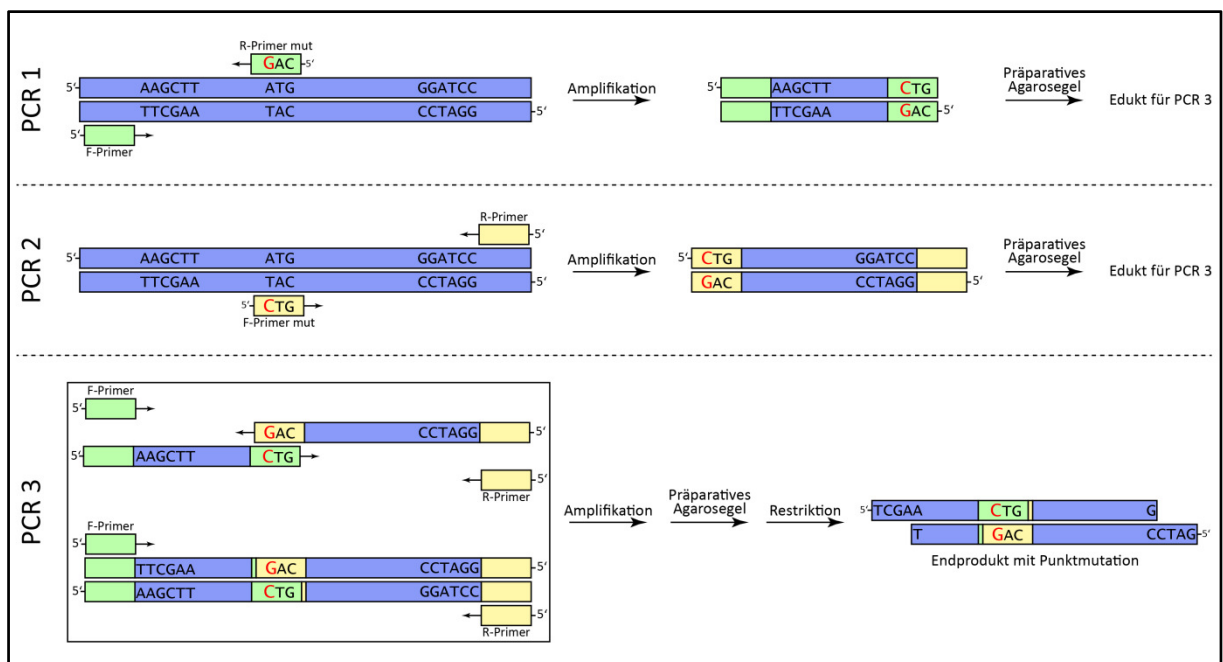


Abb. 3.2: Ablauf einer „site-directed“ *in vitro* Mutagenese. In zwei separaten Amplifikationsrunden (PCR 1 und PCR 2) mit Primern, die für die gewünschte Position ein *mismatch* tragen (Primer mut), werden die Ausgangs-DNA-Fragmente für die Fusions-PCR (PCR 3) synthetisiert. Durch Kombination dieser Fragmente mit den ebenfalls in den PCRs 1 und 2 eingesetzten, flankierenden Primern wird in PCR 3 das Endprodukt generiert, welches nach Restriktion z.B. in einen Vektor kloniert werden kann.

Über PCR 1 wurde ein DNA-Fragment generiert, das die gewünschte Mutation am 3'-Ende des sense-Stranges trägt. Um dies zu erreichen, wurde ein *reverse*-Primer mit entsprechendem *mismatch* (R-Primer mut) und ein flankierender *forward*-Primer eingesetzt. Analog konnte in PCR 2 ausgehend vom gleichen Template ein DNA-Fragment generiert werden, das am 5' Ende des *sense* Stranges die Mutation trägt (F-Primer mut kombiniert mit flankierendem *reverse*-Primer). Die Produkte aus den PCRs 1 und 2 wurden via präparativer Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und je 1 μl als Edukte für PCR 3 zusammengegeben (Fusions-PCR). Durch Kombination mit den beiden flankierenden Primern ließ sich so ein DNA-Fragment amplifizieren, welches die gewünschte Mutation trägt. Da die in dieser Arbeit generierten, von den flankierenden Primern eingegrenzten DNA-Bereiche stets Restriktionsschnittstellen aufwiesen, konnten die erhaltenen, aufgereinigten PCR-Produkte anschließend in Plasmide kloniert werden (vgl. 3.4.7)

3.4.6.5 Semi-quantitative RT-PCR (sqPCR)

PCRs von revers transkribierter Gesamtzell-RNA lassen sich über Agarose-Gelelektrophorese komparativ semi-quantitativ analysieren (kurz sqPCR). Dies geschieht durch Vergleich der durch EtBr hervorgerufenen Fluoreszenzintensität der einzelnen DNA-Banden. Solche sqPCRs sind besonders dann von Nutzen, wenn die Expression bestimmter mRNAs zwischen verschiedenen Proben, z.B. aus unterschiedlich behandelten Zellkulturen, verglichen werden soll. Da die Analyse der EtBr-Fluoreszenz erst nach abgeschlossener PCR stattfindet, lassen sich nur semi-quantitative Aussagen machen. Wurden für die PCR zu viele Zyklen gewählt, kann sich die Fluoreszenz der DNA-Banden aus unterschiedlichen Proben angleichen (Plateau-Phase der PCR, vgl. 3.4.6.6) und eine mögliche Regulation der eingesetzten Template-mRNA überdecken. Bei zu wenigen Zyklen ist möglicherweise kein PCR-Produkt erkennbar, sodass man fälschlicherweise von nicht-stattfindender Expression der korrespondierenden mRNA ausgehen könnte. So muss für jede zu analysierende mRNA eine empirisch festgelegte Anzahl an RT-PCR-Zyklen durchgeführt werden, um die exponentielle Amplifikationsphase abzuspannen. Sämtlich dafür eingesetzten Primer waren so gewählt, dass sie mindestens ein Intron des zu analysierenden Gens eingrenzen. So konnte durch kurze Elongationszeiten erreicht werden, dass die Amplifikation spezifisch vom eingesetzten Erststrang, der keine Intronsequenzen mehr enthält, ausgeht und nicht von verunreinigender, genomischer DNA.

Material und Reagenzien

DNA-Matrize: Erststrang (20 ng/μl) aus HEK-293, PC-3, MCF-7, Caco-2; revers transkribiert mit oligo-dT

Primer: Forward und reverse-Primer jeweils 10 μM, Primersequenzen vgl. Tab. 8.3

Taq Hot Start Mix: Maxima Hot Start Green PCR Master Mix [Thermo Scientific]

Durchführung

Der Ansatz für die sqPCRs ist in Tab. 3.10 zusammengefasst.

Tab. 3.10: Ansätze und Programm für sqPCRs.

PCR-Ansätze		PCR-Programm	
Reagenz	Menge	Temperatur	Zeit
mpH ₂ O	3 μl	95°C	15 min
Taq Hot Start Mix	10 μl	95°C	30 s
Forward-Primer	1 μl	60°C	30 s
Reverse-Primer	1 μl	72°C	30 s
Erststrang (20 ng/μl)	5 μl	72°C	5 min
		15°C	-

Insgesamt wurden pro sqPCR 100 ng Erststrang eingesetzt. Die Elongationstemperatur betrug in jedem Fall 60°C. Wie bereits erwähnt, wurde für jede zu analysierende mRNA die Anzahlen an PCR-Zyklen variiert, was im Ergebnisteil den jeweiligen Experimenten zu entnehmen ist. Die abgeschlossenen PCRs wurden anschließend per Agarose-Gelelektrophorese (1,5 – 2%) aufgetrennt und dokumentiert.

3.4.6.6 Quantitative RT-PCR (qPCR)

Die oben beschriebene sqPCR (vgl. 3.4.6.5) eignet sich angesichts ihrer vergleichsweise schnellen Durchführbarkeit zur Expressionsanalyse von mRNAs, lässt aber keine quantitativen Aussagen zu. Dies kann durch quantitative RT-PCRs (kurz qPCRs), oft auch als *real-time* RT-PCRs bezeichnet, erreicht werden. Die stattfindende DNA-Amplifikation lässt sich in Echtzeit verfolgen, erfordert jedoch spezielle Gerätschaften, sogenannte *Lightcycler*, und besondere Reagenzien. Für die Quantifizierung der Amplifikation wurde bei den hier durchgeführten qPCRs der DNA-interkalierende Farbstoff *SYBR[®]-Green* eingesetzt. Dieser beginnt zu fluoreszieren, sobald er an DNA gebunden vorliegt, was wiederum vom *Lightcycler* detektiert werden kann. Da im Laufe einer (q)PCR eine DNA-Vermehrung stattfindet, steigt die *SYBR[®]-Green*-Fluoreszenz nach jedem Zyklus an. Je mehr DNA-Template eingangs vorliegt, desto früher beginnt die exponentielle DNA-Amplifikationsphase. Die Amplifikation erreicht schließlich nach einigen Zyklen eine Plateauphase, in der keine weitere DNA-Vermehrung mehr stattfindet, d.h. sich die *SYBR[®]-Green*-Fluoreszenz im Maximum befindet. Als Referenz wird der Farbstoff *ROX* verwendet, welcher ebenfalls in jedem qPCR-Ansatz vorlag, seine Fluoreszenz jedoch nicht über die PCR hinweg ändert. Die *ROX*-Fluoreszenz ist also ein Maß für die „Gleichmäßigkeit“ der Probenzusammensetzung.

Die für die qPCRs eingesetzten Primer grenzen, analog zu den sqPCR-Primern, ein Intron des zu analysierenden Gens ein, jedoch sind die Amplicons deutlich kleiner (ca. 100 bp). Alle Primer wurden validiert, d.h. die durchgeführten PCRs ergaben nur ein spezifisches PCR-Fragment, verifiziert durch Sequenzierung, Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Schmelzpunktanalysen. Letztere wurden standardmäßig nach jeder qPCR im *Lightcycler* durchgeführt und sollen hier nicht im Detail erklärt werden.

Material und Reagenzien

adhesive seals: Absolute QPCR Seal (ABgene)

DNA-Matrize: Erststrang (20 ng/μl) aus HEK-293, PC-3, MCF-7, Caco-2; revers transkribiert mit oligo-dT

qPCR Master Mix: RealQ PCR Master Mix, + *SYBR[®] Green*, + *ROX* (Biomol)

Primer-Mix: Gemisch aus *forward*- und *reverse*-Primer, jeweils 0,2 μM, Primersequenzen vgl. Tab. 8.3

Standards: pcDNA6/CLU-cDNA, (vgl. 3.2.5):

$1,6 \times 10^2$, $1,6 \times 10^1$, $1,6 \times 10^0$, $1,6 \times 10^{-1}$, $1,6 \times 10^{-2}$, $1,6 \times 10^{-3}$, $1,6 \times 10^{-4}$, $1,6 \times 10^{-4}$ pg/μl

Durchführung

Der Ansatz für eine qPCR ist in Tab. 3.11 wiedergegeben. Da im Rahmen dieser Arbeit absolute Quantifizierungen von CLU-mRNAs/cDNAs durchgeführt wurden, musste auf jeder zu vermessenen 96-Well-qPCR-Detektionsplatte für jede zu analysierende mRNA-Variante eine Standardreihe von Plasmiden mit entsprechendem cDNA-Fragment bekannter Menge (m(Standard)) mitgeführt werden. Die Konzentrationen der eingesetzten Standards betragen, in 10-facher Abstufung, zwischen $1,6 \times 10^2$ und $1,6 \times 10^{-5}$ pg/μl. Da in einem PCR-Ansatz 2,5 μl Standard vorlagen, ergaben sich demnach absolute DNA-Mengen von 4×10^2 bis 4×10^{-5} pg. Als DNA-Matrize für die Proben wurden 2,5 μl ($\hat{=}$ 50 ng) revers transkribierte Gesamtzell-RNA eingesetzt (vgl. 3.3.2). Von allen Standards wurden Doublets, von allen Proben Triplets angesetzt, wobei die Ansätze ($\Sigma 10 \mu\text{l}$) direkt in eine 96-Well-Detektionsplatte pipetiert und anschließend mit einem *adhesive seal* verschlossen wurden. Die Reaktion fand im *Lightcycler* (7500 Fast System) statt.

Tab. 3.11: Ansätze und Programm für qPCRs. Dem 40 Zyklen umfassenden PCR-Programm schloss sich eine Schmelzkurvenanalyse bei 95°C bzw. 60°C an, die zweimal durchlaufen wurde.

PCR-Ansätze		PCR-Programm	
Reagenz	Menge	Temperatur	Zeit
<i>qPCR Master Mix</i>	5 µl	95°C	15 min
Primer Mix	2,5 µl	95°C	15 s
Erststrang (20 ng/µl) bzw. Standard	2,5 µl	60°C	30 s
		72°C	30 s
		95°C	15 s
		60°C	60 s

} 40 Zyklen
} 2 Zyklen

Auswertung

Die Auswertung der qPCRs erfolgte mit der Software *7500 Fast System SDS*. Durch Division der *SYBR®-Green*-Fluoreszenz durch die *ROX*-Fluoreszenz erhielt man Diagramme der sogenannten Rn-Werte (Abb. 3.3 A), welche sigmoidal verlaufen. Anschließend wurde die Fluoreszenz in den Zyklen, in denen noch kein Anstieg detektierbar war (Baseline), von Rn subtrahiert. Die daraus resultierenden ΔRn-Werte wurden semi-logarithmisch (Ordinate) gegen die Zyklenzahl (Abszisse) aufgetragen (Abb. 3.3 B). Die Quantifizierung der DNA-Menge erfolgte nun in der exponentiellen Amplifikationsphase. Dazu musste eine horizontale Linie gezogen werden, welche die Amplifikationskurven aller zu analysierenden Proben in ihrer exponentiellen Phase schneidet (der *Threshold*). Der Zyklus, in dem eine Amplifikationskurve den *Threshold* schneidet, bezeichnet man als C_T-Wert. Die für die Standards resultierenden C_T-Werte (Ordinate) ergeben, gegen die logarithmische DNA-Menge (Abszisse) aufgetragen, eine Gerade (Abb. 3.3 C). Durch lineare Regression konnte so die DNA-Menge der zu analysierenden Proben über den erhaltenen C_T-Wert (Probe) errechnet werden (m(Probe)).

Um aus der ermittelten DNA-Menge eine Kopienzahl errechnen zu können, mussten mehrere Parameter berücksichtigt werden: 1) in einem 10 µl qPCR-Ansatz waren 50 ng revers transkribierte Gesamtzell-RNA, 2) 0,93 × 10⁹ bp DNA wiegen 1 pg und 3) das für die Analysen eingesetzte Standardplasmid (pcDNA6/CLU-cDNA, vgl. 3.4.7) war ca. 6600 bp groß. Zuerst wurde nach folgender Formel die Kopienzahl an Standardplasmiden ausgehend von den eingesetzten Mengen errechnet:

$$Kopienzahl (Standard) = m(Standard) \cdot \frac{0,923 \cdot 10^9 bp}{6600 bp}$$

Die so ermittelten Werte wurden semi-logarithmisch gegen die C_T-Werte (Standard) aufgetragen (Abb. 3.3 D). Über die ermittelte Regressionsgleichung konnte die Kopienzahl an cDNA in der Probe ausgehend von dem ermittelten C_T-Wert (Probe) errechnet werden, wobei das Ergebnis als cDNA (=mRNA) Kopien pro ng Gesamtzell-RNA ausgedrückt wurde (mit k=Steigung und b=Ordinatenabschnitt der Regressionsgerade):

$$\frac{mRNA \text{ Kopien}}{ng \text{ Gesamt-RNA}} = \frac{10^{(C_T - b) \cdot k - 1}}{50ng}$$

Die so erhaltenen Werte wurden unter Berücksichtigung der Standardabweichung (σ) des jeweiligen Triplets in einem Säulendiagramm veranschaulicht.

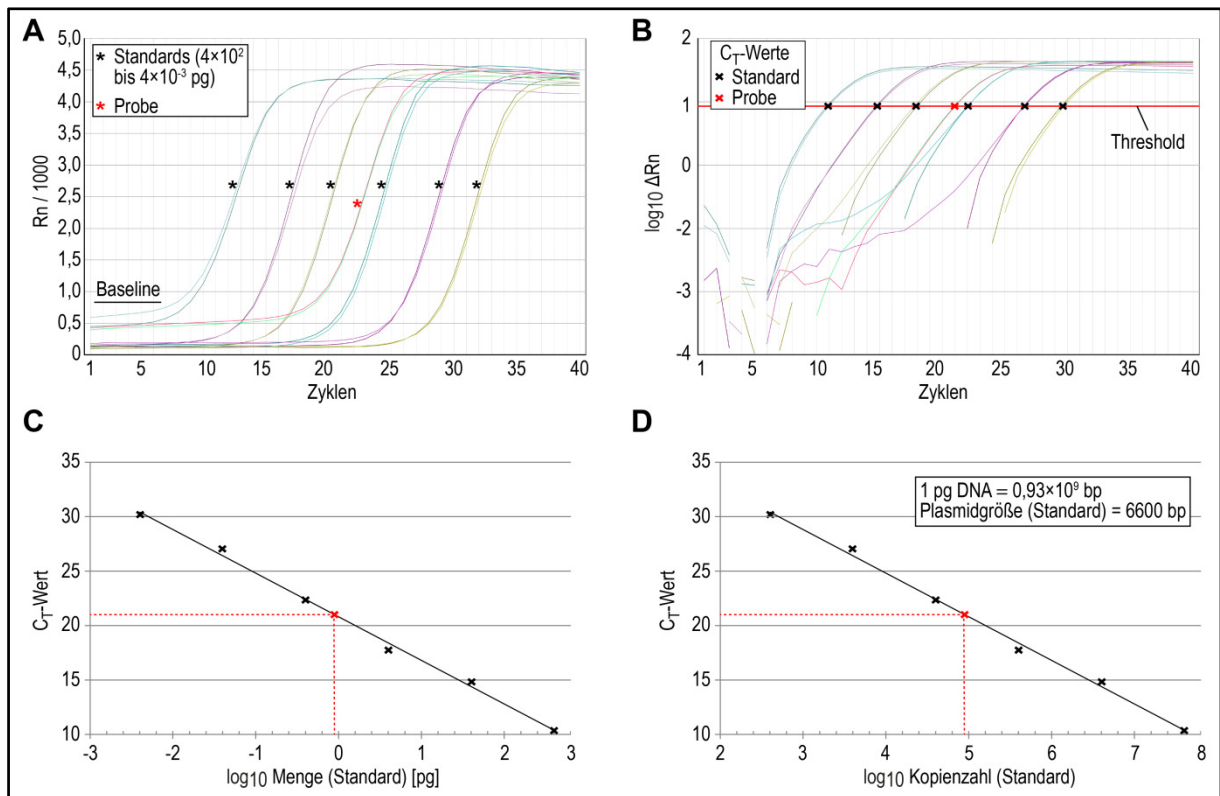


Abb. 3.3: Auswertung einer quantitativen PCR. Gezeigt ist exemplarisch die Auswertung einer qPCR mit einer Standardreihe aus sechs Meßpunkten. (*, 4×10^2 bis 4×10^{-3} pg Plasmid) und einer zu vermessenen Probe (*) (**A**) Die auf der Ordinate aufgetragenen R_n -Werte aufgetragen gegen die Zyklenzahl (Abszisse) ergeben die sogenannten Amplifikationsdiagramme. Die Baseline gibt die Zyklen an, in denen noch keine Amplifikation stattgefunden hat. (**B**) Amplifikationsdiagramm der um die Fluoreszenz der Baseline bereinigten R_n -Werte (ΔR_n). Durch semi-logarithmische Auftragung lässt sich der Threshold bestimmen, der alle Kurven in ihrem parallel verlaufenden Anstieg schneidet. (**C**) Ausgleichsgerade der aus den Schnittpunkten zwischen Threshold und Amplifikationskurven ermittelten C_T -Werte semi-logarithmisch aufgetragen gegen die Menge an Standard-DNA. (**D**) Ausgehend von der bp-Anzahl in einem pg DNA und der Größe und der Größe des eingesetzten Standardplasmids lassen sich aus der Menge an Standard-DNA die Kopienzahlen der cDNA errechnen. So kann auf die unbekannte Kopienzahl an cDNA in der Probe geschlossen werden.

3.4.7 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide

Im Laufe dieser Arbeit wurde eine Reihe an Plasmidkonstrukten kloniert. Hierbei handelte es sich zumeist um den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA6/V5-His, welcher Varianten der CLU-cDNA trug. Dieses Expressionssystem fügt einen ca. 5kDa großen *Tag* bestehend aus einem V5-Epitop und einem Hexahistidinrest an den C-Terminus der rekombinanten CLU-Proteine an (im Folgenden als CLU-V5 abgekürzt). Um entsprechende Plasmidkonstrukte herzustellen, musste zuerst die jeweilige cDNA (z.B. CLU Variante 1) in ausreichender Menge hergestellt werden (vgl. 3.3.2 und 3.4.6.1). Um anschließend eine Klonierung zu ermöglichen, wurden PCR-Primer eingesetzt, die eine Restriktionsschnittstelle an das 5'- bzw. 3'-Ende der cDNA anfügen (Adapterprimer). Bei CLU/pcDNA6-Plasmiden waren dies eine *HindIII*-Schnittstelle am 5'- sowie eine *BamHI*-Schnittstelle am 3'-Ende. Somit konnte eine gerichtete *sticky end* Ligation der cDNA in entsprechend behandelten pcDNA6 durchgeführt werden (vgl. 3.4.4 und 3.4.5).

Für bakterielle Überexpressionen wurde der Vektor pQE-30 verwendet, der eigentlich einen N-terminalen Hexahistidinrest an die rekombinanten Proteine anfügt. Für die hier durchgeführten Arbeiten war jedoch ein C-terminaler Tag wichtig, sodass die bereits in pcDNA6 vorliegenden cDNA-

Sequenzen mitsamt *Tag* via präparativer PCR amplifiziert wurden (vgl. 3.4.6.1). Durch die eingesetzten Klonierungsprimer konnte die Ribosombindungsstelle, ein Startcodon und eine *MfeI*-Schnittstelle ans 5'-Ende sowie eine *PmeI*-Schnittstelle ans 3'-Ende der cDNA synthetisiert und das entstandene Fragment per *MfeI* und *PmeI* Restriktion in pQE-30 ligiert werden. Der Vektor wurde zu diesem Zweck mit *EcoRI* und *SmaI* verdaut. Die durch *EcoRI* produzierten *sticky ends* sind mit den *sticky ends* von *MfeI* kompatibel, *PmeI* und *SmaI* produzieren *blunt ends*. Die für den N-Terminalen *Tag* codierende Sequenz wurde auf diese Art und Weise aus pQE-30 entfernt.

Alle Konstrukte wurden in DH5 α -Bakterien transformiert (vgl. 3.2.1), diese per Kolonie-PCR analysiert (vgl. 3.4.6.2) und das korrekte Konstrukt aus einem entsprechenden bakteriellen Einzelklon präpariert (vgl. 3.2.2). Ausgehend von den erhaltenen Plasmidkonstrukten konnten Modifikationen an den integrierten cDNAs vorgenommen werden. So wurden z.B. *in vitro* Mutagenesen (vgl. 3.4.6.4) durchgeführt oder bestimmte Bereiche ausgetauscht bzw. aus verschiedenen cDNAs zusammengefügt. In den letzten beiden Fällen konnten Restriktionsschnittstellen benutzt werden, die sich innerhalb der cDNA befinden (z.B. *AasI* im Exon 2 der CLU cDNA, vgl. 8.3.1). Schließlich konnten die gewonnen Plasmide in eukaryontischen bzw. in prokaryontischen Zellen zur Expression gebracht werden. Eine Übersicht aller in dieser Arbeit klonierten (c)DNA-Konstrukte, ihre Klonierungsschnittstellen, sowie die Primer, mit deren Hilfe sie synthetisiert wurden, ist dem Anhang zu entnehmen (vgl. Tab. 8.2).

3.5 Proteinanalytik

3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Coomassie-Brillantblau (CBB) G-250 bindet bei pH-Werten um 0,6 in seiner neutralen, grün erscheinenden Form über hydrophobe Wechselwirkungen und elektrostatische Interaktionen an Proteine. Die grün erscheinende, neutrale Form von CBB geht durch die Bindung an Protein in die anionische, blau erscheinende Form über (Georgiou *et al.*, 2008). Dieser Farbumschlag lässt sich bei 595nm photometrisch bestimmen und stellt somit ein Maß für die Proteinkonzentration einer Probe dar. Anhand von Eichgeraden, hier mit BSA (engl. *bovine serum albumin*) erstellt, lassen sich Proteinlösungen unbekannter Konzentration quantifizieren.

Der Bradford-Assay wurde durchgeführt, um die Proteinkonzentration von Zelllysaten (vgl. 3.1.5) zu erfassen, da für eine SDS-PAGE (vgl. 3.5.2) äquivalente Mengen an Protein auftragen werden müssen. Außerdem konnten hierüber die Mengen an aufgereinigtem Protein (vgl. 3.5.9) bestimmt werden.

Material und Reagenzien

Ameisensäure [Roth]

BSA-Standardreihe: Albumin Fraktion V [Roth] in mpH₂O:
0, 40, 80, 120, 160, 200, 300, 400 μ g/ml

CBB G-250: Roti[®]-Quant [Roth] 1:5 in mpH₂O

Durchführung

Um eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford durchzuführen, sollte die Konzentration der Probe zwischen 40 und 400 µg/ml betragen. Daher mussten höher konzentrierten Lösungen empirisch in mpH₂O verdünnt werden, wobei der Faktor zwischen 1 und 25 lag. Die BSA-Standardreihe wurde in Doublets, die eigentlichen Proben in Triplets vermessen. Jeweils 12,5 µl der BSA-Standards sowie 12,5 µl der verdünnten Proben wurden direkt in einer 96-Well-Platte vorgelegt und anschließend mit je 12,5 µl Ameisensäure versetzt. Nach 5 min Inkubation kamen zu jedem Ansatz 225 µl CBB G-250, sodass nun die Konzentrationen der BSA-Standardreihe 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 und 20 µg/ml betragen und auch die Proben nochmals um den Faktor 20 verdünnt vorlagen. Es folgten weitere 5 min Inkubation und anschließend die Bestimmung der OD_{595nm} mit dem *ELISA-Reader PowerWave XS*. Die Auswertung geschah durch Auftragen der gemessenen OD_{595nm} (Ordinate) gegen die Konzentrationen der BSA-Standardreihe (Abszisse) und dem Anlegen einer Regressionsgeraden. Anhand dieser konnte den gemessenen und gemittelten OD_{595nm} der Proben eine Konzentration in µg/ml zugeordnet werden. Abschließend wurde zum einen die Verdünnung durch Zugabe von Ameisensäure und CBB (Faktor 20), zum anderen die Vorverdünnung (Faktor 1 bis 25), entsprechend eingerechnet.

3.5.2 SDS-PAGE

Ein Gemisch aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid polymerisiert unter Zugabe des Radikalstarters Ammoniumpersulfat (APS) sowie des Polymerisierungskatalysators Tetramethylethylenediamin (TEMED) zum Polyacrylamid, welches, ähnlich wie Agarose, ein engmaschiges Gel bildet. Polyacrylamidgelle werden in erster Linie zum Auftrennen von Proteingemischen verwendet, wobei zur besseren Auflösung diskontinuierliche Gele, bestehend aus Sammel- und Trenngel, verwendet werden. Da Proteine in einem komplexen Gemisch unterschiedliche Nettoladungen tragen, ist es notwendig, diese mit einer einheitlichen Ladung zu versehen. Man benutzt das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (engl. *sodium dodecylsulfate*, SDS), das die Proteine mit einem negativen Ladungsmantel umgibt und sie durch Auflösen der nichtkovalenten Bindungen denaturiert. Die so behandelten Proteine können durch Anlegen eines elektrischen Feldes gleichermaßen im Polyacrylamidgel aufgetrennt werden, man spricht von *sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Für die hier durchgeführten SDS-PAGEs wurden, sofern nicht explizit erwähnt, reduzierende Bedingungen gewählt, d.h. es sollten die Disulfidbrücken der Proteine gespalten werden, was durch Zusatz des Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) erreicht wurde (reduzierende SDS-PAGE).

Material und Reagenzien

Acryl- / Bisacrylamid: Rotiphorese® 30 (37,5:1 Gemisch) [Roth]

APS: 10 % (w/v) APS in mpH₂O

Isopropanol

Protein-Größenstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder [Fermentas]

Sammelgelpuffer (1 M): 1 M Tris, pH 6,8
in mpH₂O

SDS (10%): 10 % (w/v) SDS in mpH₂O

SDS-PAGE-Elektrophoresepuffer (5 ×):	0,5 M Tris 1,92 M Glycin 0,5 % (w/v) SDS in mpH ₂ O
SDS-PAGE-Probenladepuffer (PPP, 5 ×):	0,225 M Tris, pH 6,8 50 % (v/v) Glycerin 5 % (w/v) SDS 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 M DTT (für reduzierende SDS-PAGEs) in mpH ₂ O
TEMED [Roth]	
Trenngelpuffer (3 M):	3 M Tris, pH 8,8 in mpH ₂ O

Durchführung

Die Gele, deren Zusammensetzung in Tab. 3.12 gezeigt ist, wurden mit Hilfe des PAGE-Systems Mini PROTEAN® Tetra Cell hergestellt. Das zwischen zwei Glasplatten gegossene Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet. Nach 15 min Polymerisationsdauer konnte das Isopropanol entfernt und auf das Trenngel das Sammelgel gegossen werden, sodass das Höhenverhältnis zwischen beiden ca. 4:1 betrug. Anschließend wurde ein Kamm in das Sammelgel gesteckt, welcher 10 Aussparungen für die späteren Auftragstaschen enthielt. Nach weiteren 15 min wurden die Gele in einer mit Elektroden versehenen Halterung fixiert und vertikal in die mit SDS-PAGE-Elektrophoresepuffer (1 ×) gefüllte Pufferkammer eingesetzt. In die Halterung zwischen die Gele wurde ebenfalls SDS-PAGE Elektrophoresepuffer (1 ×) gegeben.

Tab. 3.12: Zusammensetzung der Acrylamidgele für die SDS-PAGE. Je nach gewünschter Auftrennung wurde die Stärke des Trenngels empirisch gewählt. Die angegebenen Volumina sind für zwei Gele vorgesehen. Das Trenngel wurde zuerst gegossen und mit Isopropanol überschichtet. TEMED und APS für das Sammelgel wurden erst unmittelbar vor dem Gießen, nach Polymerisation des Trenngels, zugesetzt.

Reagenz	Trenngel				Sammelgel
	7,5%	9%	10%	12,5%	5%
mpH ₂ O	6,1 ml	5,6 ml	5,3 ml	4,5 ml	3,45 ml
Acryl- / Bisacrylamid	2,5 ml	3,0 ml	3,3 ml	4,1 ml	0,85 ml
Trenngelpuffer (3 M)	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	-
Sammelgelpuffer (1 M)	-	-	-	-	0,63 ml
SDS (10%)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	7,5 µl
APS	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	37,5 µl

Die zu analysierenden Proben wurden in einem Volumen von 20 bis 30 µl in Eppis vorgelegt und bei Bedarf mit mpH₂O aufgefüllt. Die eingesetzten Mengen sind dem jeweiligen Versuch zu entnehmen. Anschließend kam ein entsprechendes Volumen an PPP (5×) dazu und die gesamte Probe wurde 10 min bei 100°C im Thermocycler denaturiert. Als Proteingrößenstandard wurden pro Geltasche 3 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder verwendet und ebenfalls gemäß dem Probenvolumen mit mpH₂O und PPP (5×) versetzt. Für nicht verwendete Geltaschen mussten außerdem äquivalente Mengen PPP (1 ×) aufgetragen werden, da die Lauffront im Gel möglichst gerade verlaufen sollte. Nach Auftragen

der Proben wurde die Elektrophorese bei 100 bis 200 V durchgeführt, bis die gewünschte Auftrennung erreicht war. Für die weiteren Schritte wurde das Sammelgel verworfen.

3.5.3 Western-Blot

Der Western-Blot beschreibt eine Methode, bei der aufgetrennte Proteine aus einem SDS-PAGE-Gel (vgl. 3.5.2) auf spezielle Membranen übertragen werden. Einzelne Proteine auf der Membran können nun spezifisch über Antikörper detektiert werden (Immundetektion). Die Primärantikörper binden direkt ihr Epitop auf der Membran, jedoch i.d.R. ohne dieses dadurch zu visualisieren. Hierzu werden Sekundärantikörper eingesetzt, die ihrerseits wieder die Primärantikörper als Epitop erkennen und zudem an einen Farbstoff oder ein Enzym, das einen Nachweis durch Umsatz eines Substrats erlaubt, gekoppelt sind. Die in dieser Arbeit präferierte Methode war der Nachweis über Chemilumineszenz: das an die Sekundärantikörper gekoppelte Enzym Meerrettichperoxidase setzt ein spezielles Reagenz (Luminol) unter Entwicklung von Chemolumineszenz um, die wiederum durch spezielle Kameras detektiert werden kann. So erhaltene Dateien können bei Bedarf einer densitometrischen Messung unterzogen werden. Da die Densitometrie (auch Farbdichte genannt) der Farbmenge pro Flächeneinheit entspricht lässt sich aus solchen Messungen eine komparative Auswertung der Proteinexpression anfertigen. Eine intensiv lumineszierende Bande beinhaltet demnach linear mehr Protein als eine schwächer lumineszierende Bande, vorausgesetzt, die Sättigung des Detektors wird nicht überschritten.

Material und Reagenzien

Antikörper: vgl. 2.3.1, alle verdünnt in Milchpulverlösung

Luminol: *Western Lightning® Plus ECL* [PerkinElmer],

bestehend aus Luminol- und Oxidationsreagenz, zur Verwendung 1:1 vermischt

Milchpulverlösung: 5 % (w/v) Milchpulver [Roth] in PBST

Natriumazid: 10% (w/v) Natriumazid in mpH₂O

Nitrocellulosemembran: *Amersham™ Hybond-ECL* [GE Healthcare]

Phosphate buffered saline + Tween® (PBST): PBS (w/o Mg, w/o Ca) [Biochrom], gelöst nach Angaben;
0,1 % (v/v) Polysorbat 20 (Tween® 20) [Roth]

Semi-dry-Transferpuffer:
25 mM Tris
150 mM Glycin
10% (v/v) Methanol
in mpH₂O

Stripping-Puffer: 100 mM NaOH
2% (w/v) SDS
33,3 mM DTT (erst kurz vor Verwendung zugegeben)
in mpH₂O

Western-Blot

Alle Western-Blots wurden mit der *Semi-dry* Methode durchgeführt. Zunächst wurden Blottingpapiere und Membran auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten (ca. 9×5 cm) und mit *Semi-dry*-Transferpuffer getränkt. Auf die Anode der Blottingapparatur kamen drei Filterpapiere (BV-4), auf die die Nitrocellulosemembran platziert und schließlich das SDS-PAGE-Gel aufgelegt wurden. Es folgten drei weitere

Filterpapiere und die Kathode. Entstandene Luftblasen mussten zuvor mit einem Glasstab heraus gerollt werden. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes, dessen Stromstärke 2 bis 2,5 mA/cm² SDS-PAGE-Gel betrug, wurden die Proteine über einen Zeitraum von 75 min auf die Membran übertragen (*Blotting*).

Nach erfolgreichem *Blotting* wurden die Nitrocellulosemembranen bei Bedarf zurechtgeschnitten und in eine Kunststoffschale (ca. 10×6 cm) überführt. Alle folgenden Schritte wurden, sofern nicht anders genannt, auf einem Kipptisch durchgeführt. Begonnen wurde mit einer einstündigen Inkubation in 10 ml Milchpulverlösung (*Blocking*), welches freie Membranstellen sättigt und so die Qualität der Immundetektion verbessert. Nach Verwerfen der Milchpulverlösung kam die Membran mit der Proteinseite nach innen an die Wand eines 50 ml Polypropylen-Röhrchens. Es wurden 5 ml Primärantikörperlösung zugegeben und das Röhrchen in horizontaler Lagerung über Nacht bei 4°C auf einem Drehinkubator inkubiert. Anschließend konnte die Antikörperlösung abgenommen und zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert werden, wobei zur Konservierung 0,02% Natriumazid zugesetzt wurden. Die Membran wurde wieder in die Plastikschele überführt. Es schlossen sich drei Waschschrirte (1, 5 und 15 min) mit jeweils 5 ml PBST sowie eine 1 h Inkubation mit 5 ml Sekundärantikörperlösung an. Es folgte wieder ein dreimaliges Waschen mit je 5 ml PBST und anschließend die eigentliche Immundetektion. Hierzu wurden 400 µl des frisch angesetzten Luminols auf der Membran verteilt und diese zwischen zwei auf Membrangröße zurechtgeschnittene Druckerfolien fixiert. Die Messung der Chemolumineszenz erfolgte mit dem *VersaDoc Gel Imaging System* (8 Expositionen in 3 min, Gain=3×3), wobei der Proteingrößenstandard im Hellfeld aufgenommen und digital mit den Chemolumineszenzaufnahmen kombiniert wurde.

So entwickelte Nitrocellulosemembranen konnten durch Entfernen der Antikörper für eine neue Immundetektion eingesetzt werden. Das Entfernen der Antikörper wird als *Stripping* bezeichnet. Die bereits entwickelte Membran wurde zuerst zweimal kurz mit mpH₂O gewaschen und anschließend exakt 20 min mit 10 ml 60°C heißen *Stripping*-Puffer inkubiert. Um den pH wieder zu neutralisieren folgten vier Waschschrirte mit PBST á 1 min. Ab hier wurde analog mit *Blocking* und Antikörperinkubation fortgeföhren (s.o.). Das *Stripping* wurde ausschließlich verwendet, um Beladungskontrollen mit α -Tubulin durchzuführen. Da die Beladung der im Ergebnisteil gezeigten Blots stets zufriedenstellend war, wird dort nicht mehr explizit auf die α -Tubulin-Expression eingegangen.

Densitometrie

Ausgewählte Dateien entwickelter Western-Blots wurden mit der Software *Aida Image Analyzer v 4.25* densitometrisch untersucht. Dies diente in erster Linie dazu, den Expressionsgrad an nicht-sezernierten CLU-Formen innerhalb einer Probe (Gesamtzelllysat, vgl. 3.1.5) im Verhältnis zum Gesamt-CLU-Gehalt zu bestimmen. Hierzu wurde der Scanner auf einen weißen Bereich des Blots genullt und die Werte der Farbdichte einzelner Banden durch Eingrenzen mit dem Cursor bestimmt. Die erhaltenen Werte konnten prozentual zueinander ausgedrückt werden. Durch Messung von mindestens fünf gleichen Proben auf separaten Blots konnte zudem eine Standardabweichung errechnet werden.

3.5.4 Kolloidale Coomassie-Färbung

CBB R-250 bindet, analog zu CBB G-250 (vgl. 3.5.1) über hydrophobe Wechselwirkungen an Proteine. So lassen sich Proteinbanden in einem SDS-PAGE Gel unspezifisch anfärben. In der vorliegenden Arbeit wurde eine kolloidale Coomassiefärbung durchgeführt, die eine Detektionsgrenze bei ca. 30 ng Protein besitzt. Die Bildung der Farbstoffkolloide beruht auf einer hohen Konzentration an zugesetztem Ammoniumsulfat und einem alkoholischen Milieu (Kang *et al.*, 2002). Durch die kolloidalen Eigenschaften bindet der Farbstoff mit hoher Spezifität an Proteine und nur minimal an die Gelmatrix. Somit entfallen ausgedehnte Waschschriffe zur Hintergrundentfärbung.

Material und Reagenzien

CBB R-250 Färbelösung: 20% (v/v) Roti®-Blue (5 ×) [Roth]
20% (v/v) Methanol
in mpH₂O

Fixierlösung: 1% (v/v) o-Phosphorsäure (85%)
20% (v/v) Methanol
in mpH₂O

Methanol

Waschlösung: 25% (v/v) Methanol in mpH₂O

Durchführung

Das SDS-PAGE-Gel (vgl. 3.5.2) kam nach Fertigstellen der Elektrophorese in eine Plastikschiule. Nach einstündiger Inkubation in Fixierlösung wurde das Gel in CBB R-250 Färbelösung überführt und mindestens 16h darin auf einem Schütteltisch gefärbt. Anschließend wurde das Gel für 30min in der Waschlösung entfärbt und schließlich bis zur Dokumentation in mpH₂O in der Plastikschiule belassen. Die Dokumentation erfolgte mit einem Flachbettscanner, wofür das Gel luftblasenfrei auf eine Glasschiule gelegt wurde.

3.5.5 Fraktionierung von Gesamtzelllysaten

Durch eine Zellfraktionierung lassen sich Bestandteile der Zelle nach einem Aufschluss separieren, z.B. in Zellkerne, membranöse Komponenten oder cytosolische Proteine. Man bedient sich dabei unterschiedlichen Detergenzien, um in einem ersten Schritt nur die Zellmembran zu öffnen und so cytosolische Bestandteile freizusetzen. Durch stärkere Detergenzien lassen sich auch intrazelluläre, membranumhüllte Kompartimente aufschließen und weiter separieren. Dies geschieht zumeist durch differentielle Zentrifugation, d.h. durch Zentrifugation bei verschiedenen Geschwindigkeiten. So lassen sich größere Komponenten, i.e. Zellkerne, von kleineren Komponenten trennen.

Material und Reagenzien

Zellfraktionierungs-Kit: ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit [Merck]

Durchführung

HEK-293-Zellen wurden in 6-Well Platten kultiviert und transient mit CLU-Variante 1-cDNA transfiziert (vgl. 3.1.3). Nach 24 h serumfreier Kultur wurden die Zellen trypsinisiert und pelletiert. Die so gesammelten Zellen wurden mit dem Zellfraktionierungs-Kit gemäß den Herstellerangaben bearbeitet, so dass sich eine cytosolische, eine ER/Golgi-spezifische und eine Kernfraktion separieren ließen. Von allen Fraktionen wurden 20 µl per SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (vgl. 3.5.2, 3.5.3.).

3.5.6 N-Deglykosylierung von Gesamtzelllysaten

Ein wesentlicher Punkt dieser Arbeit war die Charakterisierung der Glykosylierung nicht-sezernierter CLU-Formen. Das Enzym *Peptide-N-Glycosidase F* (PNGase F) spaltet alle Asn-gebundenen Zuckerreste von Glykoproteinen ab, wodurch dessen Molekulargewicht verringert wird. Durch anschließende SDS-PAGE (vgl. 3.5.2) und Western-Blot-Analyse (vgl. 3.5.3) können so z.B. Aussagen über den Glykosylierungszustand der CLU-Formen gemacht werden.

Material und Reagenzien

PNGase F Kit [NEB]: G7 Reaction Buffer (10×)
 Glycoprotein Denaturing Buffer (10×)
 NP-40, 10% (v/v) in mpH₂O
 PNGase F (500.000 U/ml)

Durchführung

Die Zusammensetzung eines Deglykosylierungsansatzes ist in Tab. 3.13 aufgeführt.

Tab. 3.13: Deglykosylierungsansätze. Die Ansätze wurden entweder mit PNGase F oder mpH₂O (Kontrolle) bei 37°C inkubiert.

Reagenz	Eingesetzte Menge
Zelllysate	40 µg
mpH ₂ O	ad 15 µl
Glycoprotein Denaturing Buffer (10×)	1,5 µl
→ 3 min 95°C	
mpH ₂ O	7 µl
G7 Reaction Buffer (10×)	3 µl
NP-40 (10%)	3 µl
PNGase F/mpH ₂ O	2 µl
→ 3 h 37°C	

Insgesamt wurden je Probe 40 µg aufbereitetes Zelllysate (vgl. 3.1.5) eingesetzt, reduziert und bei 95°C denaturiert. Die eigentliche Reaktion fand für 3 h bei 37°C statt und der komplette Ansatz (Σ30 µl) wurde anschließend in eine SDS-PAGE-Tasche aufgetragen. Negativkontrollen wurden mit mpH₂O anstelle von PNGase F angesetzt.

3.5.7 Immuncytochemie und Laser Scanning Mikroskopie

Per Immuncytochemie können Proteine, in diesem speziellen Fall verschiedene CLU-Isoformen, innerhalb einer Zelle spezifisch lokalisiert werden. Dazu müssen Zellen auf einem Objektträger oder Deckglas fixiert und permeabilisiert werden. Ähnlich wie beim Western-Blot (vgl. 3.5.3) geschieht die Proteindetektion über eine Kombination aus Primär- und Sekundärantikörper, wobei letzterer mit einem Fluorophor gekoppelt ist. Werden Fluorophore mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt, emittieren sie wiederum Licht einer anderen, längeren Wellenlänge als die des anregenden Lichtes. In einem *Laser Scanning Microscope* (LSM) werden Laserstrahlen definierter Wellenlänge zur Anregung der Fluorophore genutzt, wobei getrennte Kanäle eine Kombination aus bis zu drei, bei hochsensitiven Geräten auch mehr, Anregungswellenlängen und damit auch den Einsatz verschiedener Fluorophore ermöglichen. So können z.B. Färbungen verschiedener Proteine überlagert werden. Dabei regt der Laser immer nur punktuell einen Teil des Präparats an, sodass im Mikroskop zu keinem Zeitpunkt ein vollständiges Bild entsteht (konfokales LSM). Dies geschieht anschließend über eine spezielle Software, wodurch man sehr hochauflösende Aufnahmen erhält. Weiterhin bietet das LSM die Möglichkeit, das zu untersuchende Präparat mit dem Laser in übereinanderliegenden Ebenen (Z-Ebenen) zu rastern. Somit erhält man eine dreidimensionale Verteilung der Fluoreszenz innerhalb des gesamten Zellkörpers und es können spezifischere Aussagen bezüglich der Lokalisation eines Zielproteins gemacht werden.

Die im Folgenden verwendeten Fluorophore heißen Cyanin 3 (Cy3), Alexa Fluor® 488 und DAPI, wobei nur das orangene Licht emittierende Cy3 an einen Sekundärantikörper gekoppelt vorlag. Grün fluoreszierendes Alexa Fluor® 488 war mit den Lektinen Concanavalin A (ConA) bzw. Weizenkeimagglutinin (engl. *wheat germ agglutinin*, WGA) gekoppelt. ConA interagiert mit einer Bandbreite an N-glykosylierten Proteinen, besonders jedoch mit den mannosehaltigen Glykoproteinen im ER-Kompartiment. WGA hingegen bindet terminal glykosylierte Proteine mit komplexeren, N-Acetylglucosamin- und N-Acetylneuraminsäure-haltigen Polysaccharidstrukturen, die insbesondere im Golgi-Apparat und an der Zellmembran zu finden sind (Sparbier *et al.*, 2006). 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) bindet bevorzugt an AT-reiche Regionen der DNA und emittiert dann blaues Licht (Tanious *et al.*, 1992). So können Zellkerne visualisiert werden.

Material und Reagenzien

Ammoniumchlorid-Lösung: 50 mM NH₄Cl in PBS

Antikörper: vgl. 2.3.1, alle verdünnt in BSA-Lösung
per:

BSA-Lösung: 2% (w/v) Albumin Fraktion V [Roth] in PBS

ConA-Lösung: 200 µg/ml *Concanavalin A, Alexa Fluor® 488 Conjugate* [Invitrogen]
0,1M NaHCO₃, pH 8,3
1 mM CaCl₂
1 mM MnCl₂
0,01% (w/v) Natriumazid
in mpH₂O

DAPI-Lösung: 0,2 µg/ml DAPI in PBS

Deckgläschen (Ø 1 cm) [IDL], sterilisiert

Immersionsöl [Roth]

Objektträger (76×26mm) [IDL]

Paraformaldehydlösung: 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS

PBS PBS (w/o Mg, w/o Ca) [Biochrom], gelöst nach Angaben

:

Polyvinylalkohol: Mowiol® 4-88 [Roth], gelöst nach Angaben;
enthält 25 mg/ml 1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)octan (DABCO) [Roth]

Triton® X-100-Lösung: 0,05% (v/v) Triton X®-100 in PBS

WGA-Lösung: 10 µg/ml *wheat germ agglutinin*, *Alexa Fluor® 488 Conjugate* [Invitrogen]
0,01% (w/v) Natriumazid
in PBS

Fixierung der Zellen auf Deckgläschen

In Zellkultur-6-*Wells* kamen sterile Deckgläschen (Ø 1 cm), sodass diese von den ausgesäten Zellen bewachsen werden konnten. Für die Untersuchungen wurden pro *Well* 4×10^6 HEK293 Zellen eingesetzt und bereits zwei Tage vor der eigentlichen Mikroskopie in die 6-*Well* Platten ausgesät. Nach 24 h konnten die Zellen transient mit Clusterinkonstrukten transfiziert werden (vgl. 3.1.2). Nach weiteren 6 h wurde ein Mediumwechsel (serumhaltig) durchgeführt und in diesem Zuge die Zellen nach Bedarf für max. 16 h mit MG-132 behandelt (vgl. 3.1.2). Anschließend wurden die Zellen einmal kurz mit PBS gewaschen, die Deckgläschen mit einer Präzisionspinzette entnommen und mit den Zellen nach oben für 20 min in 300 µl Paraformaldehydlösung in ein 24-*Well* eingelegt. Paraformaldehyd vermittelt eine kovalente Quervernetzung der Proteine zwischen deren ε-ständigen Lysin-Aminogruppen und den Peptidbindungen.

Färbung und Einbettung der Präparate

Für alle im Folgenden beschriebenen Waschschrte wurden die Deckgläschen für wenige Sekunden in PBS eingetaucht. Übrige Behandlungen erfolgten, außer zur Lektin- und Antikörperinkubation, direkt in der 24-*Well* Platte, wobei die Deckgläschen mit den Zellen nach oben zeigten. Generell sollte ab dem Aufbringen der Fluorophore mit gedimmtem Licht gearbeitet werden um ein Ausbleichen zu verhindern. Die auf Deckgläschen fixierten Zellen wurden dreimal gewaschen, wobei der dritte Waschschrte mit Ammoniumchlorid-Lösung erfolgte. Dieses reagiert mit noch vorhandene Aldehydgruppen des Formaldehyds und verhindert so eine potentiell quervernetzende Wirkung auf die später eingesetzten Antikörper. Danach wurden die Zellmembranen durch Inkubation mit 1 ml Triton® X-100-Lösung für 4 min permeabilisiert. Nach weiteren drei Waschschrten kamen die Deckgläschen mit den Zellen nach unten für 10 min auf 15 µl ConA- oder WGA-Lösung, welche auf einem Stück Parafilm vorgelegt und in einer, mit feuchtem Saugpapier ausgelegten, geschlossenen Petrischale platziert wurden. Es folgten drei weitere Waschschrten und ein 30-minütiges *Blocking* der Zellen mit BSA-Lösung. Analog zur ConA-Behandlung wurden dann je Deckglas 15 µl Primärantikörperlösung vorgelegt, die Zellen für 1 h darauf inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Die geschilderte Prozedur wurde mit der Sekundärantikörperlösung wiederholt, wobei hier eine Inkubation für 30 min ausreichend war. Zur Färbung der Zellkerne kamen die Deckgläschen für 2 min in DAPI-Lösung und danach kurz in mpH₂O.

Schließlich wurden pro Deckglas 5 μl Polyvinylalkohol auf einem Objektträger vorgelegt und die Deckgläschen mit den präparierten Zellen nach unten so eingebettet, das möglichst keine Luftblasen entstanden. Abschließend wurden die Präparate für mindestens 30 min bei 37°C, idealerweise über Nacht bei Raumtemperatur, ausgehärtet.

Mikroskopie

Die fertigen Präparate wurden mit dem LSM SP5 analysiert. Dazu kam ein Tropfen Immersionsöl auf das Deckglas, sodass die fluoreszierenden Zellen anschließend mit einem 63 \times Objektiv (Numerische Apertur: 1,4) aufgenommen werden konnten. Dabei wurde das Präparat durch Laserstrahlen der Wellenlängen 550nm (Cy3), 488nm (Alexa Fluor® 488) und 385nm (DAPI) gerastert, wobei der Abstand zwischen zwei Z-Ebenen 0,13 μm betrug. Ausgewertet wurden die gewonnenen Daten mit der Software *Imaris*. Die Fluoreszenzaufnahmen konnten durch Fourier-Transformation dekonvolviert und anschließend digital gefärbt und überlagert werden. Durch Aneinanderreihung der aus den verschiedenen Z-Ebenen detektierten Aufnahmen erhielt man Animationen der Fluoreszenz innerhalb des gesamten Zellkörpers (*Z-Stacks*).

3.5.8 Nickel-Affinitätschromatographie via „Fast Protein Liquid Chromatography“

Ni^{2+} -Ionen besitzen sechs koordinative Bindungsstellen, die es möglich machen, Komplexbindungen einzugehen. In der vorliegenden Arbeit sollte rekombinantes Clusterin aufgereinigt werden, wobei dieses einen C-terminalen Tag aus sechs Histidinresten (engl. *His-Tag*) trägt. Histidin wiederum ist im Stande, als Ligand die freien Komplexbindungsstellen des Ni^{2+} zu besetzen. Bei dem hier eingesetzten Protino® System ist Ni^{2+} über den dreizähligen Liganden Iminodiessigsäure (engl. *iminodiacetic acid*, IDA) an eine Matrix aus Silicagel (Kieselgel) gebunden. Somit besitzt Ni^{2+} lediglich noch drei freie Bindungsstellen für eine Bindung an den *His-Tag*, was jedoch vollkommen ausreichend ist (Abb. 3.4). So gebundene Proteine lassen sich gut von restlichen, *His-Tag*-losen Proteinen trennen. Durch Einsatz von Imidazol, einem Histidinderivaten, können an die Matrix gebundene Proteine nahezu vollständig wieder eluiert werden. So erreicht man neben einer Aufreinigung auch eine Aufkonzentration des rekombinanten Proteins. Um den Prozess zu beschleunigen, wurde im Folgenden mit einer *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC)-Anlage gearbeitet, die durch Pumpen der benötigten Lösungen über die in einer speziellen Säule befindliche Ni^{2+} -IDA-Silicamatrix hohe Flussraten und kurze Aufreinigungszeiten ermöglicht.

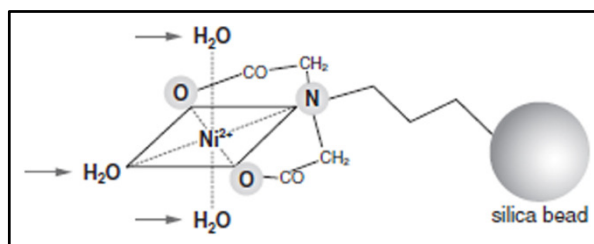


Abb. 3.4: Komplexierende Wirkung von Ni^{2+} . Bei dem Protino® System ist Ni^{2+} über den Liganden IDA an Silicagel-Kügelchen gebunden. Die Aufreinigung rekombinanter Proteine erfolgt über den *His-Tag*, welcher vom Ni^{2+} reversibel komplexiert werden kann (Pfeile) (aus *Purification of His-tag proteins, User manual* [Macherey-Nagel])

Im Laufe dieser Arbeit wurde zum einen sCLU aus Zellkulturüberständen von HEK-293-Zellen, zum anderen CLU_{21-449} und CLU_{34-449} aus *Escherichia coli* per Ni^{2+} -Affinitätschromatographie aufgereinigt. Erstes konnte unter nativen Bedingungen erreicht werden, für letztere musste wegen der vorhandenen

inclusion bodies denaturierenden Bedingungen herrschen. Diese wurden durch Zugabe von hohen Mengen an Harnstoff erreicht, der durch seine chaotropen Eigenschaften die Proteine reversibel denaturiert.

Material und Reagenzien

Elution (ELU)-Puffer:	50mM NaH ₂ PO ₄ 300mM NaCl 250mM Imidazol 8M Harnstoff (nur für denaturierende Chromatographie) in mpH ₂ O

Ethanol (20%):	20% (v/v) Ethanol in mpH ₂ O

Ladepuffer:	7% (v/v) Glycerin in LEW-Puffer

Lysis/Equilibration/Wash (LEW)-Puffer:	50mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (pH 8) 300mM NaCl 8M Harnstoff (nur für denaturierende Chromatographie) in mpH ₂ O

Ni ²⁺ -Matrix:	Protino® Ni-IDA Resin [Macherey-Nagel]

Native Ni-Affinitätschromatographie zur sCLU-Aufreinigung

Zur Aufreinigung von rekombinantem sCLU wurden 250ml mit sCLU angereichertem Zellkulturüberstand der Zelllinie HEK-293+sCLU-BG3 verwendet (vgl. 3.1.4). Da zur Bindung an die Ni²⁺-Matrix in erster Linie restliches Histidin aus dem Kulturmedium entfernt werden musste, wurde dieses mit Hilfe der Filtereinheit und einer peristaltischen Pumpe auf 100ml eingengt und gegen Ladepuffer umgepuffert. Details hierzu sind der Diplomarbeit von Philipp Rohne zu entnehmen. Für die FPLC mussten 2,5mg Ni²⁺-Matrix in 10ml mpH₂O aufgeschlemmt und luftblasenfrei in die Säule (XK16/20) gepackt werden, sodass sich ein Bettvolumen (BV) von 5ml ergab. Die Chromatographie wurde mit der *Amersham ÄKTA™ FPLC Basic* bei einer konstanten Flussrate von 5ml/min durchgeführt. Nach Äquilibration der Ni²⁺-Matrix mit LEW (ca. 5 BV) konnte das integrierte Photometer genullt und fortlaufend die OD_{280nm} gemessen werden. Alle folgenden Durchflüsse (Fraktionen) wurden separat zu Analyse Zwecken aufgefangen und bei 4°C gelagert. Zuerst wurde der in Ladepuffer umgepufferte, sCLU-haltige Zellkulturüberstand über die Matrix gegeben. Nach einem 20BV umfassenden ersten Waschschrift mit LEW-Puffer (Wasch 1) folgte ein zweiter, 10BV umfassender Waschschrift mit einem Gemisch aus 90% LEW- und 10% ELU-Puffer (Wasch 2). Schließlich konnten die rekombinanten Proteine durch Spülen der Ni²⁺-Matrix mit ELU-Puffer in 4×10ml Fraktionen eluiert werden (Elution). Das so aufgereinigte sCLU wurde im Weiteren eingengt und umgepuffert (vgl. 3.5.9).

Reversibel denaturierende Ni-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von CLU₂₁₋₄₄₉ und CLU₃₄₋₄₄₉

Die Aufreinigung von CLU₂₁₋₄₄₉ und CLU₃₄₋₄₄₉ geschah ausgehend von isolierten *inclusion bodies* aus den *Escherichia coli*-Stämmen SG13009-CLU₂₁₋₄₄₉ und SG13009-CLU₃₄₋₄₄₉ (vgl.3.2.3). Für die FPLC wurde die Säule C10/10 verwendet, jedoch betrug das BV an Ni²⁺-Matrix in diesem Fall nur 1ml. Alle Puffer enthielten für diese Aufreinigung 8M Harnstoff. Das Extrakt aus den *inclusion bodies* wurde mit dem denaturierendem LEW-Puffer auf 50ml aufgefüllt und anschließend eine FPLC mit denselben Parametern

durchgeführt, wie für die sCLU-Aufreinigung beschrieben. Die Elutionsfraktionen betragen 3×5 ml, wobei das darin enthaltene CLU einer sukzessiven Rückfaltung unterzogen werden musste (vgl. 3.5.9)

3.5.9 Umpufferung und Rückfaltung der aufgereinigten CLU-Formen

Die per Ni-Affinitätschromatographie gewonnenen CLU-Formen mussten für ihre weitere Verwendung in andere Pufferlösungen aufgenommen werden. Im Falle des sCLUs reichte eine vergleichsweise kurze Umpufferung mit einem Größenausschlussfilter aus. Für CLU₂₁₋₄₄₉ und CLU₃₄₋₄₄₉ stellte sich dies als komplizierter heraus, da die denaturierenden Proteine durch Entfernen des Harnstoffs zum Ausfallen tendieren. Daher wurde eine Rückfaltung dieser CLU-Formen durchgeführt.

Material und Reagenzien

Phosphatpuffer: 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7)
in mpH₂O

Rückfaltungspuffer: 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7)
500 mM L-Arginin
in mpH₂O

Durchführung

Die das gereinigte sCLU-enthaltenden Fraktionen wurden mit der Amicon Zentrifugen-Filtrationseinheiten (50 kDa Ausschluss) 15 min bei $4600 \times g$ auf ca. 500 μ l eingengt und wieder in 15 ml Phosphatpuffer verdünnt. Dieser Schritt wurde insgesamt viermal wiederholt. Die letzten 500 μ l konnten per Bradford-Analyse (vgl. 3.5.1) quantifiziert und der Proteingehalt durch Verdünnung mit Phosphatpuffer auf 800 ng/ml eingestellt werden.

Tab. 3.14: Verdünnungsreihe zur Rückfaltung von CLU₂₁₋₄₄₉ bzw. CLU₃₄₋₄₄₉. Angegeben sind die zugegebenen Volumina an Rückfaltungspuffer oder Phosphatpuffer sowie die daraus resultierenden Konzentrationen an Harnstoff und Arginin im Gesamtansatz.

Zeitpunkt der Zugabe	zugegebenes Volumen	Gesamtvolumen	Konz. Harnstoff	Konz. Arginin
(Ausgangslösung)	-	(70 μ l)	(8 M)	(0 mM)
0 h	+ 70 μ l	140 μ l	4 M	250 mM
16 h	+ 70 μ l	210 μ l	2,7 M	333 mM
17 h	+ 35 μ l	245 μ l	2,3 M	357 mM
17 h 30 min	+ 35 μ l	280 μ l	2 M	375 mM
18 h	+ 35 μ l	315 μ l	1,8 M	389 mM
18 h 30 min	+ 35 μ l	350 μ l	1,6 M	400 mM

Die Elutionsfraktionen der CLU₂₁₋₄₄₉ bzw. der CLU₃₄₋₄₄₉-Chromatographie wurden mit der Sartorius Zentrifugen-Filtrationseinheit (5 kDa Ausschluss) 15 min bei $4600 \times g$ auf ca. 70 μ l eingengt. Das Retentat wurde nun sukzessive in einer längeren Verdünnungsreihe, welche in Tab. 3.14 aufgeführt ist, entweder mit Rückfaltungspuffer oder mit Phosphatpuffer auf ein Gesamtvolumen von 350 μ l verdünnt. Die Verdünnungsschritte wurden jeweils auf einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Schließlich wurde 1 h bei $20.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert und etwaiges pelletiertes Protein vom löslichen Überstand separiert. Abschließend konnte die Proteinkonzentration via Bradford-Analyse ermittelt und mit entsprechendem Puffer auf 250 ng/ μ l eingestellt werden.

3.5.10 CD-Spektroskopie

Linear polarisiertes Licht lässt sich als Überlagerung aus links- und rechts-zirkular polarisierten Komponenten verstehen. Fällt linear polarisiertes Licht auf eine optisch aktive Probe mit mehreren chiralen Zentren, z.B. eine Proteinlösung, so tritt nach Durchtritt des Lichts eine Verzögerung zwischen links- und rechts-zirkular polarisierter Komponente auf. Die Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie nutzt die unterschiedliche Absorption von links- und rechts polarisiertem Licht in Bezug auf die zu untersuchende Probe aus. Während der Messung kann die Differenz der molaren Absorptionskoeffizienten ($\Delta\epsilon$) im CD-Spektrometer bestimmt werden, wobei die Probe mit monochromatischem Licht bei Wellenlängen zwischen 190nm und 260nm bestrahlt wird. Aus $\Delta\epsilon$ errechnet sich schließlich die sogenannte Elliptizität (θ), welche die Konzentration (c) der Probe und der Schichtdicke (d) der Küvette berücksichtigt:

$$\theta = 3298 \cdot (\epsilon_L - \epsilon_R) \cdot c \cdot d \quad \text{mit } \epsilon_L \text{ bzw. } \epsilon_R = \text{molare Absorptionskoeffizienten der Probe für links- bzw. rechts-zirkular polarisiertes Licht}$$

Für Sekundärstrukturanalysen von Proteinen wird θ auf die mittlere molare Masse der AS im Protein bezogen, sodass sich die *Mean Residue Ellipticity* (MRE) ergibt. Da Sekundärstrukturelemente wie α -Helices und β -Faltblätter charakteristische $\Delta\epsilon$ -Werte verursachen, lässt sich eine Protein-Sekundärstruktur über Algorithmen kalkulieren, welche die gemessene MRE mit der von Proteinen bekannter Sekundärstruktur vergleicht (Whitmore und Wallace, 2008). Im Folgenden sollten die Anteile an Sekundärstrukturelementen von aufgereinigtem sCLU-V5 bestimmt werden.

Material und Reagenzien

Phosphatpuffer: 10mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7)
in mpH₂O

Durchführung

Die zu vermessende sCLU-V5 Lösung lag bei einer Konzentration von 0,75 $\mu\text{g/ml}$ in Phosphatpuffer vor. Das CD-Spektrometer wurde entsprechend auf Phosphatpuffer genullt und die CD-Spektren (Datenformat: „JASCO“) zwischen 190 und 260nm in Abständen von 1nm in einer Küvette mit $d=1\text{mm}$ bestimmt. Eine Probe wurde dabei dreimal hintereinander vermessen und die ermittelte Spektren anschließend dekonvolviert. Das Gerät gibt die $\Delta\epsilon$ -Werte aus, welche über die obenstehenden Formel in MRE umgerechnet werden können. Dabei wurde für sCLU mit 427AS und für den angefügten V5/His-Tag mit 51AS kalkuliert. Als tatsächliches Molekulargewicht wurde 60kDa (sCLU)+5kDa (Tag) angenommen (vgl. 1.2.1). Somit ergibt sich eine mittlere molare Masse von 136Da pro AS. Die ermittelten Daten wurden über die Internetseite *Dichroweb* (dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/) ausgewertet. Der verwendete Algorithmus war „CDSSTR“, als Referenzprotein-Datenbank wurde „Set 7 (Optimised for 190-240nm)“ gewählt.

3.5.11 Analyse der Chaperonaktivität

Die Chaperonaktivität von sCLU kann *in vitro* über Präzipitationsassays bestimmt werden (Humphreys *et al.*, 1999). Hierzu wird einem Zielprotein, d.h. einem Protein, dessen Präzipitationseigenschaften

analysiert werden sollen, aufgereinigtes sCLU bzw. BSA als Kontrollprotein zugegeben und die Trübung der gesamten Lösung über die Zeit bestimmt. Durch Erhitzen der Proteinlösung fällt das Zielprotein aus und die Flüssigkeit trübt sich ein, wobei die OD_{360nm} als Maß für die Trübung herangezogen wird. Diese Eintrübung sollte ausbleiben, wenn dem Zielprotein zuvor eine definierte Menge sCLU zugesetzt wurde. Mit Hilfe dieses Assays kann so zuverlässig die Aktivität des sCLUs überprüft und zudem eine Aussage über den Erfolg von dessen Aufreinigung (vgl. 3.5.8, 3.5.9) gemacht werden.

Präzipitationsassays wurden in dieser Arbeit durchgeführt um eine potentielle Chaperonaktivität der nicht-sezernierten CLU-Formen nachzuweisen. Es wird gegenwärtig in der Literatur diskutiert, ob diesen eine zum sCLU analoge Funktion zukommt (vgl. 1.6.4).

Material und Reagenzien

BSA-Lösung: Albumin Fraktion V [Roth], 83 µg/ml in mpH₂O

CLU-Lösungen: sCLU-V5 (800 µg/ml),
 CLU₂₁₋₄₄₉-V5 (250 µg/ml),
 CLU₃₄₋₄₄₉-V5 (250 µg/ml),
 vgl. 3.5.9

Harnstoff-/Argininpuffer (4×): 10mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7)
 1,6M Harnstoff
 0,4M L-Arginin
 in mpH₂O

Phosphatpuffer: 10mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7)
 in mpH₂O

Präzipitationspuffer (10×): 0,5M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7)
 1,5M NaCl
 0,2M DTT (nur für reduzierende Bedingungen)
 in mpH₂O

Zielproteine (Stammlösungen): Transferrin [Sigma] (6,25 mg/ml),
 Katalase [Sigma] (12,5 mg/ml),
 lösliches Zellextrakt (3 mg/ml),
 jeweils in Phosphatpuffer

Präzipitationsassay

Lösliches Zellextrakt wurde aus sechs 175 cm² Flaschen, die konfluent mit HEK-293 bewachsen waren, extrahiert. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert, vereint, pelletiert und in 10ml Phosphatpuffer aufgenommen. Nach einmaligem Einfrieren in flüssigem N₂ und Auftauen konnte das lösliche Zellextrakt durch 1h Zentrifugation bei 20.000×g und 4°C gewonnen werden. Die Proteinkonzentration wurde per Bradford-Assay bestimmt und mit Phosphatpuffer auf 3 mg/ml eingestellt.

Die Präzipitationsassays konnten direkt in eine 96-Well Platte pipettiert werden, wobei alle Proben in Triplets angesetzt wurden. Präzipitationspuffer (1×) diente als Hintergrundkontrolle. Getestet wurde die Chaperonaktivität von sCLU, BSA, CLU₂₁₋₄₄₉ und CLU₃₄₋₄₄₉. Als Zielproteine wurden Transferrin, Katalase und lösliches Zellextrakt eingesetzt. Die Pipettieransätze für die Proben sind in Tab. 3.15 wiedergegeben. Da die Lösungen von CLU₂₁₋₄₄₉ und CLU₃₄₋₄₄₉ noch Harnstoff und Arginin enthielten, mussten den sCLU-Proben eine äquivalente Menge an Harnstoff-/Argininpuffer zugesetzt werden. Es sei darauf

hingewiesen, dass allen Präzipitationsassays DTT enthielten, also reduzierende Bedingungen herrschten. Dies war nötig, um eine Präzipitation von Transferrin zu erreichen. Für Katalase und lösliches Zellextrakt war dies nicht zwingend erforderlich, jedoch konnte in diesem Fall kein Unterschied zwischen reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen festgestellt werden. Die Ansätze wurden direkt im *ELISA-Reader „PowerWave XS“* bei geschlossener 96-Well Platte auf 37°C oder 50°C erhitzt und die OD_{360nm} in definierten Intervallen bestimmt. Diese betragen für Transferrin und Katalase 150s über einen Zeitraum von 50min und für lösliches Zellextrakt 10min über einen Zeitraum von 150min. Für die Auswertung wurden die um die Hintergrundabsorption bereinigten OD_{360nm} -Werte (Ordinate), unter Berücksichtigung der Standardabweichung der gemessenen Triplets, gegen die Zeit (Abszisse) aufgetragen. Zur Veranschaulichung wurden einzelne *Wells* mit dem Alphamager-Dokumentationssystem abgelichtet.

Bestimmung der Katalaseaktivität

Um die Aktivität des Enzyms Katalase nach Durchführung eines Präzipitationsassays feststellen zu können, wurde ein H_2O_2 -Test angewendet. H_2O_2 wird von aktiver Katalase zu O_2 und H_2O umgesetzt, was sich durch Ausbildung von Bläschen in den entsprechenden Proben bemerkbar macht. Ist die Enzymaktivität zerstört, so bleibt die Bläschenbildung aus. Dementsprechend wurde ein Präzipitationsassay von Katalase-haltigen Proben, wie oben beschrieben, durchgeführt und nach Beendigung 10 μ l H_2O_2 -Lösung pro *Well* zugegeben, sodass sich eine Endkonzentration von ca. 100 mM H_2O_2 einstellte. Die *Wells* bzw. die auftretende Bläschenbildung konnten ebenfalls mit dem Alphamager dokumentiert werden.

Tab. 3.15: Zusammensetzung der Präzipitationsansätze. Durch die eingesetzten Proteinmengen ergeben sich Endkonzentrationen von 100 μ g/ml sCLU, 62,5 μ g/ml CLU_{21-449} bzw. CLU_{34-449} , 0,5 mg/ml Transferrin, 1 mg/ml Katalase und 1 mg/ml lösliches Zellextrakt.

Probe	Volumen an Reagenzien [μ l] für Transferrin bzw. Katalaseproben							
	mpH ₂ O	Transferrin bzw. Katalase	sCLU	BSA	CLU_{21-449}	CLU_{34-449}	Harnstoff-/Argininp. (4x)	Präzi.-puffer (10x)
sCLU	44,5	8	12,5	-	-	-	25	10
BSA	44,5	8	-	12,5	-	-	25	10
CLU_{21-449}	57	8	-	-	25	-	-	10
CLU_{34-449}	57	8	-	-	-	25	-	10
H ₂ O	57	8	-	-	-	-	25	10
Probe	Volumen an Reagenzien [μ l] für lösliche Zellextraktproben							
	mpH ₂ O	lösliches Zellextrakt	sCLU	BSA	CLU_{21-449}	CLU_{34-449}	Harnstoff-/Argininp. (4x)	Präzi.-puffer (10x)
sCLU	19,2	33,3	12,5	-	-	-	25	10
BSA	19,2	33,3	-	12,5	-	-	25	10
CLU_{21-449}	31,7	33,3	-	-	25	-	-	10
CLU_{34-449}	31,7	33,3	-	-	-	25	-	10
H ₂ O	31,7	33,3	-	-	-	-	25	10

4 ERGEBNISSE

Da es im Rahmen dieser Arbeit primär um die Erforschung nicht-sezernerter CLU-Formen ging, war ein erstes Ziel, die Expression entsprechender Proteine durch Western-blotting nachzuvollziehen. Für diese und weitere Experimente wurden die Zelllinien HEK-293 (immortalisiert, nicht-karzinogen), PC-3 (aus Prostatakarzinom), MCF-7 (aus Brustzellkarzinom) und Caco-2 (aus kolorektalem Karzinom) verwendet. Insbesondere an den letzten drei Zelltypen wurde bereits die Expression nicht-sezernerter CLU-Formen (z.B. Leskov *et al.*, 2003; Rizzi *et al.*, 2009a) bzw. verschiedener CLU-mRNA-Varianten (Schepeler *et al.*, 2007) erforscht.

4.1 Nicht-sezernierte Formen von Clusterin sind Zellstress assoziiert

Es ist eine Fülle an Publikationen bekannt, in denen von nicht-sezernierten CLU-Formen berichtet wird (vgl. 1.4). Eine Gemeinsamkeit, die sich aus den dort gemachten Beobachtungen herauskristallisiert, ist der Zusammenhang zwischen dem Auftreten nicht-sezernerter CLUs und zellulärem Stress. Um die Biogenese dieser CLU-Formen analysieren zu können, sollte zuerst deren Auftreten unter Zellstress nachvollzogen werden. Dazu wurden Zelllinien unter erhöhter Temperatur (45°C) kultiviert, oxidativen Bedingungen durch Zugabe von H₂O₂ ausgesetzt oder mit dem Proteasominhibitor MG-132 behandelt. All diese Formen des Zellstress führen nachgewiesenermaßen zur Induktion einer Hitzeschockantwort. (Bush *et al.*, 1997; Michel *et al.*, 1997; Viard *et al.*, 1999; Loison *et al.*, 2006). Von den so behandelten Zellen konnten sowohl Zellkulturüberstand als auch Zelllysate extrahiert und anschließend Western-Blot-Analysen mit CLU-spezifischen Antikörpern durchgeführt werden.

Bei HEK-293-Zellen, welche für 60 min unter 45°C und anschließend 23 h unter 45°C inkubiert wurden, zeichnete sich im Vergleich zu den Kontrollzellen (37°C, 24 h) eine deutliche Erhöhung der sCLU-Proteinmenge ab. Dies äußert sich an einem Anstieg von psCLU und sCLU im Zelllysate und sCLU im Kulturmedium (Abb. 4.1 A und B, 45°C, 60 min). Bei längerer Hitzeeinwirkung (90 min) zeigte sich eine zusätzliche Bande bei ca. 50 kDa und eine zweite, deutlich schwächere bei 45 kDa (Abb. 4.1 A und B, 45°C, 90 min, *). Diese Proteine lassen sich nicht im Zellkulturüberstand detektieren und repräsentieren daher nicht-sezernierte CLU-Formen. Wurde die Hitzebehandlung auf 120 min ausgedehnt, ließ die Intensität der sCLU-Bande und der 50 kDa Bande deutlich nach, die Intensität der 45 kDa Bande hingegen nahm zu (Abb. 4.1 A und B, 45°C, 120 min, *). Interessanterweise sind nach H₂O₂-Behandlung keine erhöhten Mengen an sCLU zu erkennen. Bei hohen Konzentrationen an H₂O₂ fiel die sCLU-Menge im Vergleich zu den Kontrollzellen sogar ab (Abb. 4.1 A und B, H₂O₂). Auch das Auftreten der nicht-sezernerter CLU-Formen bleibt komplett aus. Somit scheint ein direkter Einfluss von oxidativen Reagenzien im Vergleich zu erhöhten Temperaturen keine Erhöhung der CLU-Menge zu bewirken. Diese Resultate wurden unabhängig voneinander mit zwei verschiedenen, CLU-spezifischen Antikörpern gewonnen, wobei der erste (*sc-6419*, Abb. 4.1 A) gegen die β -Kette, der zweite (*Clone 41D*, Abb. 4.1 B) gegen die α -Kette des reifen Proteins gerichtet war. Generell ließen sich mit dem Antikörper *sc-6419* deutlichere Ergebnisse erzielen, da er wesentlich stärkere Signale liefert und im Vergleich zum *Clone 41D* keine

Kreuzreaktionen (Abb. 4.1 B, n.s.) produziert. Somit wurde im Folgenden nur noch der *sc-6419* verwendet.

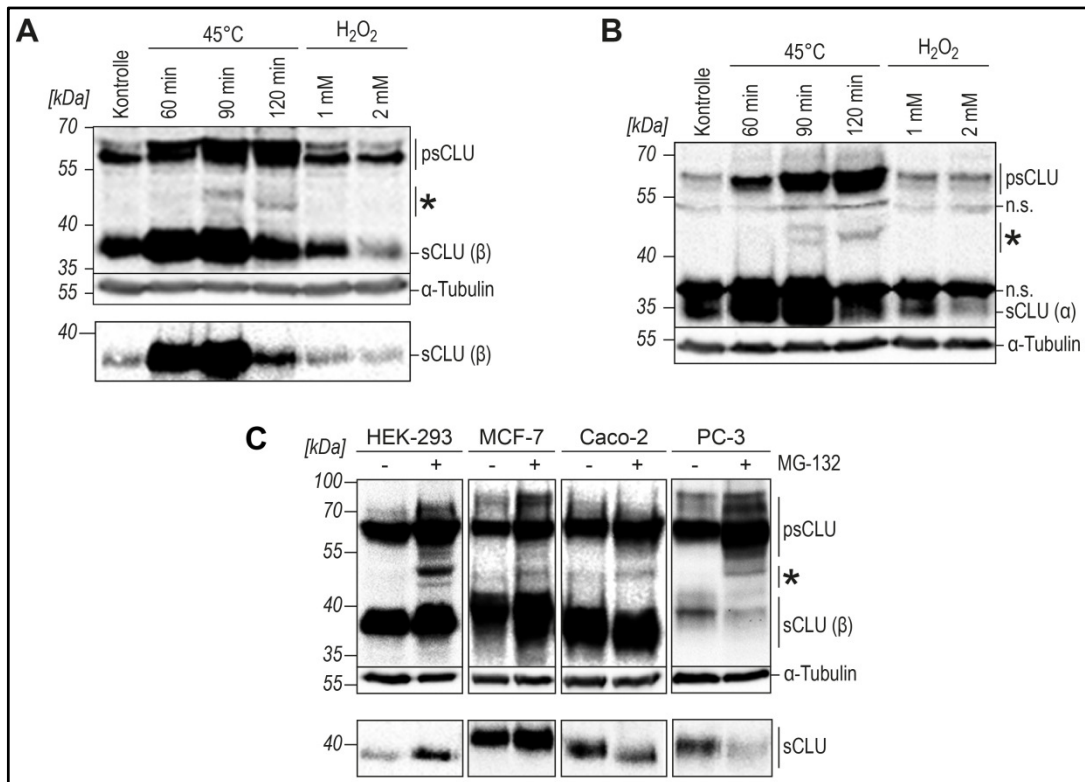


Abb. 4.1: Hitzeschock-, H₂O₂- und MG-132-Behandlung verschiedener Zelllinien. (A+B) HEK-293-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten erhöhten Temperaturen (45°C) ausgesetzt. Anschließend erfolgte eine Regeneration bei 37°C bis zu einer Gesamtzeit von 24 h. Die H₂O₂-Behandlung erfolgte über die kompletten 24 h. Kontrollzellen wurden bei 37°C ohne Behandlung kultiviert. Die Western-Blots zeigen CLU, welches in Gesamtzelllysaten (je 150 µg, oberer Blot) und Zellkulturüberständen (unterer Blot) mit dem polyklonalen Antiserum *sc-6419* (A) oder mit dem monoklonalen Antikörper *clone 41D* (B) detektiert wurde. (C) HEK-293-Zellen wurden für 10 h, MCF-7 und PC-3-Zellen für 28 h und Caco-2-Zellen für 24 h mit 10 µM MG-132 behandelt. CLU wurde mit dem polyklonalen Antiserum *sc-6419* in Gesamtzelllysaten (je 150 µg, oberer Blot) und Zellkulturüberständen (unterer Blot) detektiert. n.s. = *non-specific*; * = nicht-sezernierte CLU-Formen.

In einem weiteren Experiment wurden verschiedene Zelllinien für 18 bis 24 h mit 10 µM MG-132 inkubiert, was bei HEK-293 und MCF-7-Zellen in einer deutlichen Erhöhung der psCLU/sCLU-Menge im Zelllysate und der sCLU-Menge im Zellkulturüberstand resultierte (Abb. 4.1 C, HEK-293, MCF-7). In Zelllysaten von Caco-2-Zellen änderte sich der psCLU/sCLU-Gehalt nur gering und die Sekretion von sCLU fällt durch die Behandlung eher ab. Noch deutlicher ausgeprägt war dies in PC-3-Zellen, welche kaum noch sCLU sezernierten (Abb. 4.1 C, Caco-2, PC-3). Trotz der Unterschiede in der sCLU-Menge konnten in den Zelllysaten aller Zelllinien nicht-sezernierte CLU-Formen nach MG-132-Gabe detektiert werden, wobei die genannte 50 kDa-Bande in allen behandelten Zellen auftauchte, die 45 kDa-Bande jedoch nur in HEK-293 Zelllysaten zu erkennen war (Abb. 4.1 C, *). Tab. 4.1 beinhaltet die densitometrische Auswertung der korrespondierenden Western-Blots MG-132-behandelter HEK-293-Zellen, wobei die Farbdichte der einzelnen Banden als Maß für die relative Menge der einzelnen CLU-Formen herangezogen wurde. Dabei zeigte sich, dass die nicht-sezernierten CLU-Formen einen Anteil von 3,6% am gesamten, zellassozierten CLU ausmachen.

Es lässt sich also sagen, dass nicht-sezernierte CLU-Formen in der Tat Zellstress-assoziiert sind. Deren Präsenz ist insbesondere in MG-132-behandelten Zellen deutlich erkennbar. Daher wurde in folgenden

Experimenten häufiger auf diese Art der Behandlung zurückgegriffen um die nicht-sezernierten CLU-Proteine zu erforschen.

Tab. 4.1: Densitometrische Auswertung repräsentativer Western-Blots. Die analysierten Proben waren MG-132 behandelte HEK-293 Gesamtzelllysate, welche nach SDS-PAGE und Western-Blot mit dem Antiserum *sc-6419* inkubiert wurden (analog zu Abb. 4.1 C) Die detektierten, CLU-spezifischen Banden wurden densitometrisch ausgewertet und die Farbdichte nicht-sezernierter CLU-Formen zur Farbdichte der gesamten zellassozierten CLU-Formen prozentual ausgedrückt. Angegeben sind die durch Densitometrie ermittelten Werte (dimensionslos) von fünf repräsentativen Western-Blots.

	Blot 1	Blot 2	Blot 3	Blot 4	Blot 5	Median
<i>gesamtes zellassoziertes CLU</i>	128109,3	95594,3	123655,0	111257,5	44476,3	100618,48
<i>nicht-sezerniertes CLU</i>	5336,5	1872,2	4835,4	6465,3	908	3883,48
<i>Anteil nicht-sezerniertes CLU</i>	4,17%	1,96%	3,92%	5,81%	2,04%	3,57% (± 1,61%)

4.2 Analyse der endogen exprimierten Clusterin-mRNA-Varianten

Um das Auftreten und die Biogenese der nicht-sezernierten CLU-Formen genauer charakterisieren zu können, war es erforderlich eine Analyse der einzelnen CLU-mRNA Varianten durchzuführen (vgl. 1.3.1, Abb. 1.1). Dabei sollte zuerst der Transkriptionsstart von Variante 1 bestimmt werden, da es diesbezüglich einige Kontroversen gibt. Wie bereits geschildert (vgl. 1.3.2) wird seit einem *NCBI-GenBank*-Update eine RefSeq für Variante 1 geführt (NM_001831.3), deren Exon 1 die TATA-Box-Sequenz sowie ein zusätzlich Startcodon *upstream* des sCLU-Startcodons enthält. Dieses Codon wird als Translationsstartpunkt für nicht-sezernierte CLU-Formen diskutiert (vgl. 1.4.1.1). Für die folgenden Experimente wurde weiterhin ein Variante 1 [Δ ex2]-spezifischer *forward*-Primer entworfen und verifiziert sowie anschließend die Expression aller bekannten CLU-mRNAs in ungestressten und gestressten Zellen quantitativ analysiert.

4.2.1 Ermittlung des Transkriptionsstarts von Variante 1

Um das 5'-Ende der mRNA-Variante 1 zu bestimmen, wurde eine 5'-RACE mit revers-transkribierter Gesamtzell-RNA aus HEK-293-Zellen durchgeführt (vgl. 3.4.6.3). Die erste Amplifikationsrunde ergab noch mehrere PCR-Produkte (Abb. 4.2 A, PCR 1). Nach einer zweiten Amplifikationsrunde mit je einem von drei möglichen *reverse*-Primern konnte dann ein PCR-Produkt isoliert werden, welches das exakte 5'-Ende von CLU Variante 1 aufwies (Abb. 4.2 A, *). Ein analoges PCR-Produkt wurde auf die gleiche Weise aus verschiedensten Zelllinien amplifiziert (Abb. 4.2 B, *). Durch anschließende Sanger-Sequenzierung und Alignment der gewonnenen Sequenzen gegen die RefSeq NM_001831.3 wurde ersichtlich, dass der Transkriptionsstart von Variante 1 genau 23 nt *downstream* der TATA-Box liegt, also dem klassischen Fall einer von RNA-Polymerase II transkribierten mRNA entspricht. Einen ähnlichen Transkriptionsstart weisen etliche, nicht als RefSeq geführte *NCBI-GenBank*-Einträge (z.B. BP211675) auf. Auch Wong *et al.* stellten 1994 einen ähnlichen Transkriptionsstart fest (Abb. 4.2 C).

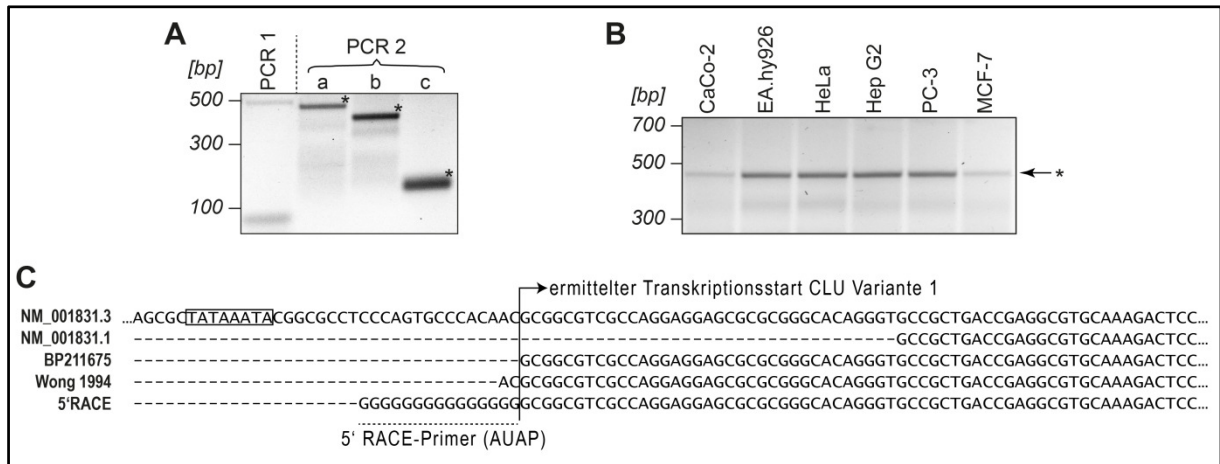


Abb. 4.2: 5'-RACE-Analyse von CLU-mRNA-Variante 1. (A) Gesamtzell-RNA wurde aus HEK-293 extrahiert und revers transkribiert. Das Agarosegel zeigt das Ergebnis der 5'-RACE. Nach der ersten Amplifikationsrunde (PCR 1) sind noch zwei DNA-Banden, nach der zweiten Amplifikationsrunde (PCR 2), welche jeweils mit einem von drei verschiedenen *reverse*-Primern (a = CLU34/36-R2, b = ApoJ-hum-Lesk-R, c = CLU36-hum-qPCR-R) angesetzt wurde, je ein spezifisches DNA-Fragment (*) erkennbar. Diese zeigten nach Sequenzierung das komplette 5'-Ende von CLU-mRNA-Variante 1 auf. (B) Das gleiche PCR-Produkt wurde nach derselben Methode von RNA aus verschiedensten Zelllinien amplifiziert. Der *reverse*-Primer war hier CLU34/36-R2. (C) Alignment der via 5'-RACE erhaltenen Sequenz gegen die RefSeqs NM_001831.3 und NM_001831.1. NM_001831.3 beinhaltet die TATA-Box Sequenz (Kasten), welche bei NM_001831.1 noch nicht als Teil der CLU-Variante 1-mRNA geführt wurde (vgl. 1.3.2). Das eigentliche 5'-Ende der mRNA beginnt genau 23nt *downstream* der TATA-Box und ist damit gleich dem EST BP211675 und fast identisch mit dem von Wong *et al.* 1994 festgestellten Transkriptionsstart.

Bei der hier durchgeführten 5'-RACE wurden Primer verwendet, die auf Exon 8 bzw. Exon 4 binden und somit auf alle CLU-mRNA-Varianten passen. Während der PCRs entstanden jedoch ausschließlich Variante 1-spezifische PCR-Produkte. Dies deutet darauf hin, dass Variante 1 die dominante mRNA-Spezies in den Zellen ist. Dennoch war es möglich durch Anwendung eines NM_001831.3 spezifischen *forward*-Primers ein entsprechendes RT-PCR-Produkt von RNA aus HEK-293-Zellen zu amplifizieren, was wiederum die Expression von NM_001831.3 anzeigt (Abb. 4.3). Es muss also davon ausgegangen werden, dass die RefSeq NM_001831.3 zwar nicht gänzlich unzutreffend ist, jedoch nicht die dominant exprimierte Variante 1 repräsentiert. Da auch der vor NM_001831.3 geführte Datenbankeintrag aus dem Jahr 2004 (RefSeq NM_001831.1) nicht das korrekte 5'-Ende von Variante 1 wiedergibt, wird im Folgenden, sofern nicht explizit erwähnt, von Variante 1 mit dem hier ermittelten 5'-Ende ausgegangen (i.e. BP211675).

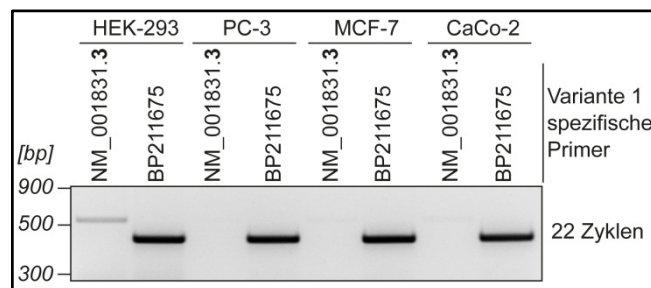


Abb. 4.3: Semi-quantitative RT-PCR von CLU-Variante 1. Gesamtzell-RNA wurde aus HEK-293, PC-3, MCF-7 oder CaCo-2-Zellen extrahiert und revers transkribiert. Das Agarosegel zeigt das Ergebnis einer sqPCR, die mit Primer-Pärchen durchgeführt wurde, die entweder spezifisch für die CLU-Variante 1 NM_001831.3 oder für die Variante 1 (vgl. Tab. 8.3) mit dem hier detektierten 5'-Ende (BP211675) waren. Es ist erkennbar, das letztere in allen untersuchten Zelllinien die dominante Form von Variante 1 darstellt. Dennoch wird NM_001831.3 von HEK-293-Zellen in äußerst geringen Mengen exprimiert.

4.2.2 *Alternatives Splicing von Variante 1*

Das alternative Splicing von Variante 1 führt zu einer mRNA, der das Exon 2 fehlt (Variante 1 [Δ ex2]). Diesbezüglich kam es zu einigen Kontroversen, da die Existenz von Variante 1 [Δ ex2] nicht eindeutig geklärt werden konnte (vgl. 1.3.3, 1.4.1.2). Ein Grund hierfür ist, dass keine verifizierten Primer bekannt sind, die zu einer eindeutigen Identifikation des Exon 2-*skippings* herangezogen werden könnten. Da Variante 1 [Δ ex2] potentiell zur Biogenese nicht-sezernierter CLU-Formen beitragen könnte, war ein Ziel dieser Arbeit, solche Primer zu kreieren. Dies ist weiterhin unerlässlich um entsprechende quantitative mRNA-Analysen durchführen zu können (vgl. 4.2.3).

Ein Exon 2-*skipping* von Variante 1 ließ sich durch eine RT-PCR mit Primern, die ein Exon 2-übergreifendes Amplikon (z.B. zwischen Exon 1a und Exon 4) einschließen, nur schwer überprüfen, da das Produkt, das die Exon 2-enhaltende Variante 1 repräsentiert, stets sehr dominant war. So könnte es die exponentielle Amplifikation des kürzeren PCR-Produkts, das Variante 1 [Δ ex2] repräsentiert, unterdrücken. Dennoch gelang es, durch eine 40-Zyklen-RT-PCR von mRNA aus MG-132-behandelten PC-3 ein PCR-Produkt zu identifizieren, das mit Variante 1 [Δ ex2] korrespondiert (Abb. 4.4 A). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden fünf Variante 1 [Δ ex2]-spezifische *forward*-Primer entworfen, die die Exon 1a/Exon 3-Grenze überspannen (F2 bis F6, vgl. Anhang Tab. 8.3). Das 5'-Ende der Primer ist mit dem Ende von Exon 1a und das 3'-Ende der Primer mit dem Anfang von Exon 3 komplementär, wobei sich die Sequenz von einem Primer zum nächsten immer um genau ein Nukleotid in Richtung Exon 3 verschiebt (Abb. 4.4 B). Anschließend wurde jeweils einer dieser *forward*-Primer mit einem Exon 4-spezifischen *reverse*-Primer kombiniert und eine stringente PCR (60°C Annealingtemperatur, 30-Zyklen) mit Variante 1-cDNA als Matrize durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Primer F2, F3 und F4 trotz Sequenzungenauigkeit am 3'-Ende die Amplifikation eines ca. 400 bp großen PCR-Produkts ermöglichen, welches immer noch das Exon 2 beinhaltet. Primer F6 hingegen führt zu einem falsch positiven Ergebnis, da ein ca. 270 bp großes PCR-Produkt entsteht, das nicht mehr das Exon 2 enthält, obwohl als Matrize die Exon 2-enhaltende cDNA von Variante 1 eingesetzt wurde. Die PCR mit Primer F5 führte zu keiner DNA-Amplifikation, d.h. der Primer hybridisierte nicht mit Variante 1-cDNA, was in diesem Fall wünschenswert war (Abb. 4.4 C). Im nächsten Schritt wurde erneut eine PCR durchgeführt, diesmal jedoch neben einer fixen Menge an Variante 1-cDNA (200 pg) zusätzlich unterschiedliche Mengen an Variante 1 [Δ ex2]-cDNA (200, 80, 20, 2 oder 0,2 pg) als Matrize eingesetzt. Die Verwendung von Exon 1a-spezifischem *forward* und Exon 4-spezifischem *reverse*-Primer führte bei niedrigeren Variante 1:Variante 1 [Δ ex2]-Verhältnissen ($\leq 10:1$) zu zwei Amplifikaten (ca. 400 und 270 bp). Bei Verhältnissen über 10:1 wurde die Amplifikation des 270 bp-Produkts komplett unterdrückt (Abb. 4.4 D, oberes Gelbild). Hingegen führte die Kombination aus Exon 1a/Exon 3-überspannendem F5 *reverse*-Primer und Exon 4-spezifischem *reverse*-Primer in allen Fällen ausschließlich zur Amplifikation des Variante 1 [Δ ex2]-spezifischen, 270 bp großen PCR-Produkts (Abb. 4.4 D, unteres Gelbild). Diese Ergebnisse beweisen die Spezifität des Primerpärchens, sodass es zuverlässig zur Identifikation und Quantifizierung von Variante 1 [Δ ex2] bei RT-PCR-Analysen eingesetzt werden kann. So konnte die Existenz von Variante 1 [Δ ex2] spezifisch mittels RT-PCR von RNA aus MG-132-behandelten HEK-293 oder PC-3-Zellen nachgewiesen werden, ohne dabei unspezifische Produkte zu generieren (Abb. 4.4 E).

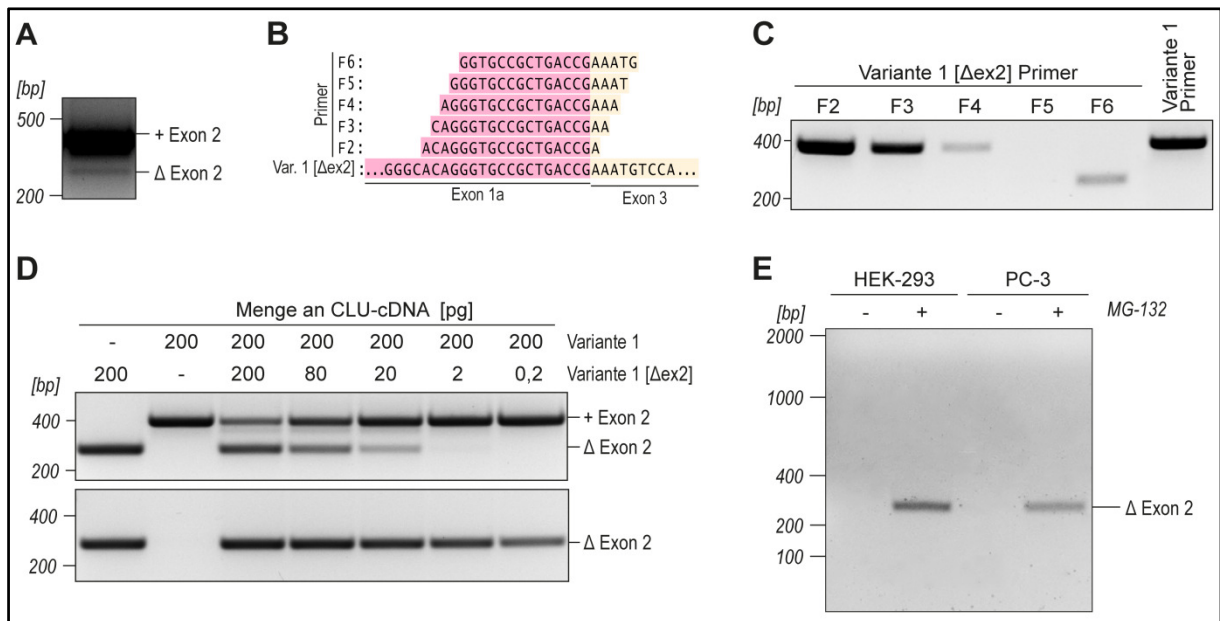


Abb. 4.4: Validierung von Variante 1 [Δex2] spezifischen Primern. (A) Gesamtzell-RNA wurde aus MG-132-behandelten PC-3-Zellen (vgl. 3.1.2) extrahiert und revers transkribiert. Das Agarosegel einer 40 Zyklen umfassenden sqPCR mit Variante 1-spezifischen Primern (vgl. Tab. 8.3) zeigt neben dem dominanten, Exon 2-enthaltendem PCR-Produkt noch ein zweites, das der Sequenz von CLU-Variante 1 ohne Exon 2 (Δ Exon 2) entspricht. (B) Um eine spezifische RT-PCR von Variante 1 [Δex2] zu ermöglichen, wurden mehrere *forward*-Primer synthetisiert, welche die Exon 1/Exon 3-Grenze der mRNA/cDNA überspannen (F2 bis F6). (C) Das Agarosegel zeigt eine PCR mit den verschiedenen Variante 1 [Δex2]-spezifischen Primern (vgl. Tab. 8.3). Als Matrize wurde Variante 1 (mit Exon 2) in pcDNA6 verwendet. Nur durch Primer F5 findet auch nach 40 Zyklen keine Amplifikation statt, was in diesem Fall wünschenswert ist. (D) Agarosegele von PCRs mit Variante 1-spezifischen Primern (oben) oder Primer F5+CLU34/36-R2 (unten) und verschiedenen Gemischen von Variante 1- und Variante 1 [Δex2]-cDNA (jeweils in pcDNA6) als Matrize. Auch bei einem 1000:1 Verhältnis von Variante 1: Variante 1 [Δex2] wird durch die Kombination Primer F5+CLU34/36-R2 ausschließlich das Variante 1 [Δex2]-spezifische PCR-Produkt amplifiziert. (E) Agarosegel einer sqPCR mit Primer F5+CLU34/36-R2 und revers transkribierter RNA aus HEK-293 bzw. PC-3 Zellen als Matrize. Auch hier wird nach 40 Zyklen ausschließlich das Variante 1 [Δex2]-spezifische DNA-Fragment amplifiziert. Die PCR-Produkte aus (A), (D) und (E) wurden per Sanger-Sequenzierung überprüft.

4.2.3 Quantitative Analyse der verschiedenen Clusterin-mRNA-Varianten

Wie bereits gezeigt, unterscheidet sich das Ausmaß der CLU-Expression in verschiedene Zelllinien auf Zellstress hin (vgl. 4.1). Zunächst sollte geklärt werden, ob die Menge an CLU-mRNA mit dem Proteingehalt der MG-132-behandelten Zellen korreliert. Dazu wurden sowohl sqPCRs als auch qPCRs mit Primerpärchen durchgeführt, die jeweils spezifisch für eine der verschiedenen CLU-mRNA-Varianten sind. Diese waren entweder aus der Literatur bekannt (Andersen *et al.*, 2007; Schepeler *et al.*, 2007) oder wurden eigens für diese Analysen entworfen (vgl. 4.2.2). Zudem waren alle für die qPCRs verwendeten Primerpärchen validiert, d.h. sie produzieren nur ein Amplifikat ausgehend von revers transkribierter Gesamtzell-mRNA. Dies wurde wiederum durch Agarose-Gelelektrophorese und Schmelzkurvenanalyse überprüft (Daten nicht gezeigt). Es sei darauf hingewiesen, dass aufgrund der Größe der entstehenden PCR-Fragmente keine Quantifizierung der Expression von Variante 1 NM_001831.3 durchgeführt werden konnte.

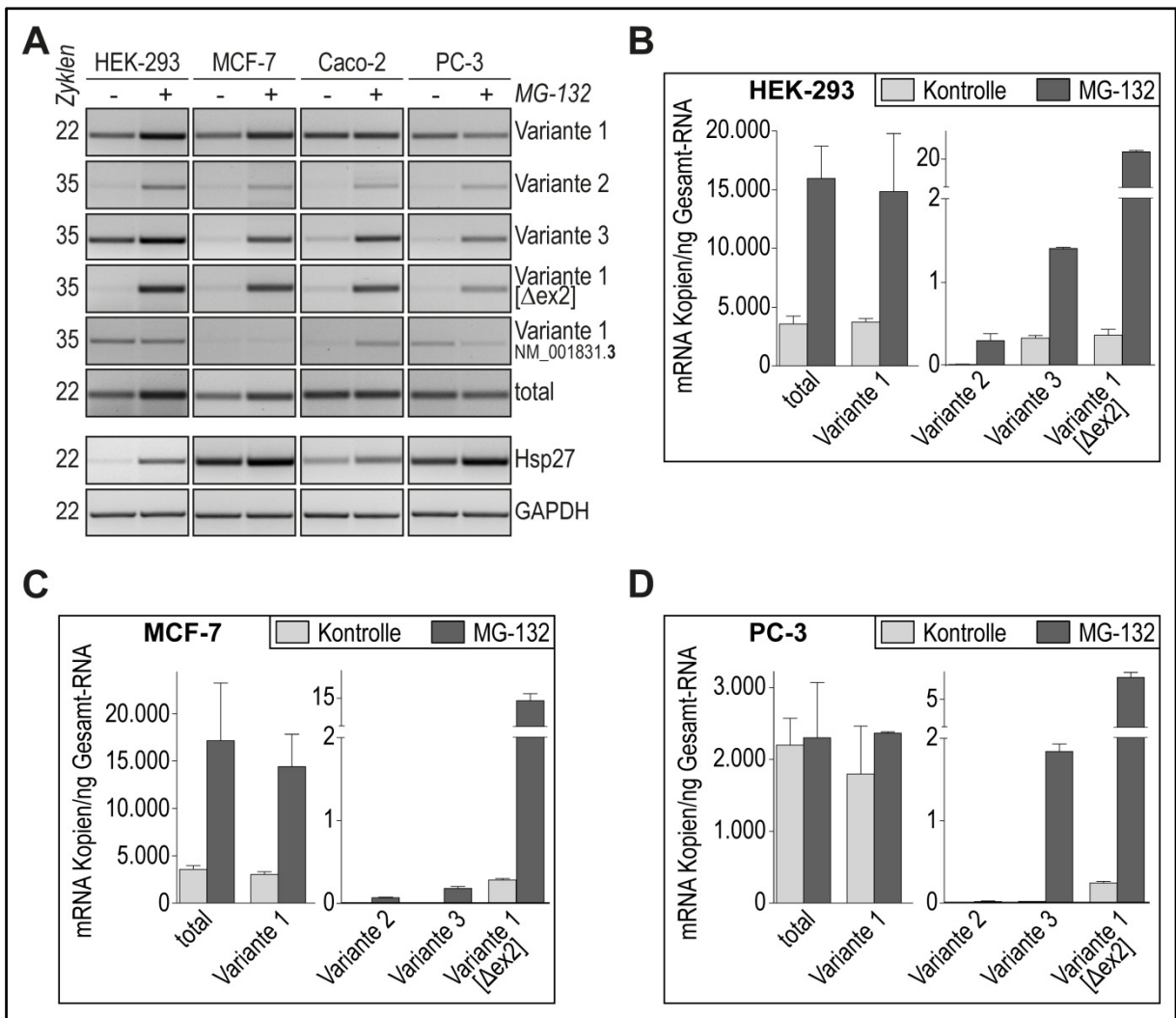


Abb. 4.5: Absolute Quantifizierung distinkter CLU-mRNA-Varianten. Die RT-PCRs wurden mit revers transkribierter RNA aus mit DMSO- oder mit 10 μ M MG-132-behandelten HEK-293, PC-3, MCF-7 oder Caco-2-Zellen (vgl. 3.1.2) durchgeführt. **(A)** Die Agarosegele zeigen repräsentative sqPCRs ($n=3$). Zu beachten ist die unterschiedliche Anzahl an durchlaufenen PCR-Zyklen für die einzelnen zu analysierenden mRNAs. **(B-D)** Die Auswertung der qPCRs aus den einzelnen Zelllinien zeigt die Dominanz von CLU-mRNA-Variante 1, welche gleich der Menge an Gesamt-CLU-mRNA ist. Alle anderen mRNAs stellen unterrepräsentierte mRNAs dar. Die Menge an jeweiligem Transkript ist als Kopienzahl pro ng Gesamt-RNA ausgedrückt (Mittelwerte $\pm \sigma$, $n=3$). Die genauen Werte sind in **Tab. 4.2** aufgeführt. Die gewählten Primer-Kombinationen sind **Tab. 8.3** zu entnehmen.

Aus den Zelllinien HEK-293, MCF-7, Caco-2 und PC-3 wurde Gesamtzell-RNA extrahiert und nach reverser Transkription sqPCRs durchgeführt. Die daraus resultierende Gelelektrophorese belegt, dass die Menge an Gesamt-CLU-mRNA in MG-132-behandelten HEK-293 und MCF-7-Zellen ansteigt, nicht jedoch in Caco-2-Zellen. In PC-3-Zellen nimmt die CLU-mRNA-Menge durch MG-132 tendenziell eher ab (**Abb. 4.5 A, total**). Interessanterweise korreliert die Menge an Gesamt-CLU-mRNA ziemlich genau mit der Menge an Variante 1-mRNA (**Abb. 4.5 A, Variante 1**). Der Gehalt an Variante 2, Variante 3 und Variante 1 [Δex2] steigt in allen getesteten Zellen auf MG-132-Gabe hin an. Die Mengen bleiben jedoch weit hinter der von Variante 1 zurück, was sich in der erhöhten Anzahl an PCR-Zyklen niederschlägt, die benötigt wird, um ein Amplifikat zu erhalten. Eine Sonderstellung nimmt Variante 1 (NM_001831.3) ein, welche nur in äußerst geringem Maße exprimiert, in den verschiedenen Zelllinien aber unterschiedlich auf MG-132 hin reguliert wird (**Abb. 4.5 A, Variante 1 NM_001831.3**). Weiterhin deutet der

Anstieg an Hsp27-mRNA, einem klassischen, Hitzeschock-induzierten Transkript, auf das Vorhandensein einer zellulären Hitzeschockantwort in allen Ziellinien hin. Diese wird hier durch MG-132 ausgelöst. Die Anwendung spezifischer Primer für das Transkript des Haushaltgens von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) belegt den Einsatz stets gleicher Gesamtzell-RNA-Mengen als Matrix für die verschiedenen sqPCRs.

Tab. 4.2: Absolute Quantifizierung distinkter CLU-mRNA-Varianten. Die angegebenen Werte sind die aus den Ergebnissen der qPCRs errechneten Kopienzahlen der einzelnen mRNA-Varianten pro ng Gesamtzell-RNA mit jeweiliger Standardabweichung (n=3). Die Werte sind in grafischer Form in Abb. 4.5 B, C und D zu finden.

	total	Variante 1	Variante 2	Variante 3	Variante Δ ex2
HEK-293					
<i>Kontrolle</i>	3578,79 (\pm 654,63)	3734,40 (\pm 298,51)	0,02 (\pm 0)	0,33 (\pm 0,03)	0,37 (\pm 0,07)
<i>MG-132</i>	15972,92 (\pm 2758,29)	14844,53 (\pm 4933,24)	0,30 (\pm 0,08)	1,40 (\pm 0,01)	21,29 (\pm 0,26)
MCF-7					
<i>Kontrolle</i>	3564,61 (\pm 371,73)	3047,29 (\pm 271,51)	0,01 (\pm 0)	n.a.	0,28 (\pm 0,02)
<i>MG-132</i>	17177,47 (\pm 6088,87)	14422,98 (\pm 3424,23)	0,07 (\pm 0,01)	0,18 (\pm 0,03)	14,59 (\pm 1,2)
PC-3					
<i>Kontrolle</i>	2201,00 (\pm 373,39)	1795,42 (\pm 669,42)	n.a.	0,02 (\pm 0)	0,22 (\pm 0,02)
<i>MG-132</i>	2303,97 (\pm 767,4)	2366,68 (\pm 18,29)	0,02 (\pm 0)	1,84 (\pm 0,09)	5,80 (\pm 0,18)

Weiterführende qPCR-Analysen ließen Aussagen bezüglich der Kopienzahlen der verschiedenen CLU-Varianten zu. Diese wurden durch absolute Quantifizierung ermittelt, d.h. zu jedem qPCR-Set eine eigene Standardkurve mit definierten Mengen an entsprechenden cDNA-Plasmidkonstrukten als Referenz erstellt. Wie zu erwarten, macht Variante 1 in unbehandelten HEK-293 mit 3500 Kopien/ng Gesamt-RNA prinzipiell den Gesamtteil an CLU-mRNA aus. Die Kopienzahlen an Variante 2 und Variante 3 tragen zusammengenommen lediglich 0,009% zur Gesamt-CLU-mRNA bei. Ähnliche Beobachtungen konnten auch für MCF-7 und PC-3-Zellen gemacht werden (Abb. 4.5 B, C, D, helle Säulen). Variante 1 [Δ ex2] wird in allen untersuchten Zellen exprimiert, macht jedoch auch höchstens 0,01% der Gesamt-CLU-mRNA aus. Inkubation der Zellen mit MG-132 führt zu einem 5- bis 50-fachem Anstieg der Kopienzahlen von Variante 2, Variante 3 und Variante 1 [Δ ex2], dennoch tragen sie zusammengenommen nur lediglich 0,34% zum Gesamtanteil bei. Der Gehalt an Variante 1-mRNA erhöht sich nur in gestressten HEK-293 und MCF-7-Zellen, bleibt aber in PC-3-Zellen konstant, was wiederum mit dem Level an Gesamt-CLU-mRNA korreliert (Abb. 4.5 B, C, D, dunkle Säulen). Somit decken sich die Ergebnisse von sqPCR und qPCR sehr gut. Tab. 4.2 fasst die per qPCR ermittelten Werte zusammen. Es ist ersichtlich, dass die Messung einem gewissen Fehler unterliegt. Dieser fällt insbesondere bei den hoch exprimierten mRNA-Varianten ins Gewicht, lässt sich jedoch wegen der sehr sensitiven Methode nicht vermeiden.

Für Caco-2-Zellen konnte leider keine qPCR durchgeführt werden, da manche Primerpärchen hier unspezifische PCR-Amplifikate verursachten.

4.3 Ektopische Expression von Clusterin-cDNAs in HEK-293-Zellen

In Abschnitt 4.2 konnte die Aufregulation von CLU-mRNA nach Induktion einer Hitzeschockantwort, i.e. durch Behandlung mit MG-132 bestimmt sowie die Expression von Variante 1 [Δ ex2] in verschiedenen Zelllinien verifiziert werden (vgl. 4.2.2, 4.2.3). Im Folgenden sollte nun die Proteinexpression ausgehend von den einzelnen mRNA-Varianten untersucht werden. Insbesondere Variante 1 [Δ ex2] war dabei interessant, da sie potentiell zur Expression nicht-sezernierter CLU-Formen beitragen könnte. Um Proteinexpressionsanalysen ausgehend von den distinkten CLU-mRNA-Varianten durchführen zu können, wurden entsprechende cDNAs in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA6/V5-His kloniert. Dieser vermittelt zum einen die Expression der einklonierten cDNAs ausgehend vom konstitutiven Promotor des humanen Cytomegalievirus (CMV), zum anderen werden ein V5-Tag und ein His-Tag an den C-Terminus der entstehenden Proteine angefügt. Die Tags machen zusammen ein Molekulargewicht von 5 kDa aus und dienen der eindeutigen Identifikation der rekombinanten Proteine, d.h. alle rekombinanten CLU-Formen (im Folgenden mit dem Kürzel „-V5“ gekennzeichnet) sind um 5 kDa größer als die korrespondierenden, endogenen CLU-Formen. Für die transiente Expression wurden HEK-293-Zellen mit den Plasmiden transfiziert, nach 24 h Kultur das Gesamtzell-Protein extrahiert und Western-Blots durchgeführt. Die HEK-293-Zellen wurden gewählt, da sie alle CLU-mRNA-Varianten auch endogen exprimieren und daher die rekombinanten cDNAs ebenfalls korrekt prozessieren sollten.

4.3.1 Proteinexpression ausgehend von den verschieden Clusterin-cDNA-Varianten

Wie die Western-Blot-Analysen zeigen, führt die transiente Expression der cDNA-Varianten 1, 2 und 3, welche alle das Exon 2 mit der SSCR enthalten, zur Synthese und Sekretion von sCLU (Abb. 4.6, Spuren 3-6). Auffallend ist jedoch, dass, obwohl die Überexpression aller Varianten vom konstitutiven CMV-Promotor vermittelt wird, das Ausmaß der sCLU-Expression ausgehend von Variante 1 das von den Varianten 2 und 3 deutlich übersteigt. Dieses Phänomen ist auf Exon 1-uORFs zurückzuführen und wird unter 4.3.2 eingehend analysiert. Außerdem ist zu erwähnen, dass sowohl die Expression von Variante 3 als auch von Variante 1 (NM_001831.3) zur Synthese von sCLU führt obgleich beide mRNAs/cDNAs *upstream* des sCLU-Startcodons noch ein weiteres Startcodon auf Exon 1 besitzen (vgl. 1.3.1 und Abb. 1.1). Weiterführende Analysen hierzu sind unter 4.3.3 zu finden.

Mit Variante 1 [Δ ex2]-transfizierte Zellen sezernieren kein sCLU, exprimieren jedoch ein nicht-sezerniertes 45 kDa-V5-Protein, welches ebenfalls, in geringerem Maße, bei den mit Variante 1, 2 und 3 transfizierten Zellen zu beobachten ist (Abb. 4.6, Spuren 3-7). Wie sich im Folgenden herausstellen wird, handelt es sich dabei in allen Fällen um CLU₃₄₋₄₄₉, welches ausgehend vom Exon 3-Startcodon translatiert wird (vgl. 4.4.1). Zudem ist eine nicht-sezernierte 50 kDa-V5 Bande zu erkennen, die nur von den Varianten 1, 2 und 3 gebildet wird (Abb. 4.6, Spuren 3-6). Sowohl die 50 als auch die 45 kDa großen Proteinbanden korrelieren, ausgehend von ihrem Molekulargewicht, mit den endogenen nicht-

sezernierten CLU-Formen, welche in gestressten Zelllinien beobachtet wurden (vgl. 4.1). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass sie bei den hier durchgeführten Experimenten bereits durch einfache Überexpression der cDNAs auftauchen, d.h. keine Zellstress-Behandlung von Nöten ist. Schließlich lässt sich eine 60 kDa-V5 Bande ausmachen, welche ausschließlich bei Variante 1 (NM_001831.3) überexprimierenden Zellen (Abb. 4.6, Spur 6, *) erkennbar ist. Die Biogenese der hier erkennbaren CLU-Proteinformen wird im Laufe dieser Arbeit aufgeklärt.

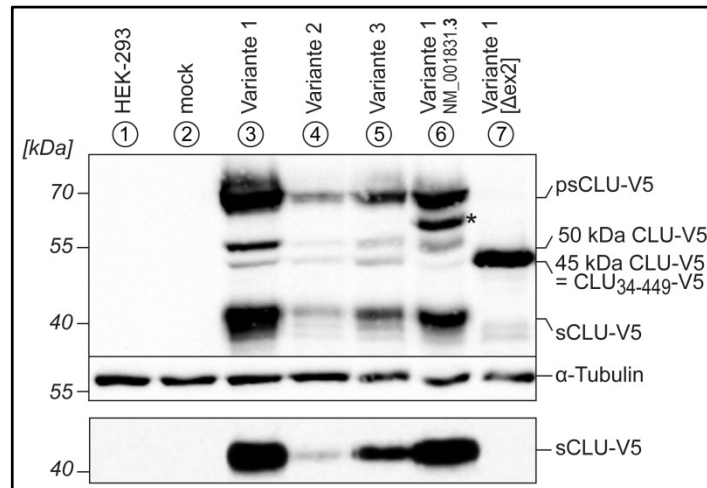


Abb. 4.6: Expression von CLU-V5 ausgehend von rekombinanten cDNAs. Zelllysate (je 50 μ g, oben) und Zellkulturüberstände (unten) von HEK-293-Zellen, welche die angegebenen cDNAs transient exprimieren, wurden per Western-Blots analysiert. Kontrollzellen waren zum einen untransfiziert (HEK-293) oder mit pcDNA transfiziert (mock). Transfektion mit den CLU-Varianten 1, 2 und 3 führt zur Synthese und Sekretion von sCLU-V5 (Spuren 3-6). Weiterhin ist bei diesen Zelllysaten auch eine 50 kDa große CLU-V5-Form erkennbar. Variante 1 [Δ ex2] (Spur 6) codiert für ein nicht-sezerniertes, 45 kDa großes Protein (CLU₃₄₋₄₄₉-V5), welches ebenfalls ausgehend von den Varianten 1-3 in geringen Mengen gebildet wird. Ein 60 kDa CLU-V5-Protein (*) taucht nur im Zelllysate von mit Variante 1 (NM_001831.3) transfizierten Zellen auf. Die Proteine wurden mit dem *Anti-V5 Antibody* nachgewiesen.

4.3.2 Die Expression von sezerniertem Clusterin ausgehend von Variante 2 und Variante 3 wird durch distinkte uORFs gehemmt

Wie bereits erwähnt, wird die sCLU-Synthese ausgehend von den Varianten 2 und 3 durch uORFs beeinflusst. Genau genommen sind auf Exon 1b vier, auf Exon 1c fünf geschlossene uORFs vorhanden (Abb. 4.7, vgl. auch Abb. 1.1 B). Um deren Einfluss auf die sCLU-Translation zu erfassen, wurden beide cDNA-Varianten vom 5'-Ende her sukzessive um je einen uORF verkürzt, d.h. die so modifizierten cDNAs beginnen unmittelbar *downstream* des Startcodons des jeweiligen uORF. Die anschließende Expressionsanalyse per Western-Blot zeigte, dass im Falle von Variante 2 bereits der Ausschluss des am weitesten *upstream* gelegenen uORF einen massiven Anstieg in der sCLU-Synthese bewirkt (Abb. 4.7 A, Δ <-274, *). Bei Variante 3 hingegen wurde ähnliches durch Ausschluss des am weitesten *downstream* gelegenen uORFs erreicht (Abb. 4.7 B, Δ <-36, **). Es scheinen also in beiden Fällen genau jener uORF eine Blockade der sCLU-Synthese auszulösen, dessen Leserahmen am längsten ist und das sCLU-Startcodon überspannt. Um diese Ergebnisse zu verifizieren wurden die Startcodons der entsprechenden uORFs mit Punktmutationen versehen. Erneute Expressionsanalysen beweisen, dass ein Nukleotidaustausch im Startcodon des längsten uORF bei sonst unmodifizierter Variante 2 bzw. Variante 3 (Abb. 4.7 C, Spur 4 bzw. Spur 6) einen Anstieg in der sCLU-Synthese bewirkt, die sich nun der sCLU-Synthese ausgehend von Variante 1 angleicht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Translation des Hauptleserahmens, also dem sCLU-Leserahmen, im Falle von Variante 2 und Variante 3 durch je einen uORF auf Exon 1 gehemmt wird. Zudem handelt es sich bei beiden mRNAs um unterrepräsentierte Spezies (vgl. 4.2.3), sodass deren physiologische Relevanz bezüglich der Biosynthese von CLU rudimentär bis irrelevant zu sein scheint.

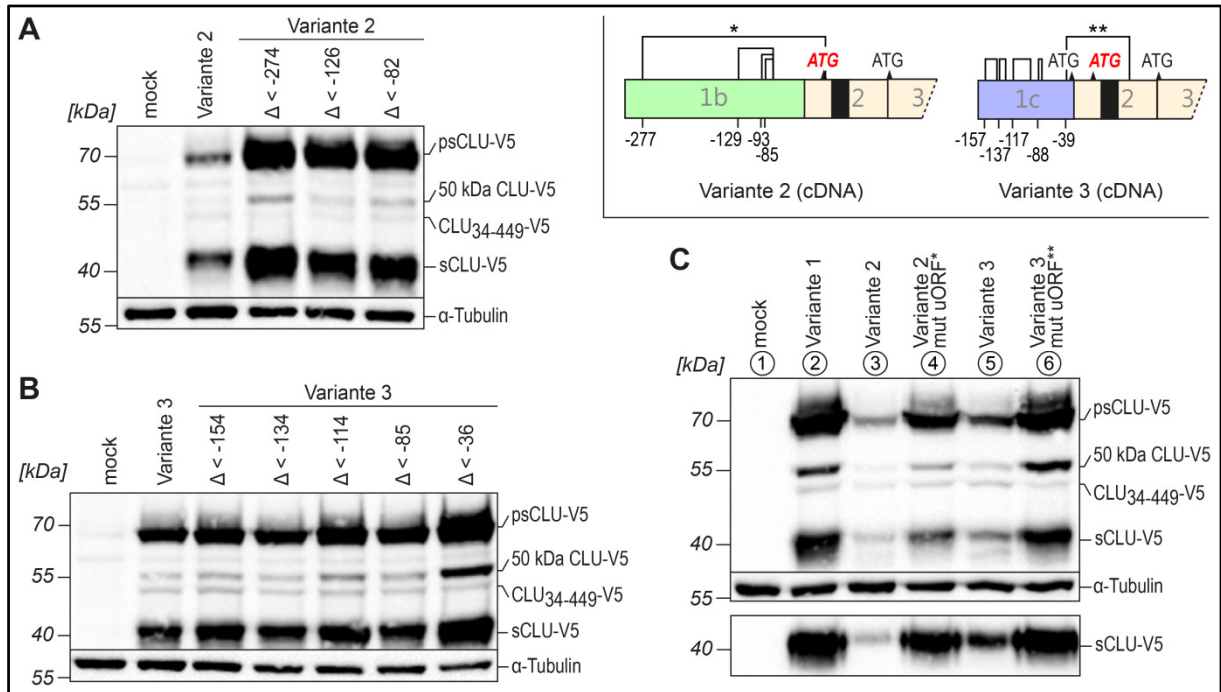


Abb. 4.7. Upstream ORFs vermindern die Translation von sCLU ausgehend von den cDNA-Varianten 2 und 3. Gezeigt sind Western-Blots von Gesamtzelllysaten (je 50 µg) und Zellkulturüberständen (C, unterer Blot) von HEK-293-Zellen. Die CLU-V5-Expression wurde mit dem *Anti-V5 Antibody* nachgewiesen. Die Grafik zeigt das 5'-Ende der mRNA-Varianten 2 und 3 mit den uORFs. **(A)** Die Zellen exprimierten entweder unmodifizierte Variante 2-cDNA oder 5'-verkürzte Formen, sodass jeweils ein uORF ausgeschlossen ist. Sobald der erste uORF (* in Grafik) deletiert ist, steigt die sCLU-Synthese massiv an. **(B)** Analog gilt dies bei Variante 3 für den letzten uORF (** in Grafik). **(C)** Das gleiche Ergebnis wird erreicht, wenn die Zellen punktmutierte Formen von Variante 2 bzw. Variante 3 exprimieren, bei denen jeweils das Startcodon für den inhibierenden uORF modifiziert ist (Spuren 4+6). Die Menge an sCLU ist vergleichbar mit der von Variante 1 aus gebildeten sCLU-Menge (Spur 1).

4.3.3 Translationsinitiation an alternativen Startcodons auf Exon 1 führt zur Expression von sCLU

Translationsinitiation an den *upstream* des sCLU-Startcodons gelegenen Startpunkten auf Exon 1c von Variante 3 sowie auf Exon 1a von Variante 1 (NM_001831.3) wird zzt. als Hypothese zur Entstehung nicht-sezernierter CLU-Formen diskutiert (vgl. 1.4.1.1). Wie jedoch gezeigt, vermitteln beide Varianten eine Synthese von sCLU (vgl. 4.3.1). Um den Einfluss der Exon 1-Startcodons zu untersuchen, wurden punktmutierte cDNAs von Variante 3 bzw. Variante 1 (NM_001831.3) hergestellt, welche entweder eine Nukleotidaustausch im Exon 1-Startcodon, im sCLU-Startcodon oder in beiden besitzen. Expression dieser cDNAs und anschließende Western-Blot-Analysen belegen, dass nur im letzten Fall, also wenn beide Startcodons modifiziert wurden, die sCLU-Synthese ausbleibt (Abb. 4.8 A, Spur 6, B, Spur 6). Die Expression von CLU₃₄₋₄₄₉-V5 und der 50 kDa CLU-V5-Form scheint jedoch nicht durch Modifikation der beiden Startcodons beeinflusst zu sein. Anders verhält sich die 60 kDa-CLU-Form, welche nur bei Expression von Variante 1 (NM_001831.3) erscheint (Abb. 4.8 B, Spur 3, *). Diese verschwindet, sobald das Startcodon auf Exon 1 modifiziert wird. Vermutlich handelt es sich bei dieser 60 kDa-Bande

um eine N-terminal verlängerte Form des sCLU-prä-Proteins, die nach Prozessierung im ER/Golgi-Kompartiment ebenfalls zum sCLU reift. Diese Annahme wird sich in weiteren Experimenten bestätigen, da sich auch das 50 kDa große sCLU-prä-Protein, welches standardmäßig vom sCLU-Startcodon aus synthetisiert wird, ähnlich verhält (vgl. 4.4.1).

Festzuhalten ist, dass die Exon 1-Startcodons auf Variante 3 und Variante 1 (NM_001831.3) primär die Synthese von sCLU vermitteln und somit nicht für die Expression nicht-sezernierter CLU-Formen in Frage kommen. Es soll an dieser Stelle auch nochmal darauf hingewiesen werden, dass die beiden genannten mRNA-Varianten unter physiologischen Bedingungen stark unterrepräsentierte mRNAs darstellen (vgl. 4.2.3).

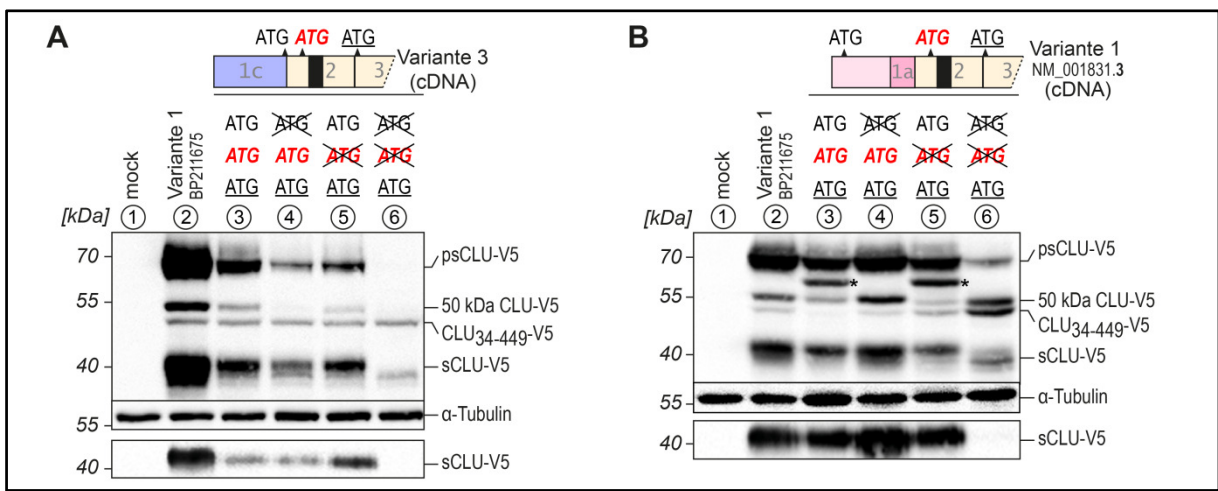


Abb. 4.8. Alternative Startcodons auf Exon 1 von Variante 3 und Variante 1 (NM_001831.3) initiieren die Synthese von sCLU. Gezeigt sind Western-Blots von Gesamtzelllysaten (je 50 µg) und Zellkulturüberständen (unterer Blot) von HEK-293-Zellen. Die CLU-V5-Expression wurde mit dem *Anti-V5 Antibody* nachgewiesen. Die Grafiken zeigen das 5'-Ende der cDNA-Varianten 3 und 1 (NM_001831.3) mit den einzelnen Startcodons. **(A)** Die Zellen exprimierten unmodifizierte (Spur 3) oder punktmutierte Formen von Variante 3 (Spuren 4-6). Modifizierte Startcodons sind über den Spuren entsprechend durchgestrichen. Weder die Modifikation des Exon 1-Startcodons (Spur 4) noch des sCLU-Startcodons (Spur 5) wirken sich negativ auf die sCLU-Syntheserate aus. Werden beide mutiert, so findet keine sCLU-Synthese mehr statt (Spur 6). **(B)** Ein analoger Befund wurde bei Zellen gemacht, die Variante 1 (NM_001831.3) exprimieren. Hier ist außerdem zu erkennen, dass die 60 kDa große, nicht-sezernierte CLU-Form (*, vgl. 4.3.1) durch Modifikation des Exon 1-Startcodons verschwindet und gleichzeitig die Expression von der 50 kDa-CLU-Form ansteigt (Spur 3 vs. Spur 4).

4.4 Charakterisierung der Biogenese nicht-sezernierter Clusterin-Isoformen

Mittels qPCRs konnte gezeigt werden, dass CLU-mRNA-Variante 1 die dominante CLU-mRNA-Spezies ist. Zudem zeigten Expressionsanalysen, dass von dieser mRNA hauptsächlich sCLU gebildet wird. Dennoch tauchten weitere Proteinformen auf, zum einen 45 kDa-CLU(-V5), welches auch von Variante 1 [Δ ex2] aus gebildet wird, zum anderen eine 50 kDa-CLU(-V5)-Spezies. Diese beiden Proteinformen korrespondieren mit den endogenen, nicht-sezernierten CLU-Formen, welche im Lysat gestresser Zellen zu beobachten sind und auf demselben Molekulargewicht migrieren (vgl. 4.1). Im Folgenden wird der Translationsstart dieser nicht-sezernierten CLU-Isoformen aufgeklärt und anschließend durch transiente Expression modifizierter Variante 1-cDNAs deren subzelluläre Lokalisation und deren Glykosylierungszustand gezeigt.

4.4.1 Nicht-sezernierte CLU-Isoformen entstehen durch alternative Translationsinitiation an drei verschiedenen Nukleotid-Tripletts

Als erstes sollte der Translationsstart der 45 kDa-CLU-V5 Form geklärt werden. Schnell zeigte sich durch Expression einer Variante 1-cDNA, die einen Nukleotidaustausch im Startcodon auf Exon 3 trägt, und anschließendem Western-Blot, dass die Translation der 45 kDa-CLU-V5 Form eben von diesem Codon aus startet (Abb. 4.9 C, Spuren 1 und 2). Somit werden bereits gemachte Annahmen, dass es sich bei dieser CLU-Isoform um CLU₃₄₋₄₄₉ handelt, bestätigt. CLU₃₄₋₄₄₉ wird ebenfalls von Variante 1 [Δ ex2] aus gebildet (vgl. 4.3.1).

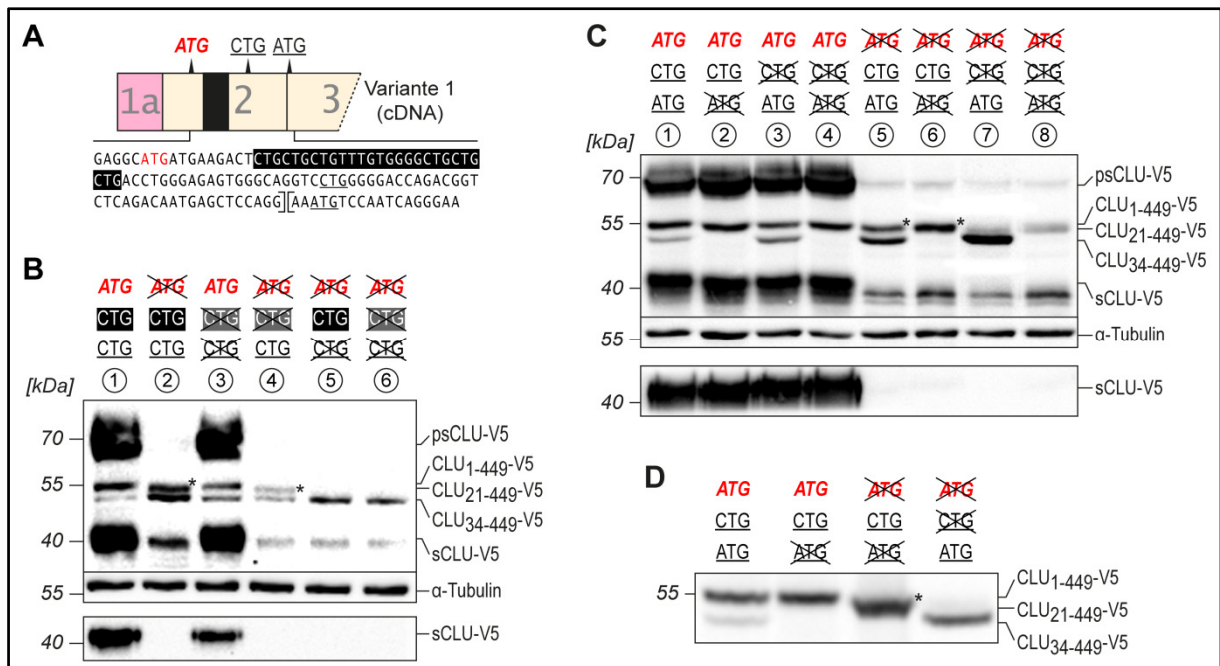


Abb. 4.9: Charakterisierung der Biogenese einzelner CLU-Isoformen. (A) Schematische Darstellung des 5'-Bereichs der Variante 1-CLU-cDNA. Die CTG-reiche SSCR ist schwarz hinterlegt, das sCLU Startcodon in roter Schrift dargestellt und das Exon 3-Startcodon sowie ein weiteres, *downstream* der SSCR gelegenes CTG-Startcodon unterstrichen. **(B-D)** Gezeigt sind Western-Blots von Gesamtzelllysaten (je 50 µg) und Zellkulturüberständen (B und C, unterer Blot) von HEK-293-Zellen. Die CLU-V5-Expression wurden mit dem *Anti-V5 Antibody* nachgewiesen. **(B)** Die Zellen exprimierten unmodifizierte (Spur 1) oder punktmutierte Formen von Variante 1 (Spuren 2-6). Modifizierte Startcodons sind über den Spuren entsprechend durchgestrichen. Bei modifiziertem sCLU-Startcodon bleibt die sCLU-Synthese aus (Spur 2). Dennoch ist in diesem Fall weiterhin eine 50kDa-Bande zu sehen (*), Spuren 2+4). Diese verschwindet erst, wenn sowohl sCLU-Startcodon und das *downstream* gelegene CTG-Codon mutiert sind. Die Modifikationen der CTGs innerhalb der SSCR zeigt keinen Effekt auf die Expression der CLU-Formen. **(C)** Analog zeigt sich, dass die 50kDa-Form zum einen aus CLU₁₋₄₄₉ besteht, dessen Expression mit intaktem sCLU-Startcodon korreliert (Spuren 2 und 4). Zum anderen verbirgt sich hinter der 50kDa Bande CLU₂₁₋₄₄₉, das vom *downstream* CTG aus translatiert wird (*, Spuren 5+6). CLU₃₄₋₄₄₉ wird vom Exon 3 Startcodon aus gebildet (Spur 7). **(D)** Die angegebenen Proben aus (C) wurden nochmals per SDS-PAGE aufgetrennt, bis die 55kDa-Markerbande fast das Ende des Trenngels erreichte. Durch die erhöhte Auftrennung in diesem Bereich ist eindeutig zu erkennen, dass CLU₂₁₋₄₄₉ (*) ein geringeres Molekulargewicht als CLU₁₋₄₄₉ aufweist.

Bezüglich der 50 kDa-CLU-V5-Form stellten sich zwei Fragen: 1) Stellt sie unprozessiertes, unglykosyliertes sCLU-prä-Protein (CLU₁₋₄₄₉) dar, welches das noch nicht ins ER transloziert wurde? Dies würde gut mit dem entsprechenden Molekulargewicht übereinstimmen. 2) Stellt sie ein Protein dar, welches durch Translationsinitiation an bisher noch nicht charakterisierten Codons *downstream* des sCLU-Startcodons auf Exon 2 gebildet wird? Um die erste Möglichkeit zu ergründen, wurde auf der Variante 1-cDNA eine Punktmutation im sCLU-Startcodon eingefügt und deren Expression analysiert. Die Modifikation hat ein Ausbleiben der sCLU-Biosynthese zur Konsequenz. Dennoch scheint auf den

ersten Blick die Biosynthese der 50 kDa-CLU-V5 Form davon nicht betroffen zu sein (Abb. 4.9 B, Spur 2, C, Spur 5). Eingehende Analysen mit längeren SDS-PAGEs zeigten jedoch, dass das nun sichtbare 50 kDa-V5-Protein ein minimal kleineres Molekulargewicht aufweist als, jenes, das bei noch intaktem sCLU-Startcodon gebildet wird (Abb. 4.9 D, *). Somit kann ein erstes Fazit gezogen werden: die 50 kDa-CLU-V5 Form ist eine Überlagerung aus zwei CLU-Spezies, von denen eine eng mit der sCLU-Biosynthese korreliert und somit wohl CLU_{1-449} repräsentiert. Dies erklärt auch das Wegfallen der 60 kDa-CLU-V5-Bande bei der Expression einer Exon 1-Startcodon-defizienten cDNA von Variante 1 (NM_001831.3), die in diesem Fall eine N-Terminal verlängerte Form von CLU_{1-449} darstellt (vgl. Abb. 4.8 B, Spur 6).

Bezüglich der Biogenese der zweiten 50 kDa-CLU-V5-Form kamen nur zusätzliche Translationsstartpunkte auf Exon 2 in Frage. Da sich auf der cDNA an dieser Stelle jedoch keine weiteren *in-frame* ATG-Tripletts finden, wurden CUG (CTG)-Tripletts als Startcodons postuliert. Solche Translationsstarts sind zwar unkonventionell, jedoch nicht unbekannt (vgl. 1.4.1.1). CTG-Tripletts finden sich in größerer Anzahl auf Exon 2, wobei die meisten im Bereich der SSCR liegen, eines jedoch 21 nt *downstream* davon lokalisiert ist (Abb. 4.9 A, schwarzer Bereich bzw. CTG). Insbesondere das *downstream* gelegene CTG-Codon weist eine sehr gute Kozak-Konsensussequenz auf (vgl. 5.3.3). In weiteren Experimenten wurden diese CTG-Tripletts durch TTG-Tripletts ersetzt und zwar entweder nur die CTGs der SSCR, nur das *downstream* CTG oder beide. Dies geschah in jedem Fall mit zusätzlich modifiziertem sCLU-Startcodon, sodass von den Zellen kein CLU_{1-449} mehr gebildet werden konnte (Abb. 4.9 B, Spuren 4-6). Die Expressionsanalyse zeigte, dass die 50 kDa-CLU-V5-Form nur bei modifiziertem *downstream* CTG verschwindet, der Translationsstart also definitiv durch dieses Tripletts definiert wird (Abb. 4.9 B, Spuren 5 und 6, C, Spuren 7 und 8). Das entstehende CLU-Protein umfasst demnach die AS 21-449 ausgehend vom sCLU prä-Protein (CLU_{21-449}).

Somit werden beide eingangs gemachten Hypothesen gestützt, da es sich bei dem 50 kDa-CLU-Protein sowohl um unprozessiertes CLU_{1-449} als auch um CLU_{21-449} handelt, das von einem unkonventionellen CUG-Tripletts aus translatiert wird.

4.4.2 Nicht-sezernierte CLU-Isoformen sind im Cytosol lokalisiert, unglykosyliert und unterliegen teilweise post-translationaler Regulation

Aufgrund der gesammelten Erkenntnisse konnten die distinkten CLU-Isoformen, i.e. psCLU/sCLU, CLU_{1-449} , CLU_{21-449} , und CLU_{34-449} durch Verwendung der modifizierten (punktmutierten) Variante 1-cDNAs aus 4.4.1 separat voneinander exprimiert werden. Eine Ausnahme stellt CLU_{1-449} dar, welches eine Vorstufe von psCLU/sCLU ist und demnach nicht einzeln exprimiert werden kann.

4.4.2.1 Fraktionierung von Gesamtzelllysat

Um die Verteilung der identifizierten CLU-Isoformen auf subzelluläre Kompartimente untersuchen zu können, wurde zuerst eine Zellfraktionierung ausgehend von Gesamtzelllysat aus HEK293-Zellen, die unmodifizierte Variante 1-cDNA überexprimierten, durchgeführt. So ließen sich eine cytosolische, eine ER/Golgi-spezifische und eine Kernfraktion voneinander trennen. Diese wurden anschließend einer

Western-Blot-Analyse unterzogen. Der CLU-spezifische Western-Blot zeigt, dass alle nicht-sezernierten CLU-Formen, i.e. CLU₁₋₄₄₉, CLU₂₁₋₄₄₉, und CLU₃₄₋₄₄₉, in der cytosolische Fraktion angereichert sind. Ein kleiner Teil CLU₁₋₄₄₉ war auch in der ER/Golgi-Fraktion erkennbar. Wie zu erwarten, findet sich sCLU und psCLU größtenteils in der ER/Golgi-Fraktion, wobei auch Teile in cytosolischer und Kernfraktion zu finden sind. Dies lässt sich jedoch auf eine unsaubere Extraktion dieser Zellfraktion zurückführen, wie an der Verteilung des ER-ständigen Proteins Calreticulin erkennbar ist. Die Verteilung von GAPDH und Histon H3 wurde als Maß für die Reinheit von cytosolischer und Kernfraktion herangezogen, welche mit zufriedenstellender Reinheit extrahiert werden konnten (Abb. 4.10).

Diese Ergebnisse lieferten bereits erste Hinweise darauf, dass es sich bei den nicht-sezernierten CLU-Formen um cytosolische und nicht, wie oftmals behauptet, um nukleäre Isoformen des Proteins handelt (vgl. 1.4.2). Dies bestätigen auch die folgenden immunocytochemischen Untersuchungen.

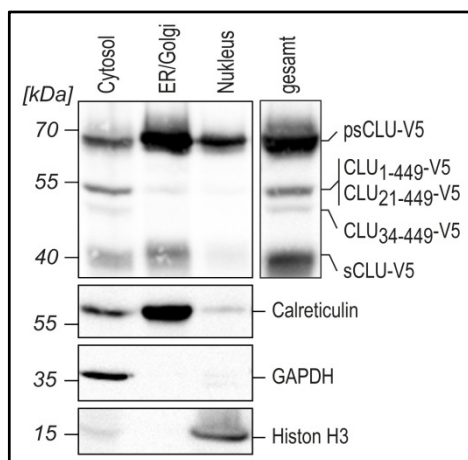


Abb. 4.10: Bestimmung der Lokalisation einzelner CLU-Isoformen über Zellfraktionierung. Die Western-Blots zeigen das Ergebnis der Fraktionierung von Gesamtzelllysat aus CLU-Variante 1-cDNA überexprimierenden HEK-293-Zellen. Mit den unterschiedlichen Extraktionspuffern konnte eine cytosolische, eine ER/Golgi- und eine Kernfraktion (Nukleus) isoliert werden. Der CLU-V5-spezifische Western-Blot wurde mit *Anti-V5 Antibody* durchgeführt. Western-Blots von Calreticulin, GAPDH und Histon H3 dienten als Referenz für die ER/Golgi-, für die cytosolische und für die Kernfraktion.

4.4.2.2 Immuncytochemie mittels Laser-Scanning-Mikroskopie Clusterin-überexprimierender Zellen

Um die subzelluläre Lokalisation der CLU-Isoformen per Immuncytochemie zu untersuchen, wurden die von modifizierten cDNAs gebildeten, distinkten CLU-Isoformen, untersucht. Zudem wurde unmodifizierte Variante 1 sowie Variante 1 [Δ ex2]-cDNA exprimiert.

Nach Transfektion der einzelnen cDNAs in HEK-293-Zellen und anschließender Paraformaldehyd-Fixierung konnten die Präparate mit einer Kombination aus V5-Antikörper und Cy3-Antikörper behandelt und so die CLU-V5-Lokalisation unter dem LSM visualisiert werden. Um in diesem Punkt exakte Aussagen machen zu können, wurden die Präparate zudem noch mit dem Farbstoff DAPI und den Alexa Fluor® 488-konjugierten Lektinen ConA bzw. WGA bearbeitet, welche spezifisch das Chromatin, das ER-Kompartiment mit Kernmembran bzw. den Golgi-Apparat mit Plasmamembran anfärben. Zu beachten ist, dass infolge der hier angewandten, lipidvermittelten Transfektionsmethode nicht alle Zellen eine CLU-Überexpression zeigten und dementsprechend auch Cy3-negative Zellen detektierbar waren. Die im Folgenden abgebildeten Aufnahmen zeigen repräsentative Zellen des jeweiligen Präparats in der mittleren Z-Ebene (Abb. 4.11). Von allen Aufnahmen wurden komplett animierte Bildabfolgen der Z-Ebenen, sogenannte *Z-stacks*, angefertigt, welche dieser Arbeit in Form digitaler .avi-Dateien auf CD-ROM angefügt sind (vgl. Anhang 8.4)

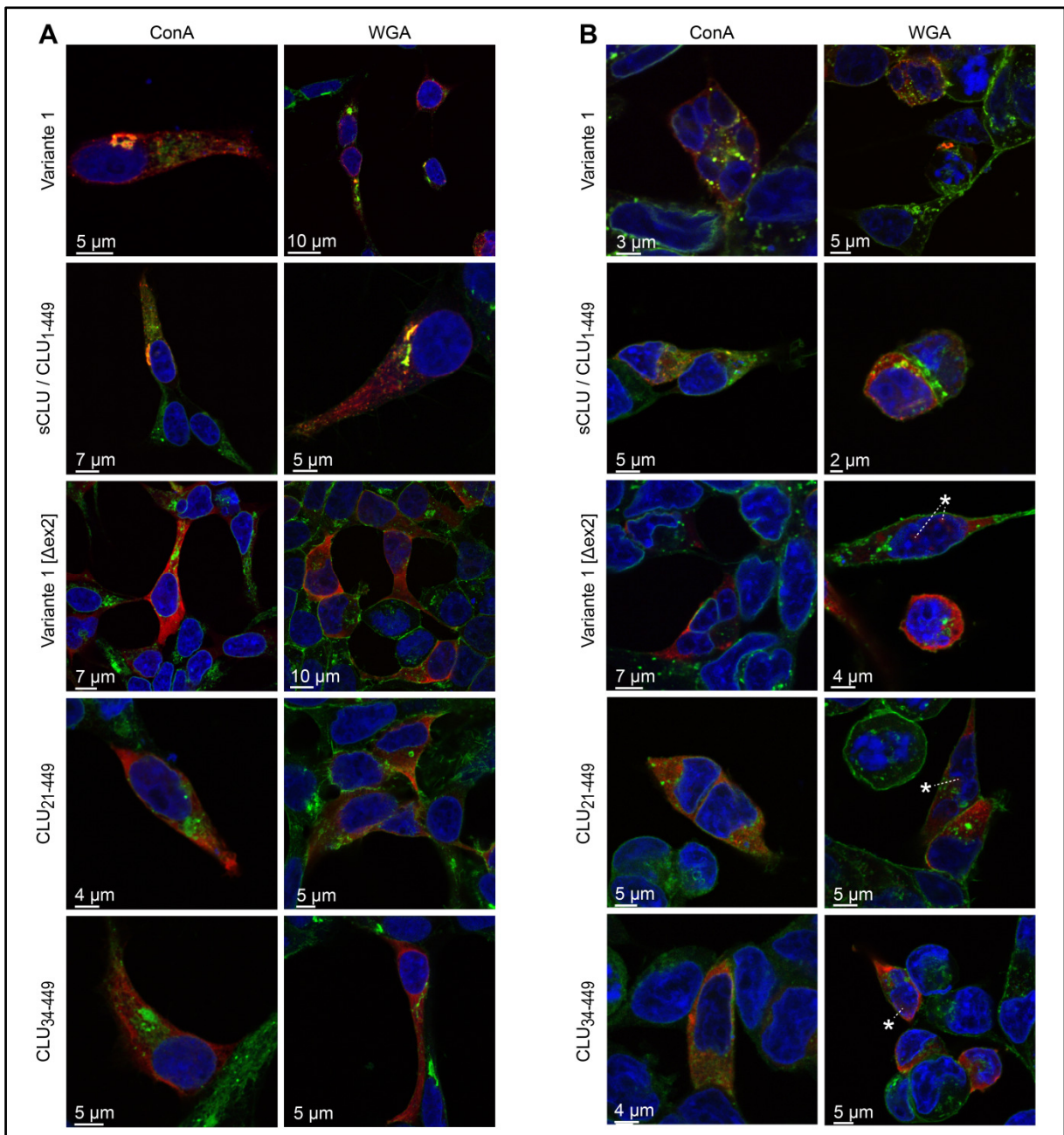


Abb. 4.11: Subzelluläre Lokalisation distinkter CLU-Isoformen bestimmt durch Immuncytochemie. Die Fluoreszenzfärbungen zeigen LSM-Aufnahmen von HEK-293-Zellen, die mit den angegebenen cDNAs transfiziert waren und entweder für 10h mit DMSO (**A**) oder mit 10 μ M MG-132 (**B**) behandelt wurden (vgl. 3.1.2). CLU₂₁₋₄₄₉, CLU₃₄₋₄₄₉ und sCLU/CLU₁₋₄₄₉ wurden von punktmutierten cDNAs aus exprimiert (vgl. 4.4.1). Die blaue Fluoreszenz zeigt die DAPI-gefärbten Zellkerne. Grüne Fluoreszenz wird von den Alexa Fluor® 488-gekoppelten Lektinen ConA bzw. WGA hervorgerufen, welche spezifisch an Glykoproteine des ER/Kernmembran- bzw. des Golgi-Apparat/Zellmembran-Kontinuums binden. Die rot fluoreszierenden Bereiche zeigen die durch die Kombination aus *Anti-V5 Antibody* und Cyanin 3-gekoppeltem Sekundärantikörper visualisierte Lokalisation der CLU-V5-Formen an. Gelbe Bereiche kommen durch Überlagerung von Alexa Fluor® 488- und Cyanin 3-Färbung zustande. * siehe Text.

In ungestressten Zellen führt die Expression von unmodifizierter Variante 1-cDNA zu einer vesikulären und perinukleären CLU-Färbung. Dieses Muster ist charakteristisch für psCLU und sCLU und überlagert, wie zu erwarten, mit der ConA- bzw. der WGA-Färbung (Abb. 4.11 A, Variante 1). Dabei ist die Überlagerung nicht vollständig, vermutlich weil psCLU und sCLU innerhalb von ER- und Golgi-Subkompartimenten akkumulieren. CLU₁₋₄₄₉, CLU₂₁₋₄₄₉ und CLU₃₄₋₄₄₉ werden zwar auch ausgehend von Variante 1

synthetisiert, lassen sich jedoch wegen der dominanten psCLU/sCLU Färbung nicht ausmachen. Ähnliche Resultate wurden nach Transfektion der Zellen mit modifizierter cDNA, die als Translationsstart ausschließlich ein aktives sCLU-Startcodon enthält, erzielt (Abb. 4.11 A, sCLU/CLU₁₋₄₄₉). Demgegenüber steht die CLU-Färbung, welche nach Überexpression von Variante 1 [Δ ex2] detektiert wurde und weder mit der DAPI-, der ConA- noch mit der WGA-Färbung überlagert. Es ist also von einer gänzlich cytosolischen Lokalisation der entstehenden CLU₃₄₋₄₄₉-Form in ungestressten Zellen auszugehen (Abb. 4.11 A, Variante 1 [Δ ex2]). Eine analoge Färbung ergab sich, wenn CLU₃₄₋₄₄₉ bzw. CLU₂₁₋₄₄₉ ausgehend von punktmutierten Variante 1-cDNAs exprimiert wurden, welche nur entsprechende Startcodons trugen (Abb. 4.11 A, CLU₃₄₋₄₄₉, CLU₂₁₋₄₄₉).

Die Applikation von Zellstress in Form von MG-132 führte zu einer erhöhten Anzahl abgerundeter HEK-293-Zellen, was wiederum mit deren Ablösen von der Matrix einherging. In der LSM-Analyse zeigten viele dieser Zellen nukleäre Fragmentierung und Auflösung membranumhüllter Kompartimente. Dies ist ein eindeutiger Indikator für stattfindende apoptotische Vorgänge. Dementsprechend wird die psCLU/sCLU-Färbung unregelmäßiger, überlagert aber dennoch mit ER/Golgi-Bereichen (Abb. 4.11 B, Variante 1, sCLU/CLU₁₋₄₄₉). Auch die nicht-sezernierten CLU-Isoformen CLU₂₁₋₄₄₉ und CLU₃₄₋₄₄₉ behalten ihre cytosolische Lokalisation in MG-132-behandelten Zellen, wobei die hier auftretende, leicht fleckige Verteilung der Fluoreszenz möglicherweise auf die Bildung von Aggregaten hindeutet (Abb. 4.11 B, Variante 1 [Δ ex2], CLU₂₁₋₄₄₉, CLU₃₄₋₄₄₉). Teilweise lassen sich auch Bereiche ausmachen, die für eine nukleäre Lokalisation dieser Isoformen sprechen könnten. Eine genaue Analyse der zugehörigen Z-stacks ergab jedoch, dass es sich hierbei um in den Nukleus ragende, cytosolische Invaginationen handelt (Abb. 4.11 B, *; vgl. 8.4).

4.4.2.3 Deglykosylierung von Zelllysaten CLU-überexprimierender Zellen

Um den Glykosylierungsgrad der einzelnen CLU-Isoformen festzustellen wurden Gesamtzelllysate von HEK-293-Zellen mit der Glykopeptidase PNGase F deglykosyliert (Abb. 4.12 A). Die dafür eingesetzten Zellen exprimierten entweder unmodifizierte Variante 1-cDNA oder entsprechende punktmutierte cDNAs, die nur zur Expression von sCLU/CLU₁₋₄₄₉-V5, CLU₂₁₋₄₄₉-V5 bzw. CLU₃₄₋₄₄₉-V5 führten (vgl. 4.4.1).

Die folgenden Western-Blots zeigen, dass sich das Molekulargewicht der Isoformen CLU₂₁₋₄₄₉-V5 und CLU₃₄₋₄₄₉-V5 nicht durch die Deglykosylierung ändert. Dies beweist, dass beide Proteine keine Modifikation in Form von Polysacchariden besitzen (Abb. 4.12 A, Spuren 5-8). Demgegenüber führt die Deglykosylierung von psCLU-V5 und sCLU-V5 zu einer Verminderung von deren Molekulargewichten: psCLU-V5 fällt von ca. 70 auf ca. 55 kDa und die β -Kette des sCLU-V5 von ca. 40 auf ca. 35 kDa. Dies war aufgrund des hohen Glykosylierungsgrades von psCLU und sCLU auch so zu erwarten. Jedoch ist keine weitere Banden, die eine deglykosylierte Form von CLU₁₋₄₄₉ darstellen könnte, auszumachen, sodass dieses Protein wiederum keine Polysaccharidreste aufweist (Abb. 4.12 A, Spuren 3+4). Das Ergebnis deutet abermals darauf hin, dass es sich bei CLU₁₋₄₄₉ um das unmodifizierte sCLU prä-Proprotein handelt.

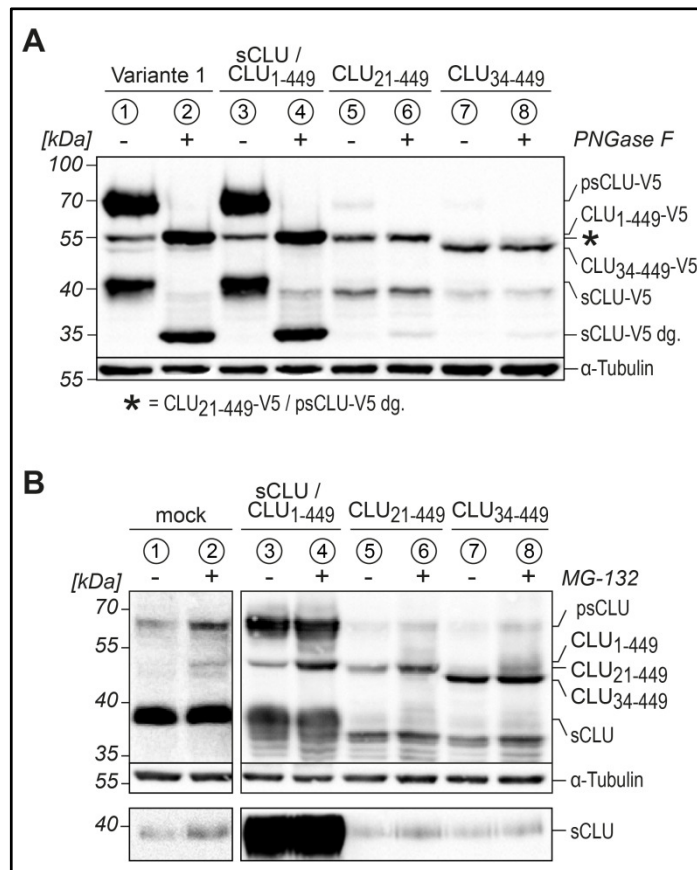


Abb. 4.12: Die cytosolischen CLU-Isoformen sind nicht glykosyliert und werden teilweise über post-translationale Mechanismen reguliert. Die verwendeten HEK-293-Zellen waren mit den angegebenen cDNAs transfiziert. CLU₂₁₋₄₄₉, CLU₃₄₋₄₄₉ und sCLU/CLU₁₋₄₄₉ wurden von punktmutierten cDNAs aus exprimiert (vgl. 4.4.1). **(A)** Gezeigt ist ein Western-Blot von Gesamtzelllysaten (je 40 µg) aus CLU-V5-überexprimierenden Zellen. Die Lysate wurden vor dem Auftragen auf die SDS-PAGE entsprechend der Angabe mit PNGase F deglykosyliert (vgl. 3.5.6) und anschließend die CLU-V5-Expression mit dem *Anti-V5 Antibody* nachgewiesen. Zu erkennen ist, dass psCLU und sCLU durch die Deglykosylierung an Molekulargewicht verlieren (dg. = deglykosyliert), nicht jedoch CLU₁₋₄₄₉, CLU₂₁₋₄₄₉ und CLU₃₄₋₄₄₉. **(B)** Gezeigt sind Western-Blots von Gesamtzelllysaten aus mock-transfizierten (je 100 µg) und aus CLU-überexprimierenden Zellen (je 50 µg) die entweder mit DMSO oder mit 10 µM MG-132 behandelt waren (vgl. 3.1.2). Für dieses Experiment wurden die CLU-Formen ohne den C-terminalen V5/His-Tag exprimiert und entsprechend mit dem Antiserum *sc-6419* detektiert. Es zeigt sich, dass CLU₁₋₄₄₉ und CLU₂₁₋₄₄₉ einer post-translationalen Regulation (proteasomaler Abbau) unterliegen, da deren Mengen durch Proteasominhibierung zunehmen. Dies gilt nicht für psCLU/sCLU und CLU₃₄₋₄₄₉.

4.4.2.4 Post-translationale Mechanismen tragen zur Akkumulation von distinkten CLU-Isoformen in MG-132 behandelten Zellen bei

Nachdem die Entstehung, die Lokalisation sowie der Glykosylierungszustand der nicht-sezernierten CLU-Formen aufgezeigt werden konnte, sollte überprüft werden, in wie weit post-translationale Mechanismen bei der MG-132-vermittelte Induktion der korrespondierenden, endogenen Proteine (vgl. 4.1) eine Rolle spielen. Dazu wurden abermals HEK-293-Zellen mit den für die einzelnen CLU-Formen codierenden cDNAs transfiziert, diesmal jedoch kein *Tag* an die rekombinanten Proteine angefügt. Es folgte eine Behandlung mit MG-132. Da die Expression der CLU-Isoformen unter Kontrolle des konstitutiven CMV-Promotors stand, konnte mit diesem experimentellen Ansatz der Einfluss transkriptioneller Mechanismen auf die CLU-Regulation ausgeschlossen werden. Um bei dem anschließenden Western-Blot bessere Aussagen machen zu können, wurden auch, analog zu 4.1, *mock* (pcDNA6)-transfizierte HEK-293-Zellen mit MG-132 kultiviert. Dadurch konnten die überexprimierten CLU-Proteine besser mit den endogenen verglichen werden (Abb. 4.12 B, Spuren 1+2).

Die Behandlung der Zellen mit MG-132 beeinflusste nicht die Mengen an überexprimiertem psCLU und sCLU, führte jedoch zu einer selektiven Erhöhung von CLU₁₋₄₄₉ (Abb. 4.12 B, Spuren 3+4), das exakt mit der 50 kDa-CLU-Bande im Zelllysate *mock*-transfizierter Zellen migrierte. Ebenso erhöhte sich die Menge von überexprimiertem CLU₂₁₋₄₄₉ auf MG-132 hin, nicht jedoch die von CLU₃₄₋₄₄₉, das mit der in gestressten, *mock*-transfizierten Zellen zu beobachtenden 45 kDa CLU-Bande migrierte (Abb. 4.12 B, Spuren 5-8). Diese Ergebnisse bestärken zum einen die Annahme, dass es sich bei dem in verschiedenen gestressten Zellen erkennbaren 50 kDa CLU-Protein um CLU₁₋₄₄₉ bzw. CLU₂₁₋₄₄₉, beim 45 kDa CLU-Protein wiederum um CLU₃₄₋₄₄₉ handelt. Zum anderen zeigen sie, dass post-translationale Mechanismen, i.e. verminderter proteasomaler Abbau, zur Akkumulation von CLU₁₋₄₄₉ und CLU₂₁₋₄₄₉, nicht jedoch von CLU₃₄₋₄₄₉ und psCLU/sCLU in MG-132 behandelten Zellen beitragen. Letztere scheinen daher auf transkriptioneller Ebene, vermutlich durch Induktion der mRNAs Variante 1 und Variante 1 [Δex2], reguliert zu werden (vgl. 4.2.3).

4.5 Funktionelle Untersuchung distinkter CLU-Isoformen

Nach eingehender Charakterisierung der Biogenese nicht-sezernierter CLU-Formen und Analysen bezüglich der subzellulären Lokalisation und des Glykosylierungszustands sollte abschließend deren biologische Funktion untersucht werden. Da in der Literatur eine Fülle an potentiellen Funktionen bezüglich der verschiedenen CLU-Formen erwähnt wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit nur die Funktion von CLU als molekulares Chaperon, der Einfluss auf die zelluläre Apoptose sowie die Rolle bei der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB untersucht. Ein immenser Vorteil, der sich bei den dazu durchgeführten Experimenten bot, war die Möglichkeit, die einzelnen CLU-Isoformen unabhängig voneinander überexprimieren zu können. Des Weiteren war es aufgrund des rekombinant an die CLU-Proteine angefügten His-Tags (vgl. 3.4.7) möglich, sowohl sCLU aus HEK-293-Zellen als auch CLU₂₁₋₄₄₉ und CLU₃₄₋₄₄₉ aus *Escherichia coli* in hoch reiner Form zu isolieren. So konnten *in vivo* und *in vitro* Analysen durchgeführt werden, wobei die Experimente einen komparativen Charakter hatten, d.h. der zu beobachtende Effekt nicht-sezernierter CLU-Isoformen wurde stets mit dem Effekt von sCLU in diesem Kontext verglichen.

4.5.1 Aufreinigung verschiedener CLU-Isoformen

4.5.1.1 Aufreinigung von sCLU-V5

Bevor auf die eigentlichen funktionellen Analysen eingegangen wird, sollen kurz die Ergebnisse der Proteinaufreinigungen zusammengefasst werden. Wie bereits erwähnt, wurde sCLU-V5 von HEK-293-Zellen aufgereinigt. Eigens zu diesem Zweck wurde über klonale Selektion ein HEK-Einzelklon kultiviert, der in großen Mengen rekombinantes sCLU in das Zellkulturmedium sezerniert. Die eigentliche Aufreinigung erfolgte per Ni-Affinitätschromatographie über die FPLC. Nach der Bindung an das Säulenmaterial und mehreren Waschschritten konnte durch Zugabe von 250 mM Imidazol das rekombinante sCLU eluiert werden, was sich als eindeutiger OD_{280nm}-Ausschlag (engl. *peak*) im Elutionsdiagramm zeigte (Abb. 4.13 A, Elution). Um die Reinheit des eluierten Proteins zu überprüfen, wurden Aliquote

sämtlicher FPLC-Fractionen einer SDS-PAGE unterzogen und anschließend eine Coomassie-Färbung bzw. ein Western-Blot durchgeführt. Wie zu erkennen ist, liegt das aufgereinigte sCLU in hoch reiner Form vor (Abb. 4.13 B, Elution 1). Es sei hier darauf hingewiesen, dass der eingesetzte HEK-Einzelklon extrem hohe Mengen an sCLU exprimiert, sodass neben dem reifen auch Teile an ungeschnittenem sCLU, welches noch nicht durch die Proprotein-Konvertase in α - und β -Kette unterteilt wurde (vgl. 1.2.1), detektierbar waren (Abb. 4.13 B, sCLU [α + β]).

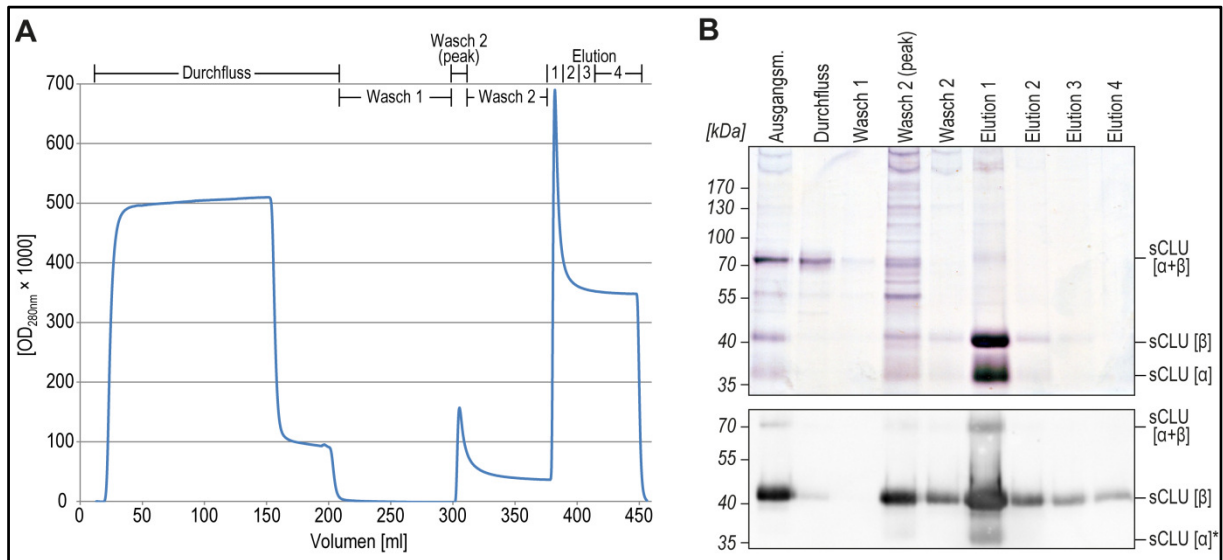


Abb. 4.13: Aufreinigung von sCLU-V5 über FPLC. (A) Elutionsdiagramm (OD_{280nm}) der FPLC. Ca. 100ml umgepufferter Zellkulturüberstand der sCLU-V5-überexprimierenden Zelllinie HEK+sCLU-BG3 wurden über 5ml Ni^{2+} -Matrix gegeben (Durchfluss). Durch anschließende Waschschrte konnten unspezifisch gebundene Proteine entfernt werden und schließlich reines sCLU-V5 von der Matrix eluiert werden, was sich in einem deutlichen OD_{280nm} -Peak äußert. Zu beachten ist die Hintergrundabsorption des im Elutionspuffer vorhandenen Imidazols. (B) Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel (oben) und mit dem Antiserum sc-6419 entwickelter Western-Blot (unten) der aus der FPLC gewonnenen Fraktionen. Die Elutionsfraktionen enthalten hochreines sCLU-V5. Infolge der hohen Proteinkonzentration wurden durch das Antiserum auch Teile der α -Kette detektiert (*).

4.5.1.2 Aufreinigung von CLU_{21-449} -V5 und CLU_{34-449} -V5

CLU_{21-449} und CLU_{34-449} werden nicht in α/β -Kette geschnitten, weisen keine Glykosylierungen auf und enthalten angesichts ihrer cytosolischen Lokalisation vermutlich keine Schwefelbrücken (vgl. 4.4). Daher erfolgte deren Aufreinigung aus dem *Escherichia coli*-Stamm SG13009[pREP4] in den das Expressionsplasmid pQE-30 mit entsprechender cDNA transformiert wurde. Es folgte die Selektion hoch-exprimierender Bakterienklone, welche, induziert durch IPTG, große Mengen an CLU_{21-449} -V5 und CLU_{34-449} -V5 bildeten. Bei der Aufreinigung der rekombinanten Proteine traten jedoch Probleme auf, da diese nicht in löslicher Form, sondern in *inclusion bodies* innerhalb der Bakterienzelle vorlagen. Dies bietet auf der einen Seite den Vorteil, dass die rekombinanten Proteine innerhalb der *inclusion bodies* bereits in sehr reiner Form vorliegen und sich leicht isolieren lassen. Auf der anderen Seite bringt es den Nachteil mit sich, dass für die Extraktion hochmolare Harnstoffpuffer eingesetzt werden müssen, welche reversibel denaturierend auf die Proteine wirken.

Die Isolation der rekombinanten Proteine, im Folgenden exemplarisch für CLU_{34-449} geschildert, erfolgte durch Aufbruch der Bakterien mit Ultraschall und insgesamt vier Zentrifugations- bzw. Extrakti-

onsschritten, von denen der letzte mit einer 8-molaren Harnstofflösung erfolgte und sämtliche Proteine mitsamt CLU₃₄₋₄₄₉ aus den *inclusion bodies* freisetzte (Abb. 4.14 A, *). Es schloss sich eine, analog zur sCLU-Reinigung durchgeführte, Ni-Affinitätschromatographie an, wobei alle verwendeten Puffer 8 M Harnstoff enthielten. So konnte in den Elutionsfraktionen hoch-reines CLU₃₄₋₄₄₉-V5 (bzw. CLU₂₁₋₄₄₉-V5) gewonnen werden (Abb. 4.14 B+C, Elution 1-3, *).

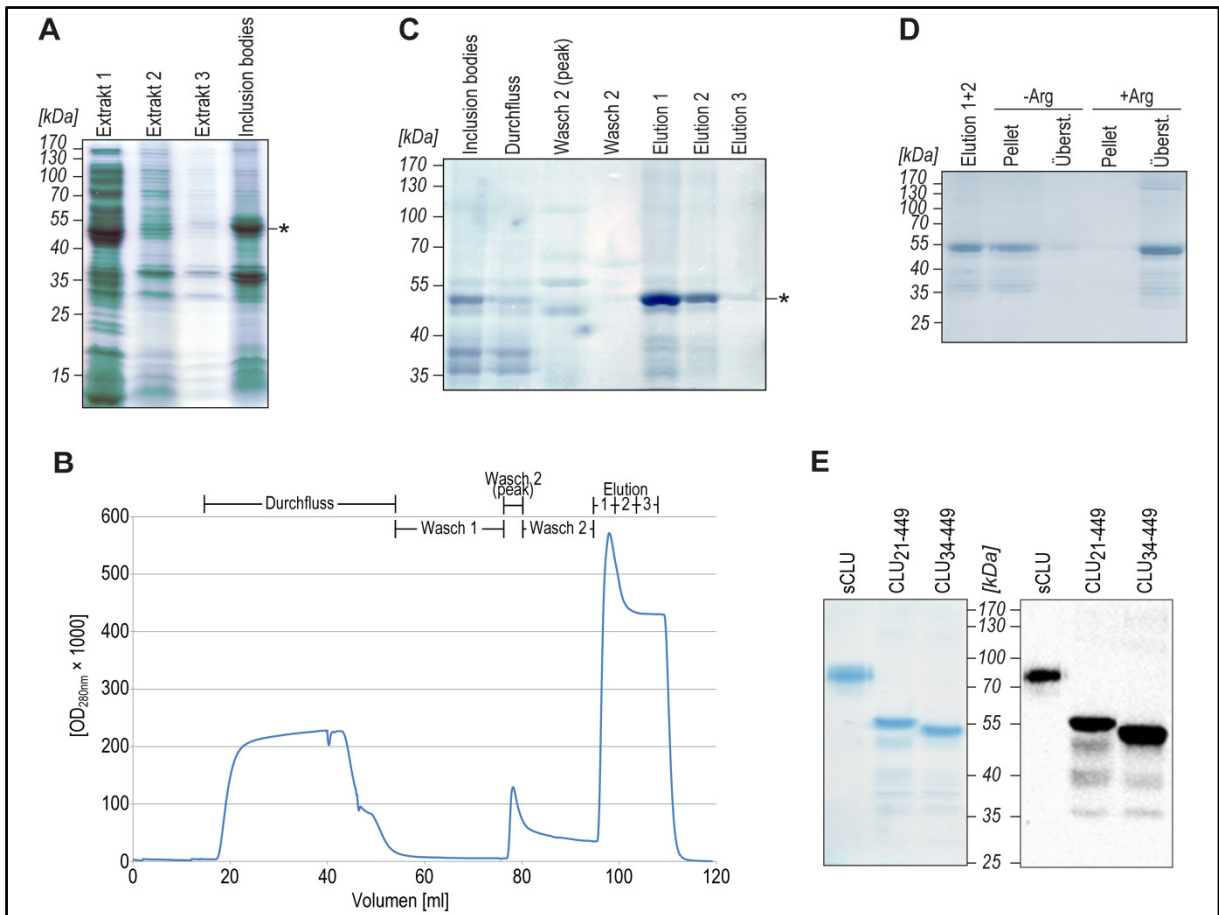


Abb. 4.14: Aufreinigung von CLU₂₁₋₄₄₉-V5 bzw. CLU₃₄₋₄₄₉-V5. Zu sehen sind Daten zur Aufreinigung von CLU₃₄₋₄₄₉ aus dem überexprimierenden *Escherichia coli* Stamm SG13009. Für CLU₂₁₋₄₄₉ konnten analoge Ergebnisse erzielt werden. **(A)** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel der verschiedenen Fraktionen zur Aufkonzentration von *inclusion bodies*, welche durch drei Extraktionsschritte freigesetzt wurden und hohe Mengen CLU aufweisen (*). **(B)** Elutionsdiagramm (OD_{280nm}) der FPLC (Nickel-Affinitätschromatographie). Ca. 50 ml Lösung mit den isolierten *inclusion bodies* wurden über 1 ml Ni²⁺-Matrix gegeben. Die Elution erfolgte analog zu Abb. 4.13. **(C)** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel der aus der FPLC gewonnenen Fraktionen. Die Elutionsfraktionen enthalten hochreines CLU₃₄₋₄₄₉. **(D)** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel des rückgefalteten CLU₃₄₋₄₄₉ nach Zentrifugation bei 20.000 × g. Zu erkennen ist, dass das aufgereinigte Protein nur durch Zugabe von L-Arg in der löslichen Fraktion bleibt und ansonsten aus der Lösung ausfällt und im Pellet zu finden ist. **(E)** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel (links, jeweils 500 ng Protein) und mit Antiserum *sc-6419* entwickelter Western-Blot (rechts, jeweils 100 ng Protein) der verschiedenen, aufgereinigten CLU-Formen. Die SDS-PAGEs wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

Bei der anschließend vorgesehen Umpufferung gegen 10 mM Phosphatpuffer (pH 7) stellte sich heraus, dass CLU₃₄₋₄₄₉ ausfällt, sobald die Harnstoffkonzentration unter einen kritischen Wert fällt. Das ausgefallene Protein ließ bereits bei niedrigen Zentrifugalbeschleunigungen pelletieren (Abb. 4.14 D, -Arg). Dies könnte auf eine durch den 8-molaren Harnstoff zerstörte Proteinstruktur zurückzuführen sein. Um eine Rückfaltung von CLU₃₄₋₄₄₉ zu ermöglichen, wurde der Harnstoff nicht in einem schnellen Schritt entzogen, sondern die Lösung eingeeengt, sukzessive über 24 h mit Harnstoff-freiem Puffer verdünnt und so die Harnstoffkonzentration von 8 M auf 1,6 M verringert. Des Weiteren wurde der Lösung nach

und nach L-Arginin bis zu einer Endkonzentration von 400 mM zugesetzt, was wiederum eine stabilisierende Wirkung auf die Proteinstruktur hat. So präpariertes CLU₃₄₋₄₄₉ blieb löslich, sodass auch nach Zentrifugation bei 20.000 × g kein ausgefallenes Protein zu beobachten war (Abb. 4.14 D, +Arg). Die noch in den Lösungen vorliegenden Mengen an Arginin und Harnstoff wurden bei den im Folgenden durchgeführten Experimenten berücksichtigt (vgl. 4.5.2). Die isolierten, nicht-sezernierten CLU-Formen CLU₂₁₋₄₄₉-V5 und CLU₃₄₋₄₄₉-V5 besaßen ebenfalls eine hohe Reinheit, ähnlich der des aus HEK-293 Zellkulturen gewonnenen sCLUs (Abb. 4.14 E).

4.5.1.3 Sekundärstrukturanalysen von sCLU-V5

Sekundärstrukturanalysen wurden über CD-Spektroskopie durchgeführt, um die korrekte Faltung der aufgereinigten Proteine zu überprüfen. Wegen der noch vorhandenen Mengen an Harnstoff und Arginin in den aufgereinigten CLU₂₁₋₄₄₉-V5- bzw. CLU₃₄₋₄₄₉-V5-Lösungen, ließ sich von diesen Proteinen kein CD-Spektrum aufnehmen, sodass die Korrektheit der Rückfaltung im Rahmen dieser Arbeit nicht sichergestellt werden konnte. Ein exemplarisches CD-Spektrum des aufgereinigten sCLUs (vgl. 4.5.1.1) ist in Abb. 4.15 A gezeigt. Ausgehend von den gesammelten Messwerten ließ sich über die Internetseite „Dichroweb“ der Anteil an den einzelnen Sekundärstrukturelementen kalkulieren (vgl. 3.5.10). Die Kalkulation ergab 39% α -Helices, 13% β -Faltblätter, 16% β -Schleifen und 32% ungeordnete Sekundärstrukturen. Zum Vergleich sind hier auch die Daten aus anderen Forschungsberichten aufgelistet (Abb. 4.15 B). Man erkennt, dass die Werte aus der eigenen Messung gut mit den Literaturwerten übereinstimmen, sodass von einer korrekten Faltung des aufgereinigten sCLUs ausgegangen werden kann.

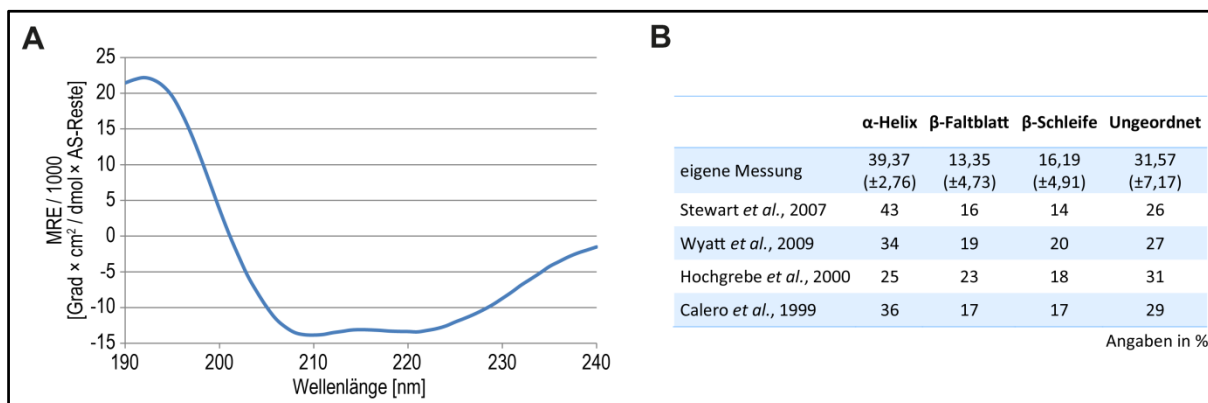


Abb. 4.15: CD-Spektroskopie von aufgereinigtem sCLU-V5. (A) Gemitteltes CD-Spektrum aus drei unabhängigen Messungen von sCLU-V5-Lösungen (jeweils 0,75 μ g/ml). Aufgetragen sind die *Mean Residue Ellipticity* (MRE, Ordinate) gegen die Wellenlänge (Abszisse). (B) Die aus den einzelnen CD-Spektren über die Internetseite „Dichroweb“ errechneten prozentualen Anteile an Sekundärstrukturelementen (Mittelwerte $\pm \sigma$, n=3). Als Referenz sind die ermittelten Werte aus anderen Forschungsberichten aufgeführt.

4.5.2 Effekt distinkter CLU-Isoformen auf die Aggregation entfaltender Proteine

Eine der am besten charakterisierenden Funktionen des sCLUs ist dessen Chaperonaktivität, also die Verhinderung der Präzipitation denaturierender Zielproteine durch Bildung hoch-molekularer, löslicher Proteinkomplexe über Bindung hydrophober Bereiche (vgl. 1.6.2). Dabei konnte man feststellen,

dass der Glykosylierungsgrad in diesem Zusammenhang nur einen marginalen Einfluss hat, sodass seit-her die Frage nach einer potentiellen Chaperonaktivität der nicht-sezernierten CLU-Formen im Raum steht (vgl. 1.6.4). Experimentell lässt sich dies durch *in vitro*-Messungen untersuchen, bei denen die Eintrübung definierter oder komplexer Proteinlösungen (Zielproteine) bestimmt wird. Bei den hier durchgeführten Ansätzen wurde den Zielproteinlösungen (0,5 mg/ml Transferrin, 1 mg/ml Katalase, 2 mg/ml lösliches Zellextrakt) eine definierte Menge an aufgereinigtem CLU (100 µg/ml sCLU-V5, 62,5 µg/ml CLU₂₁₋₄₄₉-V5 oder 62,5 µg/ml CLU₃₄₋₄₄₉-V5) oder BSA (83 µg/ml) zugesetzt und die Ansätze für 60 bis 150 min auf 50°C erhitzt. Währenddessen konnte in Abständen von 150s bis 10 min die OD_{360nm} bestimmt werden, welche ein Maß für die Eintrübung der Lösung ist und wiederum mit dem Ausmaß der Proteinpräzipitation korreliert. Allen Ansätzen wurden entsprechende Mengen an Harnstoff und L-Arginin, welche in den CLU₂₁₋₄₄₉-V5 bzw. CLU₃₄₋₄₄₉-V5 Stammlösungen enthalten waren, zu-gesetzt.

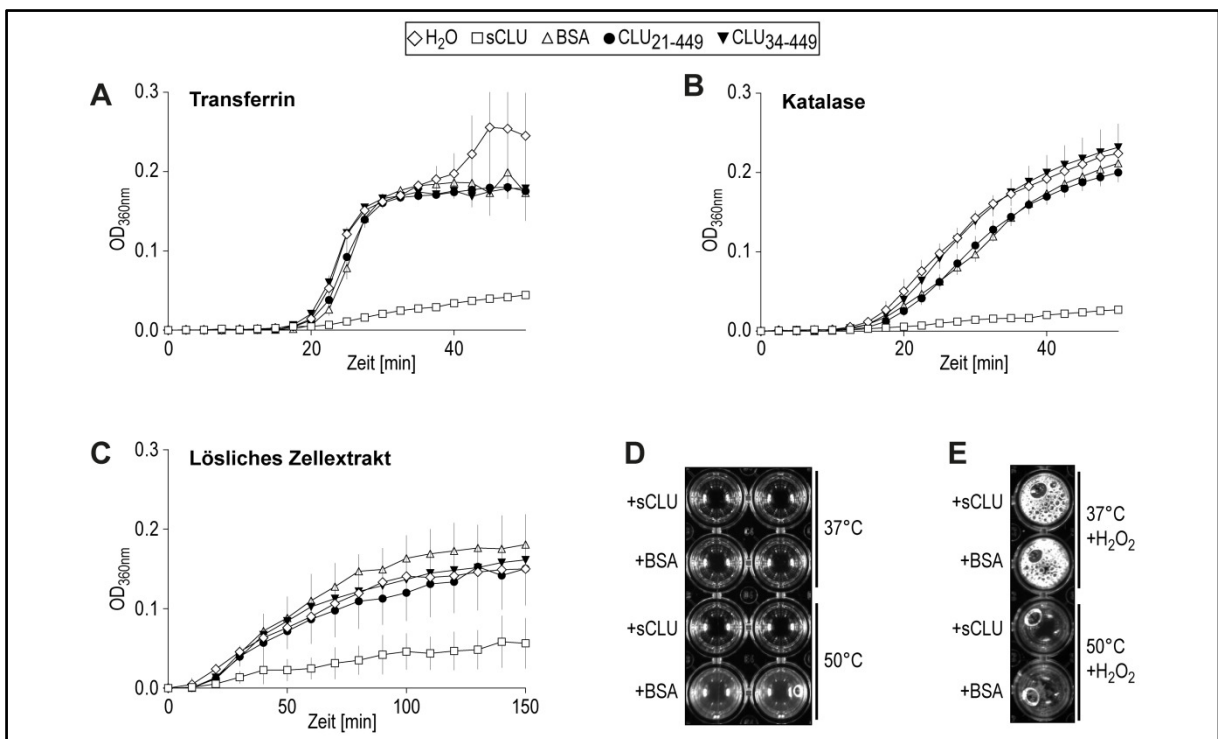


Abb. 4.16: Präzipitationsassays zur Analyse der Chaperonaktivität einzelner CLU-Formen. Transferrinlösung (A), Katalaselösung (B) oder lösliches Zellextrakt (C) wurden in Gegenwart von sCLU, BSA, CLU₂₁₋₄₄₉ oder CLU₃₄₋₄₄₉ bzw. ohne zusätzliches Protein (H₂O) bei 50°C inkubiert. Dabei wurde fortlaufend die OD_{360nm} bestimmt (Ordinate, Mittelwerte ± σ, n=3) und gegen die Zeit (Abszisse) aufgetragen. Die resultierenden Präzipitationskurven zeigen, dass nur sCLU im Stande ist, die Präzipitation der Zielproteine zu vermindern, was sich in einer geringeren OD_{360nm} äußert. (D) Photographie einer 96-Well Platte mit Proben nach Durchführung eines Präzipitationsassays mit Katalaselösung (analog zu B). Die Eintrübung der Lösung ohne sCLU ist nach Inkubation bei 50°C mit dem bloßen Auge erkennbar. Bei 37°C fällt noch kein Protein aus. (E) Den Proben aus (D) wurde nach Beendigung des Assays H₂O₂ (100 mM Endkonzentration) zugegeben. Die Schaumentwicklung zeigt noch vorhandene Katalaseaktivität an.

Wie zu erwarten fiel das Zielprotein Transferrin nach 20 min Inkubationszeit bei 50°C aus der Lösung aus, was sich in einem Anstieg in der OD_{360nm} äußerte (Abb. 4.16 A, H₂O). Auch der Zusatz von BSA konnte dies nicht verhindern (Abb. 4.16 A, BSA), wohl aber der Zusatz von sCLU. In letzterem Fall kam es nur zu einem minimalen Anstieg der OD_{360nm}, was wiederum eine verminderte Proteinpräzipitation anzeigt und somit die Chaperonaktivität von sCLU belegt (Abb. 4.16 A, sCLU). Im Gegensatz zu sCLU hatte weder der Zusatz von CLU₂₁₋₄₄₉ noch von CLU₃₄₋₄₄₉ einen Einfluss auf das Ausmaß und die Kinetik

der Proteinpräzipitation, sodass hier keine Chaperonaktivität vorzuliegen scheint (Abb. 4.16 A, CLU₂₁₋₄₄₉, CLU₃₄₋₄₄₉). Analoge Beobachtungen wurden mit Katalase als Zielprotein gemacht (Abb. 4.16 B). Interessanterweise zeigte sCLU auch auf lösliches nekrotisches Zellextrakt, eine Präzipitations-verhindernde Wirkung (Abb. 4.16 C). Somit übt es nicht nur auf ausgewählten Zielproteine (z.B. Transferrin, Katalase) eine Chaperonaktivität aus, sondern auch auf komplexere Proteingemische.

Wie bereits gezeigt ist die hier gemessene Chaperonfunktion eindeutig auf die Gegenwart von sCLU zurückzuführen. Sie lässt sich beispielsweise nicht durch äquimolare Mengen an BSA hervorrufen. Die durch Erhitzung eingeleitete Proteinpräzipitation und damit einhergehende Eintrübung der Flüssigkeit ließ sich mit bloßen Augen erkennen, hier am Beispiel einer Katalaselösung gezeigt (Abb. 4.16 D). Dennoch schützt die Präzipitation-verhindernde Wirkung von sCLU nicht die enzymatische Aktivität der Katalase, was sich leicht mit einem H₂O₂-Test nachweisen lässt. Dazu wurden abermals Präzipitationsassays mit Katalaselösungen durchgeführt, welchen entweder sCLU oder BSA zugesetzt war und welche entweder bei 37°C oder 50°C inkubierten. Nach 150 min wurde die Inkubation beendet und jeder Probe H₂O₂ (Endkonzentration: 100 mM) zugegeben. Bei den bei 37°C inkubierten Ansätzen rief die O₂-Entstehung eine Schaumbildung hervor, bei den bei 50°C inkubierten Ansätzen nicht. Bei der mit sCLU versetzten und bei 50°C inkubierten Katalaselösung war im Vergleich zu der mit BSA versetzten Lösung, wie zu erwarten, keine Eintrübung erkennbar. Die ausbleibende Schaumentwicklung zeigte jedoch an, dass auch hier die Katalase durch die Hitzeeinwirkung inaktiviert wurde (Abb. 4.16 E).

Es lässt sich somit zusammenfassend sagen, dass die nicht-sezernierten CLU-Formen wohl keine Chaperonaktivität besitzen. Es muss dabei beachtet werden, dass die für diese Experimente eingesetzten, nicht-sezernierten CLU-Formen aus Bakterien unter Verwendung hochmolekularer Harnstoffpuffer aufgereinigt wurden. Zwar schloss sich eine entsprechende Rückfaltung an, deren Erfolg konnte jedoch nicht überprüft werden. So lässt sich diese Fragestellung nicht abschließend klären und bedarf weiterführender Experimente. Die Chaperonaktivität von sCLU konnte eindeutig nachgewiesen werden, wobei eine protektive Wirkung auf denaturierende Enzyme, wie zu erwarten, nicht detektierbar war.

4.5.3 Einfluss distinkter CLU-Isoformen auf die Apoptose

Der Einfluss von CLU auf die Apoptose wird kontrovers diskutiert. Seit der Entdeckung nicht-sezernierter CLU-Formen wurde beobachtet, dass gerade diese einen pro-apoptotischen Effekt auf die Zellen ausüben. Dies könne insbesondere durch eine Bindung von CLU über eine hypothetische BH3-Domäne an Proteine der Bcl2-Familie passieren (vgl. 1.7.2). Da es durch die hier durchgeführten Expressionsanalysen (vgl. 4.4) möglich war, nicht-sezernierte CLU-Isoformen distinkt zu exprimieren, sollte gezielt deren Einfluss auf die Apoptose gemessen werden. Dazu wurde ein Caspase 3/7-Assays verwendet, welcher die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 über die Spaltung eines synthetischen, luminogenen Substrats erfasst (vgl. 3.1.6). Für die folgenden Experimente mussten die einzelnen CLU-Formen ausgehend von den generierten cDNAs transient exprimiert werden. Neben der unmodifizierten Variante 1 cDNA (Wildtyp) waren dies Variante 1 [Δex2], welche ausschließlich für CLU₃₄₋₄₄₉ codiert sowie punktmutierte cDNAs die für sCLU/CLU₁₋₄₄₉, CLU₂₁₋₄₄₉ oder CLU₃₄₋₄₄₉ codieren. Alle Proteine wurden

ohne C-Terminalen *Tag* exprimiert. Als Blindprobe (*mock*) wurde pcDNA6 ohne integrierte cDNA transfiziert.

In einem ersten Experiment wurde der spontane Einfluss der CLU-Formen auf die basale Caspase-Aktivität als Maß für die Apoptose bestimmt. Es wurden HEK-293 (Abb. 4.17 A) oder PC-3 (Abb. 4.17 B) Zellen untersucht, welche die distinkten CLU-Formen transient exprimierten. Hier zeigte sich, dass die Expression der einzelnen CLU-Formen keine signifikante Änderung der Caspase-Aktivität bewirkt. Als Kontrolle wurde rekombinantes Bax auf die gleiche Weise in den Zellen exprimiert, was, wie zu erwarten, einen deutlichen Anstieg in der Caspase-Aktivität zur Folge hat. Bei HEK-293-Zellen ist dieser Effekt besser zu erkennen als bei PC-3-Zellen, da bei letzteren eine geringere Transfektionseffizienz erreicht wird. Daher wurde in diesem Fall auch eine andere Art der Ergebnisdarstellung gewählt (Abb. 4.17 B).

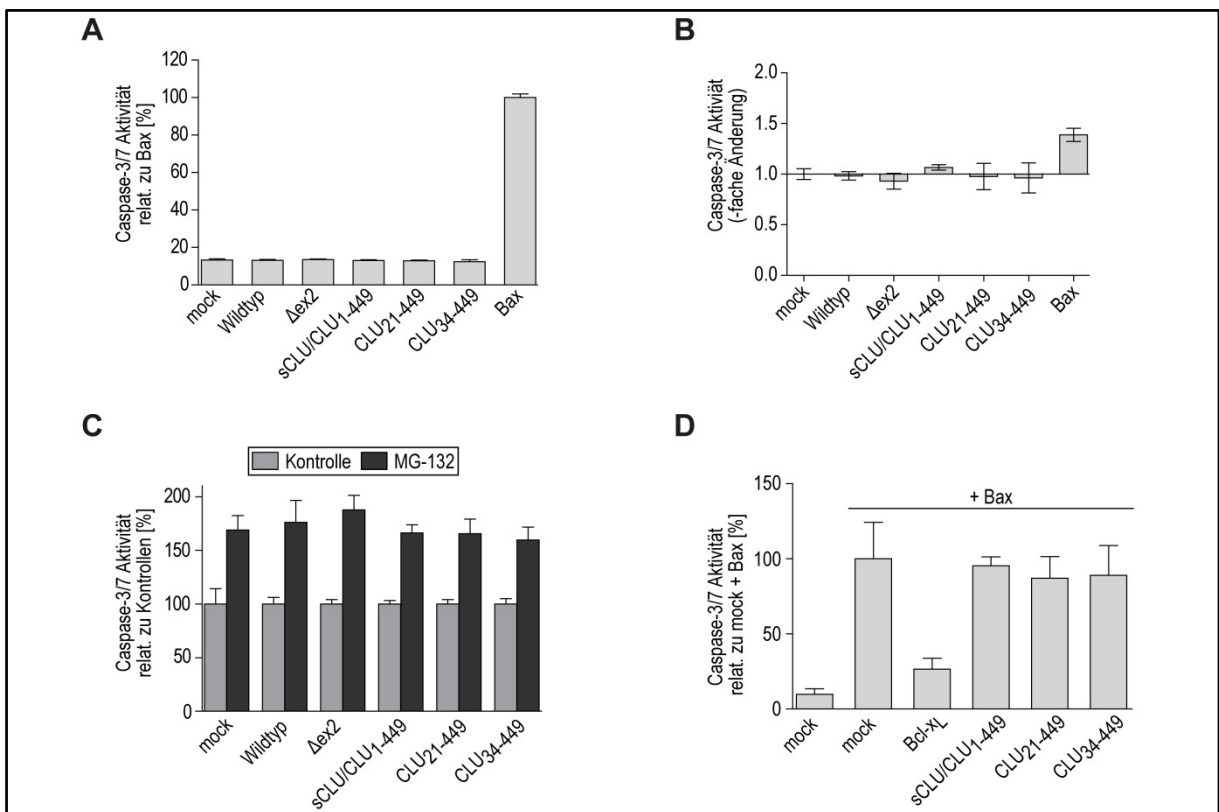


Abb. 4.17: Einfluss distinkter CLU-Isoformen auf die zelluläre Apoptose. Die Zellen wurden mit pcDNA6 (*mock*), unmodifizierter Variante 1-cDNA, Variante 1 [Δex2]-cDNA oder punktmutierten cDNAs von Variante 1, welche spezifisch für sCLU/CLU₁₋₄₄₉, CLU₂₁₋₄₄₉ oder CLU₃₄₋₄₄₉ codieren (vgl. 4.4.1), Bax oder Bcl-xL transfiziert. Die Proteine wurden ohne C-Terminalen *Tag* exprimiert. **(A)** Die Säulendiagramme zeigen jeweils die Caspase 3/7-Aktivität 24 h nach der Transfektion (Mittelwerte ± σ, n=3). Im Gegensatz zu Bax (Positivkontrolle) beeinflusst keine der CLU-Formen die Caspase 3/7-Aktivität in HEK-293-Zellen. Die Messwerte sind prozentual zu den Messwerten der Bax-Reihe (100%) ausgedrückt. **(B)** Analoges Experiment zu (A) an PC-3-Zellen. Die Messwerte sind als Vielfaches der Caspase-Aktivität von *mock*-transfizierten Zellen (Aktivität=1) ausgedrückt. **(C)** 24 h nach der Transfektion wurden die HEK-293-Zellen für 10 h mit DMSO oder 10 μM MG-132 (vgl. 3.1.6) behandelt. MG-132 bewirkt einen Anstieg in der Caspase-Aktivität, auf den keine der einzelnen CLU-Formen einen signifikanten Einfluss hat. Die Messwerte der einzelnen MG-132-Reihen sind relativ zu den DMSO-behandelten Kontrollzellen (100% Aktivität) ausgedrückt (Mittelwerte ± σ, n=3). **(D)** HEK-293-Zellen wurden neben Bax mit den angegebenen cDNAs transfiziert. Bcl-xL kehrt den pro-apoptotischen Stimulus von Bax um. Die einzelnen CLU-Formen zeigen keinen vergleichbaren Effekt. Die Messwerte sind relativ zu den *mock*+Bax-transfizierten Zellen (100%) ausgedrückt (Mittelwerte ± σ, n=3).

Um den Einfluss der distinkten CLU-Isoformen im Rahmen der induzierten Apoptose zu bestimmen, wurden die transfizierten Zellen mit MG-132 behandelt. Für die Auswertung wurde die Caspase-Aktivität in den DMSO-behandelten HEK-293 Kontrollzellen jeweils auf 100% gesetzt, sodass für alle mit

unterschiedlichen CLU-Formen transfizierten Zellen der relative Anstieg erkennbar ist (Abb. 4.17 C). MG-132 löste in allen Fällen einen Anstieg der Caspase-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollzellen aus (schwarze vs. graue Säulen). Es zeigte sich weiterhin, dass keine CLU-Form im Stande ist, das Ausmaß der Erhöhung der Caspase-Aktivität zu modifizieren. Somit scheint CLU ebenfalls keinen Effekt auf die induzierte Apoptose zu haben.

Um den Effekt der einzelnen CLU-Formen im Rahmen der Bax-vermittelten Apoptose zu analysieren wurden Co-Transfektionen mit Bax durchgeführt. Bax erhöht in *mock*-transfizierten HEK-293-Zellen, wie zu erwarten, die Caspase-Aktivität um ein Vielfaches, wobei der hier ermittelte Wert auf 100% gesetzt wurde (Abb. 4.17 D). Der Bax-induzierte Anstieg lässt sich durch Co-Transfektion mit Bcl-xL zu großen Teilen wieder relativieren, was auf dessen Bax-sequestrierende Eigenschaften zurückzuführen ist. Die Co-Expression von Bax mit den distinkten CLU-Formen zeigt einen Anstieg in der Caspase-Aktivität, welcher in allen Fällen vergleichbar mit den Bax-exprimierenden, *mock*-transfizierten Zellen ist. Man muss daher davon ausgehen, dass CLU auch auf die Bax-induzierte Apoptose keinen signifikanten Einfluss hat.

4.5.4 Einfluss distinkter CLU-Isoformen auf den NF- κ B-vermittelten Signaltransduktionsweg

Die Regulation der NF- κ B-vermittelten Signaltransduktion ist eine weitere vermutete Funktion von CLU. In diesem Zusammenhang sind stimulierende und inhibierende Einflüsse beschrieben worden (vgl. 1.8.2). Durch Anwendung eines NF- κ B-responsiven Luciferase-Reporterplasmids konnte der Effekt der individuellen CLU-Isoformen auf die TNF- α -induzierte, NF- κ B-vermittelte Signaltransduktion untersucht werden. Hierzu wurden die unter 4.5.3 genannten CLU-Konstrukte zusammen mit dem Reporterplasmid pNF κ B-Luc in HEK-293-Zellen co-transfiziert. Inkubation der *mock*-transfizierten Zellen mit 10ng/ml TNF- α führte zu einer 8-fachen Erhöhung der durch die Luciferase-Reaktion verursachten Chemilumineszenz, welche ein Maß für die NF- κ B-Aktivität ist (Abb. 4.18 A). Weder die Expression von wildtypischer CLU-Variante 1-cDNA noch von modifizierten cDNAs, die für sCLU/CLU₁₋₄₄₉ oder CLU₂₁₋₄₄₉ codieren, beeinflussten diesen Anstieg der NF- κ B-Aktivität. Analog gilt dies bei Zellen, die CLU₃₄₋₄₄₉ von einer punktmutierten cDNA aus exprimierten (Abb. 4.18 A, CLU₃₄₋₄₄₉). Wird CLU₃₄₋₄₄₉ jedoch ausgehend von Variante 1 [Δ ex2] exprimiert, zeigt sich ein signifikant reprimierender Einfluss auf die NF- κ B-Aktivität. Dies ist interessant, da der Effekt mit dem Ausmaß der Expression von CLU₃₄₋₄₄₉ in diesen Zellen zu korrelieren scheint, wie ein CLU-spezifischer Western-Blot der Zelllysate, welche für den Assay eingesetzt und vermessen wurden, zeigt (Abb. 4.18 B).

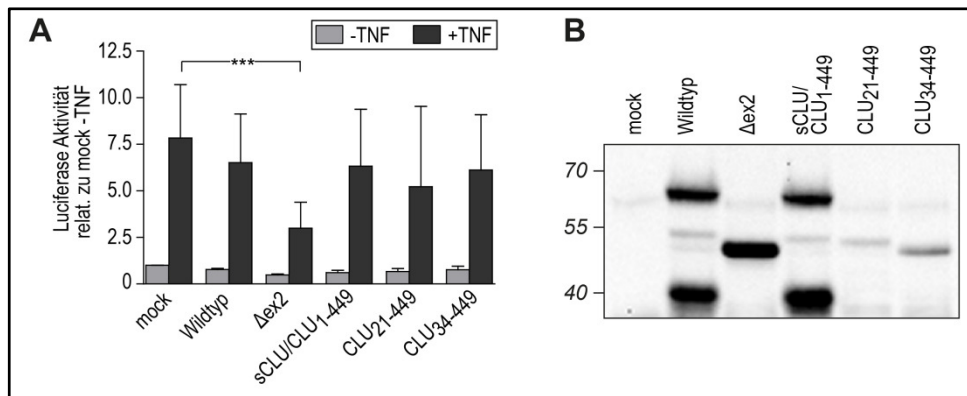


Abb. 4.18: Einfluss distinkter CLU-Isoformen auf die NF- κ B-vermittelte Signaltransduktion. HEK-293-Zellen wurden mit pcDNA6 (*mock*), unmodifizierter Variante 1-cDNA, Variante 1 [Δ ex2]-cDNA oder punktmutierten cDNAs von Variante 1, welche spezifisch für sCLU/CLU₁₋₄₄₉, CLU₂₁₋₄₄₉ oder CLU₃₄₋₄₄₉ codieren (vgl. 4.4.1) transfiziert. Die Proteine wurden ohne C-terminalen *Tag* exprimiert. Zusätzlich wurde das Reporterplasmid pNF- κ B-Luc in den Zellen zur Expression gebracht. 18h nach der Transfektion schloss sich eine 24-stündige Behandlung mit BSA-Lösung (-TNF) oder 10ng/ml TNF- α (+TNF) an. **(A)** Das Säulendiagramm zeigt die Luciferase-Aktivität als Maß der NF- κ B-Aktivierung. Die Messwerte sind als Vielfaches der Luciferase-Aktivität von *mock*-transfizierten, BSA-behandelten Zellen (Aktivität=1) ausgedrückt (Mittelwerte $\pm \sigma$, n=4). Dabei bewirkt nur CLU₃₄₋₄₄₉, welches von Variante 1 [Δ ex2] aus exprimiert wird, eine signifikante Inhibition der Luciferase-Aktivität (einfacher ANOVA-Test, *** \triangleq P<0,05). **(B)** Mit Antiserum *sc-6419* entwickelter Western-Blot (jeweils 50 μ g Gesamtzellprotein) der verschiedenen, für (A) eingesetzten Zellysate nach TNF- α -Behandlung. Deutlich zu erkennen ist die höhere Expression von CLU₃₄₋₄₄₉ ausgehend von Variante 1 [Δ ex2] im Vergleich zu der ausgehend von der punktmutierten cDNA.

5 DISKUSSION

5.1 Zellstress induziert die Expression von Clusterin

In der vorliegenden Arbeit stand die Erforschung nicht-sezernerter Isoformen von CLU im Vordergrund. In einem ersten Schritt sollte daher versucht werden, deren Expression in verschiedenen Zelllinien nachzuweisen, wobei auf Basis der in der Literatur beschriebenen Beobachtungen besonders die Kultur von Zellen bei erhöhter Temperatur (45°C) sowie die Behandlung mit oxidativen Agenzien und dem Proteasominhibitor MG-132 im Vordergrund standen. Letzteres fördert erwiesenermaßen das Auftreten von proteotoxischem Stress und die Einleitung einer Hitzeschockantwort. Durch anschließende Western-Blot und qPCR-Analysen konnte so die Regulation von CLU und das damit verbundene Auftreten nicht-sezernerter CLU-Formen im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf Protein und mRNA Ebene nachvollzogen werden.

5.1.1 Expression von sezerniertem Clusterin in gestressten Zellen

Die Inkubation von HEK-293-Zellen bei 45°C bzw. deren Behandlung mit MG-132 induziert einen Anstieg der sCLU-Menge, was über Western-Blot Analysen nachgewiesen werden konnte. Gleichermäßen verhält es sich mit MCF-7-Zellen in Gegenwart von MG-132. Dies deckt sich mit anderen Studien, bei denen eine ähnliche Induktion von sCLU in U-2-Osteosarkomzellen, WI38-Fibroblasten (Balantinou *et al.*, 2009), A431-Plattenepithelkarzinomzellen (Michel *et al.*, 1997; Viard *et al.*, 1999), HepG2-Hepatomzellen (Viard *et al.*, 1999), H1299-Lungenkrebszellen (Liao *et al.*, 2009) oder U-251-Astrocytomzellen (Loison *et al.*, 2006; Nizard *et al.*, 2007) zu erkennen ist. Die erhöhte Menge an sCLU lässt sich dabei nicht auf einen verminderten Abbau, sondern auf eine vermehrte Synthese zurückführen, da sowohl Hitze als auch MG-132 eine Hitzeschockantwort auslösen können und CLU aufgrund einer CLE-Sequenz im Promotorbereich seines Gens zu den Hitzeschock-induzierbaren Proteinen gehört (Bush *et al.*, 1997, vgl. 1.5.1). Dies konnte durch hier durchgeführte mRNA-Quantifizierungen bestätigt werden (vgl. 5.2.3). Dennoch scheint bei PC-3 und Caco-2-Zellen keine MG-132-induzierte Steigerung von sCLU stattzufinden. Dies deckt sich zwar mit Beobachtungen, die an metastasierten Neuroblastomzellen SK-N-AS (Nuutinen *et al.*, 2005) und gemischten Gliazellen (Saura *et al.*, 2003) gemacht wurden, jedoch zeigen andere Forschungsberichte gerade an PC-3-Zellen eine MG-132-abhängige Regulation von sCLU-Protein (Rizzi *et al.*, 2009a). Auf dieses Phänomen wird im Rahmen der mRNA-Analysen nochmals eingegangen (vgl. 5.2.3).

Ein weiterer Befund dieser Experimente zeigt, dass eine Kultur der Zellen bei 45°C sowie eine Behandlung mit MG-132 eine erhöhte Expression von sCLU in HEK-293-Zellen induzieren können, nicht aber eine Behandlung mit H₂O₂. Dies ist verwunderlich, da H₂O₂ indirekt über die Bildung von Hydroxyl-Radikalen ein stark oxidierendes Milieu in der Zellkultur schafft, was wiederum eine Hitzeschockantwort einleiten sollte. So konnte die erhöhte CLU-Synthese entsprechend an A431-Plattenepithelkarzinomzellen (Viard *et al.*, 1999) beobachtet werden. Daher lässt sich das bei den hier durchgeführten Experimenten erzielte Ergebnis anhand der gegenwärtigen Literatur nur schwer erklären. Ebenfalls an

HEK-293-Zellen durchgeführte Experimente in der Arbeitsgruppe Koch-Brandt, bei denen anstelle von 1 und 2 mM nur 0,5 mM H₂O₂ eingesetzt wurde, zeigten ebenfalls eine Abnahme der sCLU-Sekretion, wobei die Menge an sCLU und psCLU im Zelllysate im Vergleich deutlich gesteigert war (vgl. Diplomarbeit Matthias Hassemer). Dies könnte andeuten, dass die hier gewählten Bedingungen für die Peroxidbehandlung zu optimistisch angesetzt wurden, die Zellen also zum Zeitpunkt der Analyse schon kurz vor der Apoptose standen und daher keine Proteinbiosynthese mehr betrieben. Ein ähnlicher Effekt lässt sich bei der Hitzebehandlung nachvollziehen: die sCLU-Sekretion nimmt bei kürzerer Hitzeeinwirkung (90 min) enorm zu, fällt bei längerer Hitzeeinwirkung (120 min) jedoch wieder ab. Dies zeigt an, dass eine zu massive Stressbehandlung eher eine Abnahme des sCLU-Levels bedeutet, was vermutlich mit der generellen Herabregulation der Proteinsynthese und der Sekretion in solchen Zellen zusammenhängt.

5.1.2 Expression von nicht-sezernierten Clusterin-Formen in gestressten Zellen

Neben einer Induktion von sCLU ist in hitzebehandelten HEK-293-Zellen zusätzlich die Expression eines 50kDa- und eines 45kDa-CLU-Proteins in entsprechenden Western-Blots erkennbar, wobei die absolute Mengen deutlich hinter der von psCLU/sCLU zurückbleiben. Da diese Proteine nur im Zelllysate zu sehen sind und mit zwei verschiedenen, CLU-spezifischen Antikörpern detektiert wurden zeigt an, dass es sich um nicht-sezernierte CLU-Proteine handeln muss. Interessanterweise fällt die Expression des 45kDa CLU-Proteins bei längerer Einwirkung erhöhter Temperatur (120 min) deutlicher aus. Dieses Phänomen wird im Folgenden nochmals diskutiert (vgl. 5.2.3). Bei kürzeren Hitzebehandlungen (60 min) sind keine nicht-sezernierten CLU-Formen erkennbar. Dies scheint auch der Grund zu sein, warum sie in entsprechenden Ansätzen anderer Arbeitsgruppen nicht detektierbar waren (Michel *et al.*, 1997; Viard *et al.*, 1999; Loison *et al.*, 2006).

Die 50- und 45kDa-CLU-Proteine sind noch deutlicher in MG-132-behandelten HEK-293-Zellen erkennbar. Hier ist die Menge des 50kDa-Proteins etwas größer, jedoch immer noch weit geringer als die von psCLU/sCLU. Densitometrische Auswertungen von Western-Blots ergaben, dass der Anteil der nicht-sezernierten CLU-Formen in gestressten Zellen am Gesamtanteil des zellassozierten CLU lediglich 3,6% beträgt. Hierbei muss außerdem beachtet werden, dass sCLU fortlaufend von den Zellen abgegeben wird. Die Menge an zellassoziertem psCLU/sCLU stellt also einen *steady state* dar, wohingegen die Menge der nicht-sezernierten CLU-Formen deren tatsächliche Menge zum Zeitpunkt der Analyse repräsentiert. Zu erwähnen ist auch, dass in MCF-7-, Caco-2- und PC-3-Zellen keine 45kDa-CLU-Formen erkennbar ist, was mit einer zu geringen Expression von Variante 1 [Δex2] in diesen Zellen zusammenhängen könnte (vgl. 5.2.3, 5.3.5). Die Expression der nicht-sezernierten CLU-Formen auf MG-132-Gabe hin ist in ähnlichen Ansätzen auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet worden (Nizard *et al.*, 2007; Balantinou *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2009; Rizzi *et al.*, 2009a), jedoch wird in diesen Forschungsberichten nicht auf deren Ursprung eingegangen. Zumeist wird auf das von Leskov *et al.* beobachtete Exon 2-skipping als Ausgangspunkt zur Biosynthese verwiesen, jedoch ohne dies nachzuweisen (vgl. 1.3.3, 1.4.1.2).

5.2 Expressionsanalysen der einzelnen Clusterin-mRNA-Varianten in ungestressten und gestressten Zelllinien

Die in dieser Arbeit durchgeführten *in silico* und *in vitro* mRNA-Analysen schlossen die drei bekannten CLU-mRNA-Varianten 1, 2 und 3 sowie die Variante 1 [Δ ex2], welcher durch *exon-skipping* das Exon 2 fehlt, mit ein. Dabei wurde das Ausmaß der Regulation der einzelnen mRNAs auf proteotoxischen Stress, d.h. auf MG-132-Gabe hin, mittels sqPCR und qPCR bestimmt. Zuvor musste der Transkriptionsstart von Variante 1 per 5'-RACE ermittelt werden, da dieser in der Literatur nicht klar definiert ist.

5.2.1 Die Transkription von Clusterin-mRNA Variante 1 startet 23nt downstream der TATA-Box

Eine Kontroverse in der aktuellen Literatur betrifft die Sequenz von Variante 1, genauer deren 5'-Ende. Die Anfang der 1990er Jahre ermittelte Sequenz (RefSeq NM_001831.1) unterscheidet sich durch ein deutlich kürzeres Exon 1a von dem im Jahr 2004 veröffentlichten Datenbankeintrag (RefSeq NM_001831.3, vgl. 1.3.2). Die hier für mehrere Zelllinien durchgeführte 5'-RACE zeigt eindeutig, dass die Transkription von Variante 1 23nt *downstream* der TATA-Box startet, was dem klassischen Fall eines von RNA-Polymerase II gebildeten Transkripts entspricht (Nakatani *et al.*, 1990). Die exakte Sequenz des 5'-Bereiches ist mit der des ESTs BP211675 identisch und spiegelt somit bis auf zwei Nukleotide eine von Wong *et al.* 1994 ermittelte Sequenz wider (Wong *et al.*, 1994). Daher kann gesagt werden, dass der zurzeit in der *NCBI-GenBank* geführte Eintrag NM_001831.3 nicht die Sequenz der dominant exprimierten Variante 1 wiedergibt, was mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen übereinstimmt (Schepeler *et al.*, 2007). Der zugehörige Exon 1a abdeckende EST (BG914262.1) wurde in humanen Oligodendrogliomazellen nachgewiesen. Da es sich hierbei um Krebszellen handelt, ist nicht sicher, ob die dort isolierten mRNAs, also auch die des CLUs, wirklich in allen Zellen mit dieser Sequenz vorkommen, oder ob durch den entarteten Charakter der Krebszellen modifizierte mRNAs gebildet werden, was wiederum nicht den Zustand in gesunden Zellen bzw. Geweben widerspiegelt. Aus diesem Grund sollten Publikationen, die ihren Analysen die Sequenz NM_001831.3 als die dominante CLU-mRNA zu Grunde legen reevaluiert werden (Cochrane *et al.*, 2007; Londou *et al.*, 2008; Rizzi *et al.*, 2009b; Trougakos *et al.*, 2009a; Ling *et al.*, 2012).

Gleichermaßen müssen die genannten Punkte auch für die CLU-mRNA Sequenzen von *Pan troglodytes*, *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* berücksichtigt werden, da hier ähnlich 5'-verlängerte Datenbankeinträge vorhanden sind.

5.2.2 Variante 1 ist, gegenüber Variante 2, Variante 3 und Variante 1 [Δ ex2], die dominant exprimierte Clusterin-mRNA

Durch sqPCRs und qPCRs konnte eindeutig die per 5'-RACE charakterisierte Variante 1 (BP211675) als die dominante CLU-mRNA-Spezies identifiziert werden. Ihre Expression ist mit 2.000 bis 3.500 Kopien pro ng Gesamt-RNA in den untersuchten Zellen der der anderen Varianten deutlich überlegen und entspricht dem Gehalt an Gesamt-CLU-mRNA. Zusammen mit den Ergebnissen der 5'-RACE ergibt sich

so ein stimmiges Bild, da auch dort ausschließlich Variante 1-spezifische PCR-Fragmente generiert wurden, was ebenfalls für die relative Dominanz dieser CLU-mRNA spricht. Im Gegensatz dazu konnte die Expression von Variante 1 (NM_001831.3) mit verlängertem 5'-Ende nur in unbedeutenden Mengen per sqPCR nachgewiesen werden. Dies ist dahingehend interessant, da die Sequenz NM_001831.3 ein zusätzliches Startcodon im Exon 1a aufweist, welches als Translationsstartpunkt für nicht-sezernierte CLU-Formen diskutiert wird (Rizzi *et al.*, 2009b). Diese Hypothese kann hier zum einen aufgrund der überaus geringen Expression von Variante 1 (NM_001831.3), zum anderen durch Proteinexpressionsanalysen (vgl. 5.3.3) widerlegt werden. Die Expression der CLU-mRNA Varianten 2 und 3 ist ebenfalls sehr schwach, beide zusammen machen bei HEK-293-Zellen lediglich 0,009% an Gesamt-CLU-mRNA aus. Variante 2 lässt sich unter nicht-gestressten Bedingungen in keiner der untersuchten Zelllinien in quantifizierbaren Mengen nachweisen, Variante 3 lediglich in geringsten Mengen. Diese Ergebnisse decken sich mit Studien an primären Zellen aus kolorektalen Karzinomen (Schepler *et al.*, 2007), wobei dort die Diskrepanz zu Variante 1 noch deutlicher ausfällt.

Schließlich konnte im Zuge der hier durchgeführten Analysen das von Leskov *et al.* postulierte Exon 2-*skipping* von Variante 1 verifiziert werden, sodass sicher davon ausgegangen werden kann, dass es sich hierbei weder um ein für MCF-7-Zellen spezifisches Phänomen, noch um ein experimentelles Artefakt handelt, wie in anderen Forschungsberichten behauptet wird (Andersen *et al.*, 2007; Schepler *et al.*, 2007; Rizzi *et al.*, 2009a; Rizzi *et al.*, 2009b; Rizzi und Bettuzzi, 2010). Die resultierende mRNA-Variante 1 [Δ ex2] besitzt keine SSCR und stellt daher einen potentiellen Ausgangspunkt für die Translation nicht-sezernierter CLU-Isoformen dar. Für die korrespondierenden (s)qPCR-Analysen wurde eigens ein Primerpärchen validiert, das ausschließlich mit Variante 1 [Δ ex2] hybridisiert. Diese Validierung wurde in anderen Arbeiten versäumt (Devauchelle *et al.*, 2006), sodass die dort durchgeführten PCRs zu falsch positiven Ergebnissen führten. Die Quantifizierung zeigte, dass die mit den hier validierten Primerpärchen ermittelte Expression von Variante 1 [Δ ex2], ähnlich wie die der Varianten 2 und 3, vergleichsweise gering ist. So lassen sich in unbehandelten Zellen nur 0,5 Kopien pro ng Gesamt-RNA kalkulieren, was wiederum deutlich weniger als 0,01% an Gesamt-CLU-mRNA ausmacht. Das geringe Vorkommen dieser mRNA-Variante deutete sich bereits in den Arbeiten von Leskov *et al.* an, in denen eine hoch stringente PCR angewendet werden musste, um lediglich Spuren der korrespondierenden DNA-Bande zu amplifizieren (Leskov *et al.*, 2003).

5.2.3 Applikation von MG-132 resultiert in einer Hitzeschockantwort und der Induktion von Clusterin-mRNA-Varianten

Applikation von MG-132, d.h. Induktion von proteasomalem Stress, führt zu einer Hitzeschockantwort in den Zellen. Dies wird durch die Induktion von Hsp27-mRNA verdeutlicht, einem eindeutigen Indiz für das Vorhandensein einer Hitzeschockantwort (Kalmar und Greensmith, 2009; Liu *et al.*, 2010; Richter *et al.*, 2010). In ähnlicher Weise ist ein Anstieg der CLU-mRNA-Expression in den Zellen zu verzeichnen. In HEK-293- und MCF-7-Zellen wird die Menge an Variante 1 nochmals um den Faktor 10 auf ca. 15.000 Kopien pro ng Gesamt-RNA gesteigert, was wiederum eng mit dem Gehalt an Gesamt-CLU-mRNA und mit dem CLU-Proteinlevel in den entsprechend behandelten Zellen korreliert (vgl. 5.1). Dies deckt sich mit Beobachtungen in U-2-Osteosarkomzellen, WI38-Fibroblasten (Balantinou *et al.*, 2009) und U-251-

Astrocytomzellen (Loison *et al.*, 2006), bei denen ähnliche mRNA-Induktionen gemessen wurden. Der molekulare Mechanismus, der dieser Regulation zu Grunde liegt, schließt höchstwahrscheinlich HSF-1 und HSF-2 ein, welche die Transkription-regulierende CLE-Sequenz im CLU-Promotor binden (Loison *et al.*, 2006; Balantinou *et al.*, 2009). Zudem ist bekannt, dass MG-132 über Aktivierung von c-Jun N-terminale Kinasen (JNKs) die HSF-1 sowie die AP-1 abhängige Transkription positiv beeinflusst und so eine Hitzeschockantwort einleiten kann (Bush *et al.*, 1997; Pirkkala *et al.*, 2000; Park und Liu, 2001). Interessanterweise bleibt eine Induktion von Variante 1 in PC-3 und Caco-2-Zellen aus, obgleich auch hier eine Hitzeschockantwort stattfindet. Gleichermaßen ist auch keine Induktion der Gesamtmenge an CLU-mRNA zu erkennen und auch der Gesamt-CLU-Proteingehalt steigt in diesen Zellen nicht MG-132-abhängig an. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass infolge des entarteten Charakters dieser Krebszelllinien die HSF-vermittelte Regulation ausbleibt und somit keine Induktion der CLU-mRNA Variante 1 stattfindet. Wie noch später herausgestellt wird, sind gerade die unter der Kontrolle von HSF stehenden Hsps häufig in Krebszellen dysreguliert (vgl. 5.5). Anders als bei Variante 1 steigt die Expression der Varianten 2 und 3 in allen untersuchten Zelllinien auf MG-132-Gabe hin an. Trotz dieser gesteigerten Expression machen beide zusammen, je nach Zelltyp, nur zwischen 0,001 und 0,08% an Gesamt-CLU-mRNA aus. Warum diese mRNAs überhaupt auf Zellstress hin reguliert werden, kann nicht gesagt werden, da für *Homo sapiens* keine aussagekräftigen Promotoranalysen für die entsprechenden Genbereiche vorliegen. Eine CLE-Sequenz wie sie im Promotor von Variante 1 zu finden ist, lässt sich zumindest nicht ausmachen. Im Genom der Wachtel *Coturnix coturnix* sind das regulatorische Element *TGF- β -inhibitory element* sowie eine putative Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP-1 im Promotorbereich von Variante 2 zu finden (Michel *et al.*, 1995), jedoch sind auch hier keine Daten, die deren Einfluss auf die Transkription zeigen, bekannt.

Ähnlich wie die Expression der Varianten 2 und 3 steigt auch das Exon 2-*skipping* von Variante 1 in allen untersuchten Zelllinien durch Zugabe von MG-132 an, sodass vermehrt Variante 1 [Δ ex2] gebildet wird. Das Ausmaß dieses alternativen Splicings ist recht erheblich, so vervielfacht sich die Kopienzahl um den Faktor 100 auf 5 bis 20 Kopien pro ng Gesamt-RNA. Welche Faktoren den Anstieg des Exon-*skippings* begünstigen ist im Falle von CLU nicht bekannt. Man weiß, dass die zelluläre Splicing-Maschinerie tendenziell in Stresssituationen herabreguliert wird, also weniger Splicing stattfindet, außer im Falle von Hsp-mRNAs, deren Splicing zunimmt. Im Falle der Hsp47-mRNA werden beispielsweise, durch Zellstress induziert, alternative 5'-Splicing-Stellen genutzt um eine modifizierte Proteinisoform zu erzeugen. Der Mechanismus könnte dabei auf einem komplexen Zusammenspiel von Splicing-Faktoren (u.a. SR-Proteine und *small nuclear ribonucleic particles*) und sog. *nuclear stress bodies* beruhen (Biamonti und Caceres, 2009). Analog dazu könnte die CLU-mRNA-Variante 1, ebenfalls einem durch Zellstress induzierten, alternativen Splicing unterliegen, was die vermehrte Expression von Variante 1 [Δ ex2] auf MG-132-Gabe hin erklären würde. Dennoch muss festgehalten werden, dass Variante 1 [Δ ex2] selbst in gestressten Zellen unterrepräsentiert ist, da sie im Verhältnis zu dem Gehalt an Gesamt-CLU-mRNA nur 0,13% ausmacht. Ob sich das Ausmaß des Exon 2-*skippings* durch ausgedehntere Stressinduktionen weiter erhöhen lässt, wurde hier nicht untersucht. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die Expression von CLU₃₄₋₄₄₉ nach zweistündiger Hitzebehandlung bei HEK-293 im Ver-

gleich zur 90-minütigen Behandlung nochmals deutlich erhöht ist (vgl. 5.1.2). Da CLU₃₄₋₄₄₉ von Variante 1 [Δ ex2] codiert wird (vgl. 5.3.1) könnte dies andeuten, dass das Exon 2-*skipping* bei erhöhtem Zellstress verstärkt stattfindet, obgleich die Menge an Gesamt-CLU-Protein angesichts des massiven Zellstress eher rückläufig ist. Eine reziproke Korrelation zwischen der Expression von Variante 1- und Variante 1 [Δ ex2], wie sie in anderen Arbeiten beobachtet wurde, konnte allerdings nicht festgestellt werden (Markopoulou *et al.*, 2009; Bhutia *et al.*, 2012).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die mRNA-Variante 1, wie bereits erwähnt, die dominante CLU-mRNA repräsentiert und somit praktisch den Gesamtanteil an CLU-mRNA darstellt. Alle anderen Varianten, insbesondere die Varianten 2 und 3, sind stark unterrepräsentiert und tragen nur minimal zum gesamten CLU-mRNA-Gehalt bei. Diese Situation ändert sich auch nach Induktion einer Hitzeschockantwort nicht. In HEK-293- und MCF-7-Zellen werden alle Varianten ungefähr um den gleichen Faktor aufreguliert, das Verhältnis zwischen den einzelnen mRNAs verschiebt sich also kaum. Auch in MG-132-behandelten PC-3 und Caco-2-Zellen, in denen Variante 1 nicht aufreguliert wird, stellen Variante 1 [Δ ex2], vor allem aber Variante 2 und Variante 3 unterrepräsentierte CLU-mRNAs dar. Dementsprechend kann an dieser Stelle die physiologische Relevanz von Variante 2 und Variante 3 in Frage gestellt werden. Diese Hypothese wird sich im Folgenden noch erhärten.

5.3 Ektopische Expression distinkter Clusterin-cDNAs und Proteinexpressionsanalysen

Da die von den einzelnen CLU-mRNAs codierten Proteinformen bislang noch nicht bekannt sind, wurden für diese Arbeit die korrespondierenden cDNAs kloniert und in HEK-293-Zellen unter Kontrolle des CMV-Promotors zur Expression gebracht. HEK-293-Zellen wurden gewählt, da sie endogen alle CLU-mRNA-Varianten exprimieren und daher auch die codierten Proteine korrekt synthetisieren sollten. Durch Expression von punktmutierten cDNAs konnte weiterhin die Biogenese der nicht-sezernierten CLU-Formen aufgedeckt werden.

5.3.1 Die Expression aller Exon 2-enhaltenden cDNAs führt hauptsächlich zur Synthese von sezerniertem Clusterin

Eine erste Erkenntnis, die durch die Proteinexpressionsanalysen gewonnen wurde, ist, dass alle CLU-cDNAs zur Expression von psCLU/sCLU führen, vorausgesetzt, sie enthalten das für die SSCR codierende Exon 2 (i.e. Varianten 1, 2 und 3). Dabei übersteigt die Menge an sCLU, die von Variante 1 aus synthetisiert wird, bei Weitem die ausgehend von den Varianten 2 und 3. Variante 1 [Δ ex2] enthält kein Exon 2 und codiert für ein 45 kDa großes Protein, welches CLU₃₄₋₄₄₉ repräsentiert. Diese CLU-Form wird, neben den 50 kDa großen, nicht-sezernierten Formen CLU₁₋₄₄₉ und CLU₂₁₋₄₄₉, auch von den anderen cDNAs aus gebildet. CLU₁₋₄₄₉, CLU₂₁₋₄₄₉ und CLU₃₄₋₄₄₉ korrelieren mit den bei nicht-transfizierten Zellen beobachteten 50 kDa bzw. 45 kDa großen, nicht-sezernierten CLU-Proteinen (vgl. 5.1.2). Sie sind durch Überexpression der Exon 2-enhaltenden cDNAs bereits ohne vorangegangenen Zellstress detektierbar. Dies zeigen auch analoge Experimente anderer Arbeitsgruppen, wo nicht-sezernierte CLU-Formen

bereits durch bloße Überexpression von Variante 1-cDNA erkennbar sind (Reddy *et al.*, 1996b; Trougakos *et al.*, 2005; Moretti *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2013). Das Phänomen lässt sich durch den erhöhten Level an CLU-mRNA in den überexprimierenden Zellen erklären, sodass in diesem Fall eine Expression von CLU₁₋₄₄₉, CLU₂₁₋₄₄₉ und CLU₃₄₋₄₄₉ wahrscheinlicher wird (vgl. 5.3.3 und 5.3.5). Zudem könnte durch die Transfektion selbst ein Zellstress ausgelöst werden, was wiederum die Synthese der nicht-sezernierten CLU-Formen fördert. Dies wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter erforscht.

5.3.2 Die physiologische Relevanz der Clusterin-mRNA-Varianten 2 und 3 ist fraglich

Wie bereits erwähnt, ist die physiologische Relevanz der Varianten 2 und 3 fragwürdig, da sie endogen im Vergleich zu Variante 1 unterrepräsentierte mRNAs darstellen (vgl. 5.2.2). Des Weiteren konnte hier festgestellt werden, dass die von ihnen ausgehende sCLU-Expression durch vorhandenen uORFs vermindert wird. Solch translationale Regulation ist auch bei anderen mRNAs bekannt. Die Translation des Transkriptionsfaktors GCN4 aus *Saccharomyces cerevisiae* wird massiv durch den ersten und den letzten von vier uORFs auf der mRNA reguliert: unter normalen Bedingungen dissoziiert das Ribosom nach Translation von uORF1, spätestens nach Translation von uORF4 ab und es kommt nicht zur Expression des Hauptleserahmens. Bei Mangel an Nährstoffen wird die zelluläre Translation verlangsamt, sodass nach Translation von uORF1 nur ca. 50% der Ribosomen an uORF4 rechtzeitig reassoziieren. Es können dann mehrere Ribosomen am Hauptleserahmen reassoziieren, sodass dessen Translation erhöht wird (Miller und Hinnebusch, 1989; Meijer und Thomas, 2002). Ein anderes Beispiel ist der Transkriptionsfaktor C/EBP aus *Mus musculus*, dessen mRNA für vier Isoformen ausgehend von vier Startcodons (AUG 1-4) codiert und einen uORF enthält, der zwischen AUG 1 und 3 lokalisiert ist. Die Translation des uORFs wird wiederum von mehreren *upstream* gelegenen CUG-Tripletts durch Anlagerung eines CUG-Bindeproteins gewebspezifisch aktiviert. Nur wenn der uORF translatiert wird, kommt es zur Reinitiation der Translation an den AUGs 3 und 4, sodass in diesem Fall N-terminal verkürzte Formen von C/EBP entstehen können (Calkhoven *et al.*, 2000; Meijer und Thomas, 2002). Im Falle der CLU-mRNA-Varianten 2 und 3 ist eine inhibierende Wirkung der uORFs auf den Hauptleserahmen erkennbar. Ob diese unter bestimmten äußeren Bedingungen modifiziert werden kann ist nicht erforscht. Es muss daher festgehalten werden, dass die sCLU-Synthese ausgehend von diesen mRNAs stark vermindert ist. Da die Varianten 2 und 3 zudem noch unterrepräsentierte mRNAs darstellen ist davon auszugehen, dass ihr Beitrag zur Synthese von CLU-Protein irrelevant ist, was eingangs gemachte Behauptungen bestätigt (vgl. 1.3.4). Höchstwahrscheinlich werden aus diesem Grund sowohl Variante 2 als auch Variante 3 in der *NCBI-GenBank* als „nicht-proteincodierend“ geführt. Inwieweit sie dem mRNA-Abbau durch NMD unterliegen, wurde nicht untersucht. NMD vermittelt die Degradation von mRNAs, welche bestimmte atypische Charakteristika aufweisen. Dazu gehören, neben ungewöhnlich großen UTRs oder bestimmten *nonsense* Codons, auch uORFs, die mit dem Hauptleserahmen interferieren (Ruiz-Echevarria und Peltz, 2000; Maquat und Carmichael, 2001). Vor dem Hintergrund der hier gewonnen Erkenntnisse sollten manche Forschungsberichte entsprechend kritisch betrachtet werden, da teilweise bei Variante 2 von einer dominanten CLU-mRNA ausgegangen wird (Cochrane *et al.*, 2007; Trougakos *et al.*, 2009a; Rizzi und Bettuzzi, 2010; Ling *et al.*, 2012)

5.3.3 Biogenese und Charakteristiken nicht-sezernierter Clusterin-Isoformen

Durch die Expression punktmutierter cDNAs in HEK-293-Zellen und daran anschließenden Western-Blot Analysen wurde ersichtlich, dass die Translation an alternativen Startcodons auf Exon 1 von CLU-Variante 3 und Variante 1 (NM_001831.3) *upstream* des sCLU-Startcodons stattfinden kann, was ebenfalls die Biosynthese von sCLU führt. Somit lässt sich diese Hypothesen, die eine Biogenese nicht-sezernierter CLU-Formen ausgehend von diesen Startcodons postuliert (vgl. 1.4.1.1), widerlegen.

Weiterhin belegen die hier gezeigten Daten, dass ausgehend von mRNA-Variante 1 mehrere CLU-Formen translatiert werden können. Die dominante Form ist sCLU, dessen Translation vom sCLU-Startcodon auf Exon 2 aus startet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass CLU₃₄₋₄₄₉ vom Exon 3-Startcodon (AUG) aus gebildet wird. Somit kann diese CLU-Form potentiell über zwei Wege erzeugt werden. Die erste Möglichkeit stellt die interne Translationsinitiation am Exon 3-Startcodon dar, was beispielsweise über eine IRES erreicht werden könnte (vgl. 1.4.1.1, siehe unten). Die zweite Möglichkeit ist die Biogenese durch Translation von Variante 1 [Δ ex2], welche durch vorrausgegangenes Exon 2-*skipping* entsteht (vgl. 5.2.3). Ergänzend lässt sich an dieser Stelle sagen, dass auf Basis der gezeigten Daten experimentelle Ansätze, welche auf einen spezifischen, siRNA-vermittelten *knock-down* von Variante 1 [Δ ex2] abzielen, nicht einleuchten, da gleichermaßen auch die Exon 2-enthaltende Variante 1 von dieser siRNA erkannt werden würde (Leskov *et al.*, 2011). Auf der anderen Seite lassen sich Beobachtungen, die zeigen, dass im speziellen die Expression von CLU₃₄₋₄₄₉ nicht durch eine Gesamt-CLU-mRNA spezifische siRNA vermindert werden kann, nicht nachvollziehen (Trogakos *et al.*, 2004). Vermutlich spielt in diesem Zusammenhang die Verwendung kreuzreaktiver Antikörper eine Rolle (vgl. 5.3.5).

Eine in dieser Arbeit entdeckte, bisher unbekannte CLU-Isoform, stellt CLU₂₁₋₄₄₉ dar, welche ausgehend von einem CUG-Codon *downstream* der SSCR translatiert wird. Es weist eine sehr gute Kozak-Konsensussequenz auf, welche maßgeblich die Translationsinitiation an einem AUG- bzw. CUG-Codon reguliert (Kozak, 2002). Die ideale Kozak-Sequenz für Vertebraten sowie die umgebende Sequenz des CUG-Startcodons der CLU-mRNA sind in Abb. 5.1 A dargestellt. CUG-Codons als Translationsstarts sind zwar unüblich, jedoch nicht unbekannt. Prominente Beispiele stellen *eukaryotic translation initiation factor 4 gamma*, *c-myc* oder *FGF-2* dar, welche jeweils Isoformen ausbilden können, deren Biogenese ebenfalls von CUG-Startcodons aus startet (Vagner *et al.*, 1995; Kozak, 2002; Coldwell *et al.*, 2012). Im Fall von *c-myc* und *FGF-2* spielt dabei die translationale Regulation über IRES eine entscheidende Rolle. Interessanterweise zeigen 20nt der IRES von *FGF-2*, welche auch das CUG-Codon einschließen, eine große Homologie mit der umgebenden Sequenz des CUG-Startcodons auf der CLU-mRNA (Abb. 5.1 B). IRES-vermittelte Translationsinitiationen sind zumeist unabhängig von der 5'-*Cap*. Das Ribosom assembliert direkt an der IRES in der Nähe des Startcodons. Die Aktivität einer IRES hängt wiederum von der mRNA-Sekundärstruktur und von dessen Komplementarität zur 18S rRNA ab (Meijer und Thomas, 2002). In wie weit diese *in silico* Analysen auf das Vorhandensein einer IRES bei der CLU-mRNA hindeuten ist unklar und wurde während dieser Arbeit nicht erforscht. Jedoch ist dieser Fall nicht unwahrscheinlich und würde die Expression von CLU₂₁₋₄₄₉ durch interne Translationsinitiation erklären. Analog

könnte die potentielle IRES auch die Expression von CLU₃₄₋₄₄₉ steuern, da der Abstand vom CUG-Startcodon zum Exon 3-Startcodon lediglich 36 nt beträgt. Das eingangs geschilderte *leaky scanning* Modell scheint für die interne Translationsinitiation von CLU₂₁₋₄₄₉ bzw. CLU₃₄₋₄₄₉ weniger wahrscheinlich, da neben dem sCLU-Startcodon noch eine Reihe weiterer CUG-Codons *upstream* auf Exon 2 vorhanden sind (vgl. Abb. 4.9), die alle „überlaufen“ werden müssten (vgl. 1.4.1.1).

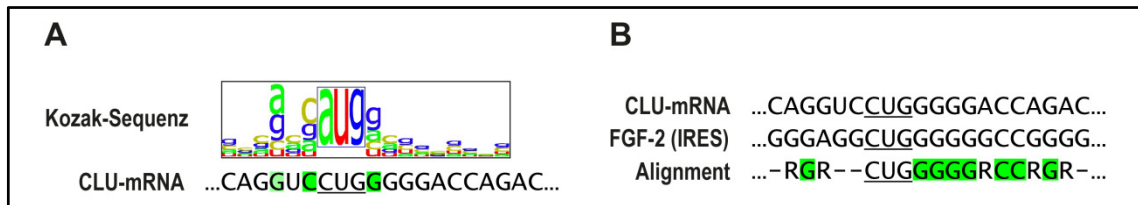


Abb. 5.1: Die umgebende Sequenz des CUG-Startcodons auf der CLU-mRNA weist eine ideale Kozak-Sequenz und eine hohe Homologie zur IRES von FGF-2 auf. **(A)** Dargestellt ist die ideale Kozak-Konsensussequenz (als WebLogo) bei Vertebraten (Kozak, 2002) sowie die umgebende Sequenz des CUG-Startcodons auf der CLU-mRNA (nt 54 bis 73, vgl. Abb. 1.1). Die kritischen Nukleotide (grün) stimmen alle mit der Konsensussequenz überein. **(B)** Alignment der umgebenden Sequenz des CUG-Startcodons aus der IRES von FGF-2 mit dem CUG-Startcodon aus der CLU-mRNA. Neben dem CUG-Triplett stimmen weitere 8 nt exakt überein (grün). Weiterhin sind 5 Purin-Transitionen erkennbar.

Neben CLU₂₁₋₄₄₉ und CLU₃₄₋₄₄₉ konnte eine dritte nicht-sezernierte CLU-Form identifiziert werden. CLU₁₋₄₄₉ ist das prä-Proprotein von psCLU/sCLU und wird demnach nicht detektiert, sobald das sCLU-Startcodon auf der cDNA mutiert ist. Teile von CLU₁₋₄₄₉ translozieren unter ER-Stressbedingungen nicht ins ER sondern akkumulieren im Cytosol und enthalten somit noch den kompletten N-Terminus mit Signalsequenz. Dies ist auf die unvollkommene Affinität des Komplexes aus CLU-Signalsequenz und SRP zum ER-Translokation zurückzuführen. Besonders deutlich wurde dies bei der Expressionsanalyse von Variante 1 (NM_001831.3), welche, wie bereits erwähnt, für ein N-terminal verlängertes prä-Proprotein codiert (vgl. 4.3.3). Entsprechend akkumulierte bei Zellen, die mit dieser cDNA transfiziert waren, CLU₁₋₄₄₉ als 60kDa großes Protein (vgl. Abb. 4.6 und Abb. 4.8, *). Diese Beobachtungen decken sich mit anderen Forschungsberichten und bestätigen die aktuell in der Literatur diskutierte Hypothese zur Mistranslokation des CLU-prä-Proproteins (Choi *et al.*, 2013). CLU₁₋₄₄₉ ist die dominanteste der nicht-sezernierten CLU-Formen. Da sie das Vorläuferprotein von psCLU/sCLU darstellt, ist entsprechend bei höheren sCLU-Expressionsraten das Ausmaß der Mistranslokation von CLU₁₋₄₄₉ größer. So ließen sich auch die Beobachtung einer entsprechenden CLU-Form bei Experimenten anderer Arbeitsgruppen deuten (Reddy *et al.*, 1996b; Trougakos *et al.*, 2005; Moretti *et al.*, 2007; Nizard *et al.*, 2007; Balantinou *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2009; Rizzi *et al.*, 2009a; Choi *et al.*, 2013). Ein anderes Protein, dessen Vorläufer ebenfalls einer solchen Mistranslokation unterliegen kann, ist PrP. (vgl. 1.4.1.4). Die Mistranslokation ist Teil eines cytoprotektiven Mechanismus, der sich *preemptive quality control* nennt. Die Zelle schützt sich so vor ER-Stress indem sie die mistranslozierten Proteine ins Cytosol abgeführt und dort abbaut (Kang *et al.*, 2006).

Somit konnten hier drei der eingangs vorgestellten Hypothesen zur Entstehung nicht-sezernierter CLU-Isoformen, i.e. die interne Translationsinitiation (vgl. 1.4.1.1, potentiell über IRES), Exon 2-*skipping* (vgl. 1.4.1.2) und die Mistranslokation (vgl. 1.4.1.4) im Rahmen dieser Arbeit verifiziert werden. Eine Hypothese, die hier nicht untersucht wurde, ist die Retrotranslokation (vgl. 1.4.1.3). Sie beschreibt ein 55 bis 60 kDa großes CLU-Protein als hypoglykosyliertes psCLU, welches in gestressten Zellen über GRP78 gebunden wird und so aus dem ER ins Cytosol translozieren kann (Nizard *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012).

Ein ähnliches Phänomen wurde bereits für das ER-ständige Chaperon Calreticulin beobachtet (Afshar *et al.*, 2005). Korrespondierende CLU-Proteinbanden konnten in der Tat bei den oben geschilderten Experimenten detektiert werden (z.B. Abb. 4.1 C, Spur 2; Abb. 4.12 B, Spur 4). Ob sie wirklich hypoglykosylierte psCLU darstellen, wurde nicht überprüft. In diesem Zusammenhang muss jedoch erwähnt werden, dass die Bindung von CLU an GRP78 auch in anderen Arbeiten beobachtet wurde, dort jedoch keine Retrotranslokation von psCLU auftrat (Wang *et al.*, 2013). Daher kann über die Richtigkeit dieser Hypothese nur spekuliert werden. Die gesammelten Erkenntnisse zur Biogenese der einzelnen CLU-Isoformen sind in Tab. 5.1 zusammengefasst.

Tab. 5.1: Eigenschaften der einzelnen CLU-Isoformen. In roter Schrift sind die dominanten CLU-Isoformen dargestellt. Im Laufe dieser Arbeit wurde insbesondere die Biogenese der nicht sezernierten CLU-Isoformen (blaue Schrift) erforscht. ¹⁾Die tatsächlichen Molekülgrößen der nicht-sezernierten Proteine sind anhand ihrer Primärstruktur kalkuliert, die der sezernierten Proteine stammen aus massenspektroskopischen Untersuchungen (Kapron *et al.*, 1997).

CLU Isoform	Biogenese	tatsächliche Größe [kDa] ¹⁾	Größe auf SDS-PAGE (reduzierend) [kDa]	Lokalisation
psCLU	ist die co-translational ins ER translozierte Vorläuferform von sCLU; geht aus CLU ₁₋₄₄₉ hervor und enthält fünf Disulfidbrücken	58,5-63,5	60-80	ER; <i>high-mannose</i> glykosyliert
sCLU	geht aus psCLU durch komplexe Glykosylierung, und Separierung von α - und β -Kette durch Proprotein-Konvertasen hervor	α -Kette 24,2-31,3 β -Kette 32,8	α -Kette 34-36 β -Kette 37-39	Golgi-Apparat, sekretorische Vesikel, extrazellulär; komplex glykosyliert
CLU₁₋₄₄₉	Translationsstart am sCLU Startcodon als psCLU/sCLU prä-Proprotein → sporadische Mistranslokation ins Cytosol unter Zellstress	52,5	ca. 50	cytosolisch, nicht glykosyliert
CLU₂₁₋₄₄₉	interne Translationsinitiation am CUG-Startcodon auf Exon 2 <i>downstream</i> der SSCR, nur unter Zellstress detektierbar	50,2	ca. 50	cytosolisch, nicht glykosyliert
CLU₃₄₋₄₄₉	1) interne Translationsinitiation am AUG-Startcodon auf Exon 3 <i>downstream</i> der SSCR 2) Exon 2- <i>skipping</i> generiert Variante 1 [Δ ex2], welche nur für diese CLU Form codiert nur unter Zellstress detektierbar	48,8	ca. 45	cytosolisch, nicht glykosyliert

5.3.4 Zelluläre Lokalisation nicht-sezernierter Clusterin-Isoformen

Eine Reihe an Forschungsberichten zeigen eine Zellkern-assoziierte Lokalisation (nCLU, vgl. 1.4.2.1) von nicht-sezernierten CLU-Formen in gestressten Zellen, insbesondere von CLU₃₄₋₄₄₉ (Leskov *et al.*, 2003; Leskov *et al.*, 2011). Das Ausmaß der zu beobachtenden nukleären Lokalisation ist dabei erheblich, sodass teilweise das gesamte intrazelluläre CLU im Nukleus gefunden wurde (Yang *et al.*, 1999; Caccamo *et al.*, 2003; O'Sullivan *et al.*, 2003; Caccamo *et al.*, 2004; Scaltriti *et al.*, 2004a; Caccamo *et al.*, 2006; Rizzi *et al.*, 2009a). Dies ist jedoch äußerst fragwürdig, da die hier gefundenen nicht-sezernierten CLU-Formen (CLU₁₋₄₄₉, CLU₂₁₋₄₄₉ und CLU₃₄₋₄₄₉) selbst in gestressten Zellen nur in geringen Mengen vorliegen (ca. 3,6% des gesamten zellassoziierten CLU-Proteins, vgl. 5.1.2) und im Vergleich zum ER/Golgi-ständigem psCLU/sCLU unterrepräsentiert sind. Entsprechend wurden im Laufe der Jahre auch kritische Töne von anderen Forschergruppen laut, welche insbesondere die Art und Weise infrage stellten,

wie nCLU identifiziert wurde. So könne man nie ausschließen, dass bei Zellen mit zerstörter Zellmembran, in denen nCLU offenbar vermehrt auftritt, große Teile des extrazellulären sCLUs mit dem Zellkern assoziieren, da dieses eine hohe Affinität zur nukleären Membran aufweist. Dies wiederum könnte zu falschen Aussagen bei der Auswertung von Zellfraktionierungen oder Immunfärbungen führen. Viele Arbeiten würden auch vernachlässigen, dass sCLU die Hauptform des Proteins darstellt, sodass eine Assoziation des gesamten zellulären CLUs mit dem Nukleus nur sehr schwer zu erklären ist (Humphreys *et al.*, 1997; Nizard *et al.*, 2007; Wyatt *et al.*, 2009a). Häufig wurden immunhistochemische Färbungen herangezogen, um Aussagen zur Lokalisation nicht-sezernierter CLU-Formen zu treffen. Diese Methode lässt jedoch aufgrund der schlechteren Auflösung gesamter Gewebsschnitte keine exakten Aussagen zu. Es kann hier keine Unterteilung zwischen ER, Golgi-Apparat oder cytosolischem Subkompartiment getroffen werden, sodass die CLU-Lokalisation in diesen Arbeiten allgemein nur als „cytoplasmatisch“ geschildert wird. (Akakura *et al.*, 1996; Pucci *et al.*, 2004; Ricci *et al.*, 2007; Bettuzzi und Rizzi, 2009; Pucci *et al.*, 2009; Bhutia *et al.*, 2012).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Zellfraktionierungen und immuncytochemische Aufnahmen wurden an Zellen, die die distinkten CLU-Isoformen exprimieren, durchgeführt. Dieser Ansatz, in Kombination mit hochauflösender LSM-Technik, zeigt eindeutig, dass psCLU/sCLU im ER/Golgi und alle nicht sezernierten CLU-Formen im Cytosol zu finden sind. Die Lokalisation bleibt auch in gestressten Zellen erhalten. Zudem konnte durch das LSM ausgeschlossen werden, dass man nukleäre Invaginationen des Cytosols als nukleäre Bestandteile fehlinterpretiert, da alle Zellebenen einzeln gerastert werden. Ähnliche Daten wurden jüngst von anderen Arbeitsgruppen veröffentlicht und bestätigen die hier gewonnenen Ergebnisse (Chayka *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Ling *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). Eine nukleäre Lokalisation konnte auch dort, analog zu dieser Arbeit, nicht festgestellt werden. Um eine solche zu erreichen, musste in einigen Experimenten sogar eine artifizielle NLS N-terminal vor das Polypeptid kloniert werden (Wei *et al.*, 2009). Somit scheinen die drei potentiellen endogenen NLS (vgl. 1.4.2.1) innerhalb der nicht-sezernierten CLU-Proteine inaktiv zu sein. Interessanterweise deckt sich dieser Befund auch mit den von Leskov *et al.* gemachten Beobachtungen, die eine cytosolische Lokalisation von 45kDa großem CLU₃₄₋₄₄₉ nahelegen. Durch Zellstress, i.e. ionisierende Strahlung, könne diese CLU-Isoform jedoch unbekannte Modifikationen erfahren und dadurch als ca. 55kDa großes Protein in den Nukleus transloziert. So wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei CLU₃₄₋₄₄₉ um ein nCLU-Vorläufer-Protein handelt (Leskov *et al.*, 2001; Leskov *et al.*, 2003; Araki *et al.*, 2005; Leskov *et al.*, 2011). Die hier gesammelten Ergebnisse falsifizieren diese Annahme in jedem Fall, da alle nicht-sezernierten CLU-Formen unabhängig voneinander exprimiert werden. CLU₁₋₄₄₉ ist das prä-Proprotein von psCLU/sCLU und CLU₂₁₋₄₄₉ sowie CLU₃₄₋₄₄₉ werden von distinkten Translationsstartpunkten auf der CLU-mRNA aus gebildet. Sie können nicht über post-translationale Modifikationen ineinander überführt werden. Auch Beobachtungen, die eine Co-Lokalisation nicht-sezernierter CLU-Isoformen mit den Mitochondrien nahelegen (vgl. 1.4.2.2) können durch die hier durchgeführten Experimente nicht bestätigt werden. Mitochondrien sind, z.B. zum Ca²⁺-Austausch, auf eine räumliche Nähe zur ER-Membran angewiesen, d.h. sie sind größtenteils entlang des ERs lokalisiert (Grimm, 2012). Betrachtet man nun die diffuse, cytosolische Färbung der nicht-sezernierten CLU-Formen, so scheint es unwahrscheinlich, dass diese eine spezifische Interaktion mit den

Mitochondrien eingehen. Dies konnte u.a. durch Vorexperimente der AK Koch-Brandt bestätigt werden. Dabei wurden gezielt die Mitochondrien mit fluoreszierenden Markerproteinen angefärbt und keine Überlagerung mit der Färbung der nicht-sezernierten CLU-Formen festgestellt (Daten nicht gezeigt). Abschließend konnte gezeigt werden, dass die cytosolischen CLU-Isoformen generell keine Modifikationen in Form von Glykosylierungen tragen. Dies ist so für cytosolische Proteine zu erwarten, da sie nicht das ER/Golgi-Kompartiment passiert haben, das über die benötigte Enzytausstattung zur Bildung von Glykoproteinen verfügt. Auch das Vorhandensein von Disulfidbrücken innerhalb der nicht-sezernierten CLU-Formen ist unwahrscheinlich, da deren Ausbildung ebenfalls vom oxidierenden Milieu des Golgi-Apparats abhängt.

Angesichts der hier gezeigten Daten sollten Teile der aktuellen Literatur einer kritischen Reevaluation unterzogen werden, da weder eine Co-Lokalisation nicht-sezernierter CLU-Isoformen mit dem Nukleus noch mit den Mitochondrien festgestellt werden konnte.

5.3.5 Regulation der Expression nicht-sezernierter Clusterin-Isoformen

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse belegen, dass die cytosolischen CLU-Isoformen ausschließlich in durch Noxen geschädigten Zellen exprimiert werden, wobei der Zellstress durch Kultur bei erhöhter Temperatur oder Behandlung mit MG-132 induziert wurde. Bekannt ist, dass diese Agenzien einen proteotoxischen Stress in der Zelle auslösen. Inwieweit hier auch oxidativer Stress eine Rolle spielt (Trogakos und Gonos, 2009), konnte nicht abschließend geklärt werden, da auf H₂O₂-Behandlung keine Expression der cytosolischen CLU-Formen beobachtet wurde (vgl. 5.1.2). In jedem Fall lässt sich das Auftreten dieser Proteine primär auf eine Induktion der CLU-mRNA Variante 1 zurückführen, die höchstwahrscheinlich über HSFs reguliert wird (vgl. 1.3.1, 1.5.1). Variante 1 repräsentiert die dominante CLU-mRNA und codiert neben sCLU, wie oben geschildert, auch für die anderen CLU-Isoformen (vgl. 5.3.3). Das bedeutet, dass ein transkriptioneller Anstieg dieser mRNA neben einer erhöhten Expression von sCLU auch zu einem größeren Anteil an nicht-sezernierten CLU-Isoformen führt. Zudem nimmt durch erhöhtes Splicing von Variante 1 auch die Menge an Variante 1 [Δ ex2] und damit die Menge an CLU₃₄₋₄₄₉ zu. Letzteres scheint jedoch nur bei den hier analysierten HEK-293-Zellen der Fall zu sein. In gestressten MCF-7, PC-3 oder Caco-2-Zellen war kein CLU₃₄₋₄₄₉ detektierbar. Im Falle der cytosolischen Isoformen CLU₁₋₄₄₉ und CLU₂₁₋₄₄₉ spielt neben der transkriptionellen Regulation auch der verminderte proteasomale Abbau in gestressten Zellen eine Rolle. Dies konnte zum Teil auch durch die Arbeiten anderer Arbeitsgruppen gezeigt werden (Nizard *et al.*, 2007; Balantinou *et al.*, 2009; Rizzi *et al.*, 2009b). CLU₃₄₋₄₄₉ hingegen scheint keiner post-translationalen Regulation in Form eines proteasomalen Abbaus zu unterliegen (vgl. Abb. 5.2). Die in anderen Forschungsberichten postulierten post-translationalen Modifikationen nicht-sezernierter CLU-Isoformen in Form von Ubiquitinierungen (Rizzi *et al.*, 2009a; Xue *et al.*, 2012) konnten in dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden, da sich auf entsprechenden Western-Blots keine Proteinbanden fanden, die eine (poly-)ubiquitinierte CLU-Form repräsentieren könnten.

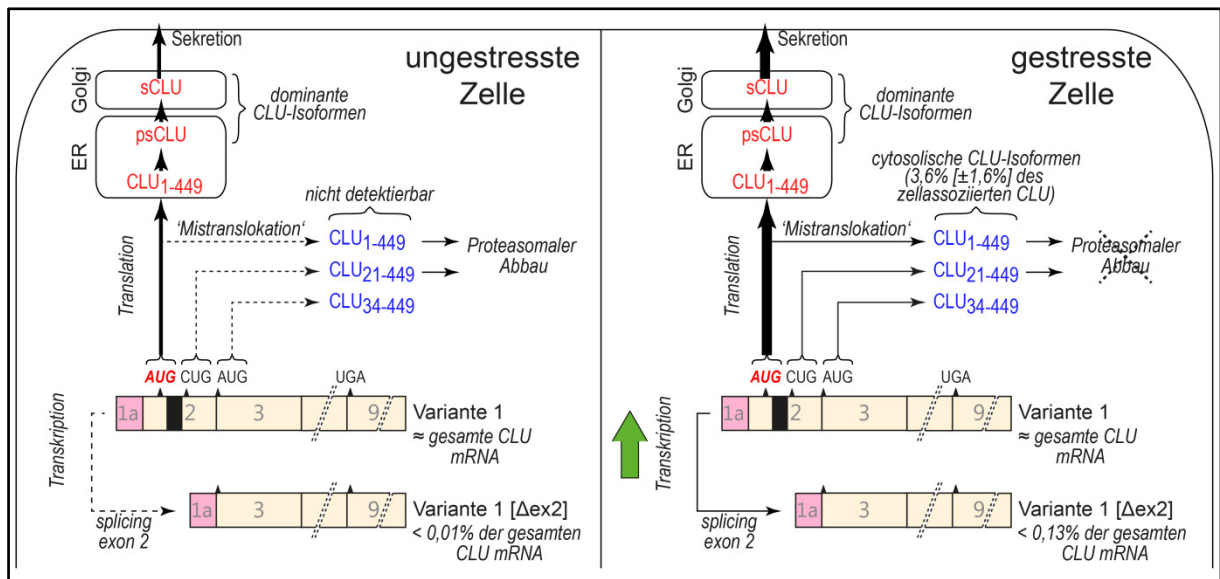


Abb. 5.2. Expression von cytosolischen CLU-Isoformen. Skizziert ist die Synthese der einzelnen CLU-Isoformen in ungestressten und gestressten Zellen. Die dominante Isoform sCLU wird ausgehend vom sCLU-Startcodon auf CLU-mRNA-Variante 1 gebildet. Die mRNA-Varianten 2 und 3 sind vermutlich physiologisch irrelevant. Unter ungestressten Bedingungen werden CLU₁₋₄₄₉ (Mistranslokation des sCLU prä-Proproteins) und CLU₂₁₋₄₄₉ (vom Exon 2 CUG-Codon translatiert) gebildet, unterliegen jedoch proteasomalem Abbau und sind daher nicht detektierbar. CLU₃₄₋₄₄₉ wird sowohl ausgehend vom Exon 3 AUG auf mRNA-Variante 1 als auch von Variante 1 [Δex2] gebildet. Es unterliegt zwar keinem proteasomalen Abbau, ist jedoch aufgrund der geringen Expression ebenfalls nicht detektierbar. Induktion von zellulärem Stress (z.B. durch erhöhte Temperatur oder MG-132-Gabe) resultiert sowohl in einer transkriptionellen Steigerung der Synthese von mRNA-Variante 1 als auch in einer Steigerung des Exon-2-skippings zu Variante 1 [Δex2]. Dies führt zu einer erhöhten Expression aller CLU-Isoformen, wobei sCLU die dominante Isoform bleibt. Zusätzlich trägt der verminderte proteasomale Abbau zur Akkumulation der Isoformen CLU₁₋₄₄₉ und CLU₂₁₋₄₄₉ bei. Die cytosolischen Isoformen machen in gestressten Zellen 3,6% des gesamten zellassoziierten CLU aus.

In wie weit die Expression von nicht-sezernierten CLU-Formen durch andere Arten von induziertem Zellstress (z.B. durch ionisierende Strahlung, Ca²⁺-Depletion, Serumentzug, Etoposid, TGF-β, TNF-α, Indocyaningrün, Vanadium, Überexpression von c-Fos, IL-24 oder pVHL, vgl. 1.4.2) beeinflusst wird, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. In den meisten Fällen ist der Sachverhalt ohnehin äußerst kontrovers. So wurde von manchen Arbeitsgruppen das Auftauchen nicht-sezernerter CLU-Formen auf Behandlung von Zellen mit TGF-β nicht festgestellt (Laping *et al.*, 1994; Morgan *et al.*, 1995; Jin und Howe, 1999; Wegrowski *et al.*, 1999), obgleich genau dieser Stimulus unter ähnlichen Versuchsbedingungen eine massive Akkumulation von potentiell nukleärem CLU zur Folge hatte (Reddy *et al.*, 1996a). Ähnliches kann auch über die beobachtete nukleäre Lokalisation von CLU auf Etoposid-Gabe hin gesagt werden (Caccamo *et al.*, 2004; Scaltriti *et al.*, 2004a; Pajak und Orzechowski, 2007), welche von anderen Arbeitsgruppen nicht nachvollzogen werden konnte (Zhang *et al.*, 2005). Grund hierfür könnten wiederum fehlerbehaftete Auswertungen von immuncyto- und histochemischen Färbungen oder Zellfraktionierungen sein (vgl. 5.3.4). Die Verwendung eines Primärantikörpers ((H-330) sc-8354) in Western-Blots oder immuncytochemischen Analysen, welcher potentiell CLU₃₄₋₄₄₉ spezifisch detektieren soll, ohne dabei mit psCLU/sCLU zu reagieren, stellt eine weitere Fehlerquelle dar (Leskov *et al.*, 2001; Leskov *et al.*, 2003; Trougakos *et al.*, 2004). Laut Hersteller ist das Epitop dieses polyklonalen Antikörpers der C-Terminus des humanen CLU. Die alleinige Spezifität für CLU₃₄₋₄₄₉ ist jedoch nicht durch experimentelle Daten belegt und wegen der Sequenzidentität zu sCLU auch äußerst unwahrscheinlich.

5.4 Funktion nicht-sezernerter CLU-Isoformen

5.4.1 Chaperonaktivität

Eine eingängig analysierte Funktion von sCLU ist dessen Aktivität als molekulares Chaperon (vgl. 1.6). Diese konnte in der vorliegenden Arbeit eindeutig verifiziert werden, da durch Hitze denaturierte Zielproteine, z.B. Katalase oder Transferrin, durch Zugabe von rekombinanten sCLU nicht ausfielen, sondern als solubilisierete Proteinkomplexe in Lösung verblieben. Eine von sCLU ausgehende Schutzfunktion der enzymatischen Aktivität der Zielproteine konnte jedoch, wie auch in anderen Arbeiten gezeigt (Humphreys *et al.*, 1999; Poon *et al.*, 2000), nicht festgestellt werden. So ließ sich zum einen die Chaperonfunktion von sCLU, zum anderen die korrekte Aktivität des für diese Experimente aus HEK-293-Zellen aufgereinigten, rekombinanten Proteins bestätigen. Interessanterweise war sCLU auch im Stande, die Präzipitation von komplexen Proteinlösungen, i.e. löslichem Zellextrakt aus nekrotischen Zellen, zu verhindern. Dieses Ergebnis bestärkt die anti-inflammatorische Rolle von sCLU im Rahmen der extrazellulären Protein-Homöostase. Es ist bekannt, dass intrazelluläre Proteine aus nekrotischen Zellen die Expression pro-inflammatorischer Cytokine, z.B. IL-1, TNF- α oder *monocyte chemotactic protein-1*, vermitteln können (Rock und Kono, 2008; Baiersdörfer *et al.*, 2010). Durch Solubilisierung von nekrotischem Protein kann sCLU eine Entzündungsreaktion verhindern und weiterhin die Endocytose der entstehenden Proteinkomplexe über spezielle Rezeptoren in professionelle und nicht-professionelle Phagozyten initiieren (Bartl *et al.*, 2001; Bailey *et al.*, 2002; Yerbury *et al.*, 2005b). So lässt sich leicht die vermehrte Expression von CLU in vitalen Zellen um einen nekrotischen Herd herum verstehen (z.B. Koch-Brandt und Morgans, 1996; McLaughlin *et al.*, 2000; Wehrli *et al.*, 2001). Komponenten aus den nekrotischen Zellen, die wiederum die Induktion der CLU-Expression in diesen Zellen steuern, scheinen u.a. dsRNA (Baiersdörfer *et al.*, 2010) oder Phosphatidylserin (Bach *et al.*, 2001) zu sein. Im Falle von Amyloidosen hingegen könnte die Chaperonaktivität des sCLUs wegen der Fülle an fibrillärem bzw. fehlgefaltetem Protein überlastet zu sein, sodass es schließlich im Komplex mit den Proteinablagerungen zu finden ist. (vgl. 1.6.2).

Ausgehend von der beschriebenen Chaperonaktivität von *in vitro* deglykosyliertem sCLU wurde kürzlich postuliert, dass auch die cytosolischen CLU-Isoformen eine entsprechende Aktivität aufzeigen könnten (vgl. 1.6.4). Bei den durchgeführten Präzipitationsassays ließ sich jedoch keine Chaperonfunktion der cytosolischen CLU-Isoformen CLU₂₁₋₄₄₉ bzw. CLU₃₄₋₄₄₉ nachweisen. Es muss dabei beachtet werden, dass die für diese Experimente eingesetzten CLU-Formen aus Bakterien unter Verwendung hochmolekularer Harnstoffpuffer aufgereinigt wurden. Zwar schloss sich eine entsprechende Rückfaltung an, deren Erfolg konnte jedoch nicht einwandfrei überprüft werden. Diese Schritte waren nötig, da CLU₂₁₋₄₄₉ bzw. CLU₃₄₋₄₄₉ aufgrund der fehlenden Glykosylierung und ihres hydrophoben Charakters eine starke, aggregierende Wirkung zeigten. So lässt sich zwar die Fragestellung nach deren Chaperonaktivität nicht abschließend klären, ist jedoch äußerst unwahrscheinlich.

5.4.2 Einfluss auf die zelluläre Apoptose

Eine häufig in der Literatur zu findende Hypothese geht davon aus, dass den nicht-sezernierten CLU-Formen eine pro-apoptotische Wirkung zukommt. Diese sei u.a. auf die potentiell nukleäre Lokalisation dieser Proteine und eine daraus resultierende Interaktion mit dem DNA-Reperaturkomplex Ku70/Ku80 zurückzuführen (vgl. 1.7.2). Diese Hypothese lässt sich, hinsichtlich der in dieser Arbeit festgestellten, cytosolischen Lokalisation der nicht-sezernierten CLU-Formen, nicht belegen. Dennoch gibt es weiterführende Forschungsberichte, die den nicht-sezernierten CLU-Formen eine Funktion bei der Apoptose zuschreiben, indem sie mit Proteinen aus der Bcl-2-Familie interagieren. Dabei identifizierte man über *in silico* Analysen eine theoretische BH3-Domäne im C-Terminus von CLU₃₄₋₄₄₉, welche für die Bindung an die Apoptose-Mediatoren der Bcl-2-Familie verantwortlich gemacht wird (Yang *et al.*, 2000; Leskov *et al.*, 2003; Pucci *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011; Leskov *et al.*, 2011; Suk, 2012). So könnten anti-apoptotische Vertreter, z.B. Bcl-xL, von CLU gebunden und auf diese Weise pro-apoptotisches Bax freigesetzt werden. CLU würde dann eine Funktion ähnlich der BH3-*only* Vertreter, z.B. Bad, wahrnehmen. Experimentell nachgewiesen ist das Vorhandensein dieser Domäne nicht. Außerdem ist nicht geklärt, warum ausschließlich CLU₃₄₋₄₄₉ die BH3-Domäne besitzen sollte, zumal der entsprechende Proteinabschnitt (AS 316-336) auch bei allen anderen CLU-Isoformen vorkommt.

Dass neben CLU₃₄₋₄₄₉ auch psCLU und sCLU ein direkter Einfluss auf den Bax-abhängigen Apoptoseweg zugeschrieben wird macht den Sachverhalt umso kontroverser. Es ist nicht klar, wie diese ER/Golgi-ständigen CLU-Formen ins Cytosol gelangen könnten (vgl. 1.7.2). Daher wurde im Zuge der hier durchgeführten Experimente der Einfluss distinkter CLU-Isoformen auf die intrinsische Apoptose analysiert. Es stellte sich heraus, dass keine der CLU-Formen spontan eine Apoptose in HEK-293 oder PC-3-Zellen auslöste. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass den Zellen ein apoptotischer Stimulus fehlt und CLU erst dann seine Apoptose-beeinflussende Wirkung zeigt. Folglich wurden die Zellen mit MG-132 behandelt, welches nachgewiesenermaßen den intrinsischen Apoptoseweg über eine Aktivierung der Caspasen 3, 7 und 9 auslöst (Yuan *et al.*, 2008). Es zeigte sich zwar, wie erwartet, eine Zunahme der Caspase 3/7-Aktivität, jedoch konnte durch gezielte Überexpression der einzelnen CLU-Formen keine signifikante Änderung dieser Aktivität herbeigeführt werden. In einem abschließenden Experiment konnte auch kein Effekt einzelner CLU-Isoformen auf den Zelltod Bax-überexprimierender Zellen festgestellt werden. Somit ist eine Wirkung von CLU auf den intrinsischen Apoptoseweg äußerst fragwürdig. Es muss davon ausgegangen werden, dass die hypothetische BH3-Domäne innerhalb des CLU-Proteins entweder nicht existent ist, oder, wenn vorhanden, nicht die Bindung an Mediatoren der intrinsischen Apoptose vermittelt. Auch ein direkter Effekt der sezernierten CLU-Isoform auf die zelluläre Apoptose konnte nicht festgestellt werden. Somit ließen sich die in anderen Arbeiten beobachteten Einflüsse von CLU auf die Apoptose nicht nachvollziehen. Denkbar wäre, dass entsprechende Effekte zelltyp- bzw. zelllinienspezifisch auftreten und z.B. häufiger bei Krebszellen, u.a. MCF-7-Brustkrebszellen (Yang *et al.*, 2000; Leskov *et al.*, 2003; Leskov *et al.*, 2011), PNT1a-Prostatakrebszellen (Scaltriti *et al.*, 2004a; Caccamo *et al.*, 2006; Moretti *et al.*, 2007), Sa-, KH- oder U-2-Osteosarcomazellen (Trogakos *et al.*, 2004; Trogakos *et al.*, 2005) oder Lan-5-Neuroblastomazellen (Cervellera *et al.*, 2000) beobachtet wurden. Interessanterweise werden ähnliche Möglichkeiten von PrP auf die Zellvitalität dis-

kutiert. Auch hier wurde gezeigt, dass durch proteotoxischen Zellstress entstehende, cytosolisch akkumulierte Isoformen des normalerweise sezernierten PrP keinen toxischen Effekt auf N2a-Zelllinien haben, nicht aber auf primäre Neurone sowie BE(2)-M17- und SK-N-SH-Zelllinien, sodass von einem zelltypspezifischen Effekt ausgegangen wird (Roucou *et al.*, 2003). Im Falle von cytosolischen CLU-Isoformen spricht jedoch die Tatsache, dass eine apoptotische Wirkung von CLU auch an HEK-293 (Zhang *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2011) und PC-3-Zellen (Scaltriti *et al.*, 2004a; Zhang *et al.*, 2005; Moretti *et al.*, 2007) beobachtet wurde, gegen einen solch zelltypspezifischen Effekt. Dennoch konnte dieser, wie oben beschrieben, durch hier durchgeführte Experimente an eben diesen Zellen nicht nachvollzogen werden und deckt sich mit Berichten anderer Arbeitsgruppen (Xue *et al.*, 2012).

Ein Punkt, der in der vorliegenden Arbeit nicht erforscht wurde, ist der Einfluss von CLU auf den extrinsischen Apoptoseweg. Dieser könnte durch Behandlung von Zellen mit TNF- α oder einem Fas-Rezeptor aktivierenden Liganden bzw. Antikörper ausgelöst werden. Es bleibt aber festzuhalten, dass der extrinsische Apoptoseweg ebenfalls von MG-132 aktiviert werden kann und über Caspase 8 gleichermaßen eine Aktivierung von Caspase 3/7 zur Folge hat (Yuan *et al.*, 2008). Dementsprechend decken die hier durchgeführten Experimente diese Möglichkeit gewissermaßen ab, sodass CLU höchstwahrscheinlich auch kein Effekt auf den extrinsisch aktivierten Apoptoseweg zugesprochen werden kann.

5.4.3 Einfluss auf den NF- κ B Signaltransduktionsweg

Der Einfluss von CLU-Isoformen auf die zelluläre Signaltransduktion wurde in einer Reihe verschiedener Arbeiten analysiert. Im Mittelpunkt steht dabei die potentielle Regulation der NF- κ B-vermittelten Signaltransduktion durch Interaktion distinkter CLU-Formen mit den sogenannten I κ Bs (vgl. 1.8.2). Die Aktivität des Transkriptionsfaktors wurde dabei durch Reporterassays, ELISA oder Western-Blots analysiert (Santilli *et al.*, 2003; Devauchelle *et al.*, 2006; Savkovic *et al.*, 2007; Bettuzzi *et al.*, 2009; Chayka *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; Takase *et al.*, 2008; Bettuzzi *et al.*, 2009; Zoubeidi *et al.*, 2010a; Zoubeidi *et al.*, 2010b; Bartuzi *et al.*, 2013). Zumeist wurden die Zellen mit TNF- α behandelt, um den NF- κ B-Signalweg zu initiieren. Aktivierung von NF- κ B über den synthetische Aktivator Caerulein (Savkovic *et al.*, 2007) macht in diesem Zusammenhang keinen Sinn, da es direkt die Degradation von I κ Bs initiiert (Tando *et al.*, 1999). Daher wurden die in dieser Arbeit durchgeführten Reporterassays ebenfalls an Zellen durchgeführt, die zuvor mit TNF- α inkubiert wurden. Dies führte zu einer 8-fachen Erhöhung der NF- κ B-Aktivität in den Zellen. Es wurde jedoch festgestellt, dass weder die Überexpression von sCLU noch von CLU₁₋₄₄₉ oder CLU₂₁₋₄₄₉ einen Einfluss auf das Ausmaß dieser Aktivierung hat. Das deutet daraufhin, dass von diesen CLU-Formen kein modulierender Effekt auf den NF- κ B-Signalweg ausgeht. Dies war bei einer Überexpression von sCLU ohnehin zu erwarten, da diese Isoform nicht cytosolisch vorliegt und ausgehend von diesen Ergebnissen auch keine indirekte Wirkung auf den Signalweg, z.B. über Bindung an Zelloberflächenrezeptoren, stattfindet. Interessanterweise scheint jedoch eine Expression von CLU₃₄₋₄₄₉ eine signifikante Erniedrigung der NF- κ B-Aktivität herbeizuführen, jedoch nur, wenn sehr große Mengen dieses Proteins im Cytosol vorhanden sind, wie es durch Überexpression von Variante 1 [Δ ex2] erreicht wurde. Dies spricht allerdings für einen Effekt, der allein aufgrund der massiven Überexpression von CLU₃₄₋₄₄₉ zustande kommt und auf unspezifische Interaktionen mit anderen

cytosolischen Proteinen hindeutet, was wiederum die Signaltransduktions-Maschinerie der Zelle negativ beeinflussen kann. Diese sogenannten *off-target* Effekte können häufig bei transienten Überexpression von Proteinen auftreten (Gibson *et al.*, 2013). Da solch hohe Expressionsraten von CLU₃₄₋₄₄₉ nicht die physiologische Situation widerspiegeln - in diesem Fall sind nur geringe Mengen an nicht-sezernierten CLU-Formen vorhanden (vgl. 5.1.2) – ist davon auszugehen, dass ein spezifischer Einfluss auf den NF-κB-Signalweg höchst unwahrscheinlich ist. Entsprechend wurde bei den hier durchgeführten Experimenten in Zellen mit nur geringer Überexpression von CLU₃₄₋₄₄₉ keine veränderte Aktivität des Transkriptionsfaktors beobachtet.

Die hier gemachten Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den derzeit in der Literatur diskutierten Hypothesen, die entweder von einer fördernden oder inhibierenden Wirkung von CLU auf den NF-κB-Signalweg ausgehen (vgl. 1.8.2). Diese Diskrepanz lässt sich nur sehr schwer erklären. Zelltypspezifische Effekte sind vorstellbar, aber eher unwahrscheinlich, da für manche Arbeiten gleiche Zelltypen, i.e. immortalisierte Prostatakrebszellen, eingesetzt und dennoch widersprüchlichen Beobachtungen gemacht wurden (Bettuzzi *et al.*, 2009; Zoubeidi *et al.*, 2010a). Für manche Experimente wurden CLU-überexprimierenden Einzelzellklone herangezogen (Chayka *et al.*, 2009). Von solchen Ansätzen sollte Abstand genommen werden, da bereits bei Experimenten in der Arbeitsgruppe von Prof. Koch-Brandt falsch positive Ergebnisse angesichts klonaler Effekte zwischen den Einzelzellklonen festgestellt wurden (Daten nicht gezeigt). Schließlich ist vor allem die Sensitivität der durchgeführten NF-κB-Reporterassays zu beachten. Das Nachweissystem ist sehr anfällig gegenüber äußeren Einflüssen, sodass unter Umständen eine Fülle an unabhängigen Experimenten nötig ist, um signifikante Aussagen zuzulassen. Aus diesem Grund wurde bei der hier durchgeführte Auswertung ein Datensatz von vier unabhängigen Experimenten einbezogen. So konnte, wie bereits erwähnt, für keine der einzelnen CLU-Isoformen ein signifikanter Einfluss auf den NF-κB-Signalweg festgestellt werden, obgleich dieser bei Berücksichtigung von nur einzelnen Datensätzen noch vorhanden gewesen wäre.

5.5 Physiologische Rolle einzelner Clusterin-Isoformen

Die Rolle von CLU bei (patho-)physiologischen Prozessen wird zurzeit intensiv erforscht, jedoch besteht kein Konsens über dessen distinkte Funktion. Insbesondere durch die Komplexität der CLU-Biogenese mit den verschiedenen CLU-mRNA-Varianten, den einzelnen CLU-Isoformen sowie deren verschiedenen postulierten Eigenschaften lassen sich viele Vorgänge nur schwer erforschen, was bereits in den einleitenden Abschnitten ausführlich dargelegt wurde. Daher soll hier abschließend nur auf die am häufigsten diskutierten Aspekte eingegangen und diese vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse analysiert werden.

Eine Krankheit, bei der CLU eine Funktion zuzukommen scheint, sind die malignen Neoplasien (Krebs). Eine Strategie zur Therapie von Prostatakrebs, welche auch für Brust- und Lungenkrebs getestet wird, bedient sich dem CLU-*antisense* DNA-Oligonukleotid OGX-011 (vgl. 1.5.4). Es bindet die CLU-mRNA und führt zu einer Verminderung der Translation. Da jedoch die Zielsequenz von OGX-011 auf Exon-2 liegt, würde die mRNA Variante 1 [Δ ex2] nicht von diesem Oligonukleotid erfasst werden, was wiederum zur

Folge hätte, dass insbesondere die CLU-Isoform CLU₃₄₋₄₄₉ weiter ausgehend von Variante 1 [Δ ex2] gebildet wird. Da diese jedoch als pro-apoptotisch eingestuft wird (vgl. 1.4.2), käme dies der Chemotherapie entgegen. Dieser Sachverhalt wurde ebenfalls von einer anderen Arbeitsgruppe aufgegriffen, die über einen Ansatz mit einem lentiviralen Konstrukt die Blockierung eines *exon-splice-enhancers* auf der CLU-prä-mRNA forcierte, sodass das Splicing von Exon 1 auf Exon 3 gefördert wird und vermehrt Variante 1 [Δ ex2] entsteht. Somit könne mehr von der potentiell pro-apoptotischen Isoform CLU₃₄₋₄₄₉ entstehen (Essabbani *et al.*, 2013). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse zeigen jedoch, dass dieser CLU-Isoform, genau wie allen anderen cytosolischen Isoformen, keine pro-apoptotischen Charakteristiken zuzuschreiben sind. Demzufolge lassen sich auch die oft postulierten Tumorsuppressor-Eigenschaften dieser Isoformen nicht bestätigen. Wahrscheinlicher ist in diesem Zusammenhang eine Rolle von sCLU, welches die dominante CLU-Isoform darstellt. Zwar wurden in dieser Arbeit auch keine unmittelbaren Effekte von sCLU auf die Vitalität verschiedener Zelllinien bzw. auf die NF- κ B-vermittelte Signaltransduktion festgestellt, angesichts seiner Chaperonfunktion (vgl. 5.4.1) und seiner Fähigkeit, eine Reihe von unterschiedlichen Liganden (vgl. 1.5.2) zu binden, ist eine komplexere Rolle innerhalb des zellulären Netzwerks, gerade in Bezug auf pathophysiologische Prozesse, durchaus wahrscheinlich. Dies gilt entsprechend für andere Chaperone, z.B. Hsp40, Hsp70, Hsp90 oder Hsp27, die wegen ihrer Vielzahl an Bindungspartnern eine anti-apoptotischen Funktion einnehmen. So ist z.B. bekannt, dass Hsp27 durch Stabilisierung die Aktivität des Androgenrezeptors fördert oder Hsp70 die Bax-abhängige Apoptose durch Bindung des Apaf-1 Komplexes verhindern kann. Darüber hinaus sind noch eine Vielzahl weiterer Prozesse, bei denen die Hsps eine Rolle spielen, bekannt (Ischia *et al.*, 2013). Somit könnte eine Dysregulation der Hsps die Proteinhomöostase empfindlich stören und zu einer malignen Transformation führen (Vabulas *et al.*, 2010). Entsprechend konnten bereits Chemotherapien mit sogenannten Hsp-Inhibitoren erfolgreich im Maus-Modell sowie in klinischen Studien getestet werden. Interessanterweise ist derzeit auch eine analoge Therapie zur Behandlung von Amyloidosen im Gespräch, deren Pathologie u.a. auf eine Dysregulation von Hsps zurückgeführt wird (McConnell und McAlpine, 2013). Da sCLU ein extrazelluläres Chaperon ist, könnte eine Chemotherapie mit OGX-011 ebenfalls erfolgsversprechend sein. In der Tat konnten in klinischen Studien bereits erste Erfolge verzeichnet werden (Chi *et al.*, 2005; Chi *et al.*, 2010; Saad *et al.*, 2011). Mit OGX-011 behandelte PC-3-Zellen zeigten eine gesteigerte Sensitivität gegenüber dem Cytostatikum Docetaxel. Weiterhin wurde in klinischen Studien festgestellt, dass mit OGX-011-behandelte Prostatakrebs-Patienten einen bis zu 25% geringeren CLU-Serumlevel sowie einen damit einhergehenden 50% Rückgang an *prostate specific antigen* aufweisen. Dabei zeigten Patienten mit einem niedrigen CLU-Level gegenüber Patienten mit hohem CLU-Level eine verbesserte Überlebensrate von mehreren Monaten (zusammengefasst in Higano, 2013). Dennoch bleibt offen, wie schwerwiegend die Dysregulation von sCLU bei diesem Krankheitsbild ist und in wie weit es bei der malignen Transformation in den Anfangsstadien von Krebs eine Rolle spielt.

Analog zu den genannten Hsps könnte in dem weiten Spektrum der verschiedenen beschriebenen sCLU-Bindungspartner auch der Grund für die teilweise kontroversen Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen bei Ischämie (Han *et al.*, 2001; Wehrli *et al.*, 2001), Alzheimer Krankheit (DeMattos *et al.*, 2002; Bell *et al.*, 2007), Arteriosklerose (Schwarz *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Hamada *et al.*, 2011)

oder eben bei Krebs (vgl. 1.5.4) zu finden sein. Nicht-sezernierte CLU-Isoformen scheinen im Kontext (patho-)physiologischer Prozesse eher irrelevant, da sie selbst unter massivem zellulären Stress nur in geringen Mengen von den Zellen exprimiert werden, keine Funktion im Rahmen der Apoptose aufweisen und, ausgehend von ihrer diffusen Verteilung innerhalb des Cytosols, vermutlich keine distinkten Bindungspartner haben. Somit steht die Vermutung im Raum, dass es sich bei den cytosolischen CLU-Isoformen um sogenannte „*junk proteins*“ handelt, welche aufgrund undefinierter Struktur keine Funktion innerhalb der Zelle wahrnehmen. Die Biologie solcher *junk proteins* ist kaum erforscht, jedoch wird ihr Auftreten zumeist mit der Expression von „*junk DNA*“ in Verbindung gebracht (Lovell, 2003). Dieser Rückschluss trifft allerdings auf die cytosolischen CLU-Isoformen nicht zu, da diese über post-transkriptionelle und post-translationale Mechanismen synthetisiert werden (vgl. 5.3.5).

5.6 Ausblick

Den nicht-sezernierten CLU-Isoformen konnte im Rahmen dieser Arbeit eine eindeutig cytosolische Lokalisation zugewiesen werden, welche auch nach Stress-Behandlung der HEK-293-Zellen bestehen bleibt. Dies könnte mittels der durchgeführten LSM auch entsprechend an anderen Zellen überprüft werden, wo noch eine kontroverse Datenlage besteht. Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Koch-Brandt zeigten jedoch bereits an PC-3-Zellen eine entsprechende, cytosolische Lokalisation nicht-sezernierter CLU-Isoformen (vgl. Diplomarbeit Matthias Hassemer). Diesen kann keine Aktivität bezüglich der Solubilisierung von fehlgefalteten Proteinen, der intrinsischen Apoptose oder des NF- κ B-Signalwegs zugeschrieben werden. Dies sollte durch Versuche an unterschiedlichen Zelllinien und durch alternative Ansätze weiter verifiziert werden. So sind zusätzliche Experimente notwendig, um eine abschließende Aussage bezüglich der Chaperonaktivität cytosolischer CLU-Isoformen machen zu können, da durch deren Aufreinigung, wie in dieser Arbeit durchgeführt, nicht die korrekte, native Faltung sichergestellt werden konnte. In diesem Zusammenhang lässt sich eine von Prof. Mark Wilson (*University of Wollongong*) aufgestellte Hypothese anbringen. Sie geht davon aus, dass die proteolytische Spaltung von psCLU in α - und β -Kette essentiell für die Chaperonfunktion des reifen sCLUs ist (Wilson, 2013, persönliche Kommunikation). Da diese Modifikation bei den nicht-sezernierten CLU-Formen nicht stattfindet, müsste davon ausgegangen werden, dass hier keine entsprechende Aktivität vorliegt. Diese Hypothese wird zurzeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Koch-Brandt eruiert. Dazu wird sCLU generiert, welches nicht mehr in α - und β -Kette gespalten werden kann. Dieses soll anschließend durch entsprechende Chaperonassays auf Aktivität hin überprüft werden. Sollte das so modifizierte sCLU keine Chaperonfunktion mehr zeigen, so ist diese höchstwahrscheinlich auch bei den cytosolischen CLU-Formen nicht vorhanden. Weiterführend wäre hier von Vorteil, die *in vitro* gewonnenen Daten auf ein zelluläres System zu übertragen um dort die Chaperonfunktion von sCLU *in vivo* nachvollziehen zu können. Ein Ansatz wäre, die Funktionalität verschiedener Peptidhormone, welche in Gegenwart von rekombinantem sCLU einer Hitzedenaturierung unterzogen wurden (vgl. 4.5.2), an Zelllinien zu überprüfen. Dies könnte u.a. durch Reporterassays analog zu den hier durchgeführten Aktivitätstest des Transkriptionsfaktors NF- κ B erreicht werden (vgl. 3.1.7)

Auch hier präsentierte Ergebnisse, die den Einfluss von CLU, insbesondere sCLU, auf intrazelluläre Prozesse wie z.B. Signaltransduktion oder Apoptose untersuchen, sollten ausgeweitet werden, um u.a. dessen distinkte Rolle bei (patho-)physiologischen Prozessen zu eruieren. Gegenwärtig wird in der Arbeitsgruppe von Prof. Koch-Brandt der Einfluss von exogen appliziertem sCLU-Protein auf die Proteinkinase Akt-vermittelte Signaltransduktion und die daran beteiligten Rezeptoren untersucht. In diesem Zusammenhang konnte ein durch sCLU ausgelöster, zellvitalitätsinhibierender Effekt auf Dottersack- und Fibroblastenzelllinien aus der Maus festgestellt werden (vgl. Diplomarbeit Philipp Rohne, Bachelorarbeit Markus Rövekamp). Weiterhin sind Experimente geplant, bei denen über quantitative Analysen der Gehalt an CLU-mRNA Varianten in verschiedensten primären Krebsgeweben ermittelt werden soll. Hierzu können die in dieser Arbeit verifizierten, mRNA-Variante-spezifischen Primer eingesetzt werden um qPCR-Screenings mit RNA aus den Biopsien durchführen zu können. So könnten Rückschlüsse auf die (Dys-)Regulation einzelner CLU-Isoformen in verschiedensten Krebsgeweben gezogen und die Rolle CLU bei dieser Art von Erkrankung eingehender erforscht werden (Priv.-Doz. Dr. Gerd Klock, TU Kaiserslautern, persönliche Kommunikation).

6 ZUSAMMENFASSUNG

Clusterin (CLU), auch bekannt unter dem Namen Apolipoprotein J (ApoJ), wird von Zellen als heterodimeres Glykoprotein exprimiert und in den extrazellulären Raum sezerniert. Es wird daher auch als sezerniertes CLU (sCLU) bezeichnet. Neben sCLU sind auch nicht-sezernierte Isoformen von CLU bekannt, die in der vorliegenden Arbeit erforscht wurden. Ziel dabei war es, die Expression, die Biogenese, sowie die Funktion dieser Proteine zu ergründen.

Nicht-sezernierte CLU-Formen werden ausschließlich von Zellen exprimiert, die zuvor einer Stresssituation ausgesetzt wurden. Dies konnte insbesondere durch Kultur verschiedener Zelllinien bei erhöhter Temperatur oder durch Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG-132 demonstriert werden, worauf neben sCLU auch 50kDa bzw. 45kDa große, nicht-sezernierte CLU-Proteine in geringen Mengen exprimiert wurden. Bezüglich der Biogenese dieser Proteine wurden mehrere Hypothesen bzw. Mechanismen diskutiert und in dieser Arbeit untersucht: alternative Translationsstartpunkte auf verschiedenen mRNAs, alternatives Splicing einzelner mRNAs sowie Retrotranslokation oder Mistranslokation von sCLU-Vorläuferproteinen. Um die Hypothesen eruiieren zu können, musste zuerst eine Expressionsanalyse der bekannten CLU-mRNAs durchgeführt werden. Über 5'-RACE, semi-quantitative und quantitative PCRs wurde die Expression von vier CLU-mRNAs sowie deren Induktion auf Zellstress hin festgestellt. Variante 1 (BP211675) ist die dominante CLU-mRNA und macht über 99,5% an CLU-mRNA in unbehandelten sowie in gestressten Zellen aus. Des Weiteren sind geringste Mengen der mRNA-Varianten 2 und 3 (NR_038335.1 und NR_045494.1) detektiert worden, deren Sequenzen sich lediglich in ihrem alternativen Exon 1 von Variante 1 unterscheiden. Schließlich konnte die Expression von Variante 1 [Δ ex2] festgestellt werden, welcher durch alternatives Splicing, i.e. *Exon-skipping*, das Exon 2 mit der ER-Signalsequenz-codierenden Region (SSCR) fehlt. HEK-293-Zellen, die transient mit je einer der rekombinanten CLU-mRNAs in Form rekombinanter cDNA transfiziert wurden, exprimierten neben großen Mengen sCLU auch geringe Mengen an den nicht-sezernierten CLU-Isoformen. Die anschließend durchgeführten *in vitro* Mutagenesen belegen, dass alle Isoformen ausgehend von distinkten Translationsstartpunkten aus synthetisiert werden. CLU₁₋₄₄₉ (50kDa) wird als prä-Proprotein von sCLU ausgehend von einem Startcodon auf Exon 2 unmittelbar vor der SSCR translatiert. Unter Zellstress-Bedingungen kann es zu einer Mistranslokation während der co-translationalen Translokation kommen, sodass Teile von CLU₁₋₄₄₉ im Cytosol akkumulieren. CLU₂₁₋₄₄₉ (50kDa) wird ausgehend von einem CUG-Startcodon *downstream* der SSCR über interne Translationsinitiation gebildet. Analoges gilt für CLU₃₄₋₄₄₉ (45kDa), welches von einem AUG-Startcodon auf Exon 3 translatiert wird. CLU₃₄₋₄₄₉ ist außerdem die einzige CLU-Form die von Variante 1 [Δ ex2] codiert wird. Somit konnten drei der in der Literatur postulierten Mechanismen zur Entstehung nicht-sezernierter CLU-Isoformen in gestressten Zellen verifiziert werden. Die Mistranslokation von sCLU-Vorläuferproteinen, welche entscheidend zum Auftreten der nicht-sezernierten CLU-Formen beiträgt, die Alternative Translationsinitiation an distinkten Startcodons sowie das alternative Splicing von CLU-mRNA-Variante 1. Weiterführende Experimente bestätigten, dass alle nicht-sezernierten CLU-Isoformen im Cytosol der Zellen lokalisiert sind und keine Glykosylierungen tragen. Somit konnte ein weiterer, in der Literatur kontrovers diskutierter Punkt bezüglich dieser Proteine geklärt werden.

Abschließend wurde die physiologische Funktion der einzelnen CLU-Isoformen analysiert. Dabei zeigte sich, dass ausschließlich sCLU eine Chaperonaktivität zukommt, die es ermöglicht, durch Hitze denaturierte Zielproteine in Lösung zu halten. Diese Funktion konnte nicht für die cytosolischen Isoformen bestätigt werden. Weiterhin konnte keine Auswirkung einzelner CLU-Formen auf die intrinsische Apoptose oder auf den NF- κ B-vermittelten Signaltransduktionsweg festgestellt werden, obgleich entsprechende Einflüsse von anderen Arbeitsgruppen postuliert wurden. Die hier gemachten Beobachtungen werfen daher die Frage auf, ob den nicht-sezernierten, cytosolischen CLU-Isoformen überhaupt eine physiologische Funktion zukommt und stellen aktuelle Hypothesen bezüglich der Rolle von CLU bei pathophysiologischen Prozessen infrage.

7 LITERATUR

- Afshar, N., Black, B. E. und Paschal, B. M. (2005). "Retrotranslocation of the chaperone calreticulin from the endoplasmic reticulum lumen to the cytosol." *Mol Cell Biol* **25**(20): 8844-53.
- Ahuja, H. S., Tenniswood, M., Lockshin, R. und Zakeri, Z. F. (1994). "Expression of clusterin in cell differentiation and cell death." *Biochem Cell Biol* **72**(11-12): 523-30.
- Akakura, K., Bruchoovsky, N., Rennie, P. S., Coldman, A. J., Goldenberg, S. L., Tenniswood, M. und Fox, K. (1996). "Effects of intermittent androgen suppression on the stem cell composition and the expression of the TRPM-2 (clusterin) gene in the Shionogi carcinoma." *J Steroid Biochem Mol Biol* **59**(5-6): 501-11.
- Andersen, C. L., Schepeler, T., Thorsen, K., Birkenkamp-Demtroder, K., Mansilla, F., Aaltonen, L. A., Laurberg, S. und Orntoft, T. F. (2007). "Clusterin expression in normal mucosa and colorectal cancer." *Mol Cell Proteomics* **6**(6): 1039-48.
- Andersen, O. M., Yeung, C. H., Vorum, H., Wellner, M., Andreassen, T. K., Erdmann, B., Mueller, E. C., Herz, J., Otto, A., Cooper, T. G. und Willnow, T. E. (2003). "Essential role of the apolipoprotein E receptor-2 in sperm development." *J Biol Chem* **278**(26): 23989-95.
- Araki, S., Israel, S., Leskov, K. S., Criswell, T. L., Beman, M., Klokov, D. Y., Sampath, L., Reinicke, K. E., Cataldo, E., Mayo, L. D. und Boothman, D. A. (2005). "Clusterin proteins: stress-inducible polypeptides with proposed functions in multiple organ dysfunction." *BJR Suppl* **27**: 106-13.
- Bach, U. C., Baiersdörfer, M., Klock, G., Cattaruzza, M., Post, A. und Koch-Brandt, C. (2001). "Apoptotic cell debris and phosphatidylserine-containing lipid vesicles induce apolipoprotein J (clusterin) gene expression in vital fibroblasts." *Exp Cell Res* **265**(1): 11-20.
- Baiersdörfer, M., Schwarz, M., Seehafer, K., Lehmann, C., Heit, A., Wagner, H., Kirschning, C. J. und Koch-Brandt, C. (2010). "Toll-like receptor 3 mediates expression of clusterin/apolipoprotein J in vascular smooth muscle cells stimulated with RNA released from necrotic cells." *Exp Cell Res* **316**(20): 3489-500.
- Bailey, R. W., Aronow, B., Harmony, J. A. und Griswold, M. D. (2002). "Heat shock-initiated apoptosis is accelerated and removal of damaged cells is delayed in the testis of clusterin/ApoJ knock-out mice." *Biol Reprod* **66**(4): 1042-53.
- Bailey, R. W., Dunker, A. K., Brown, C. J., Garner, E. C. und Griswold, M. D. (2001). "Clusterin, a binding protein with a molten globule-like region." *Biochemistry* **40**(39): 11828-40.
- Baird, S. D., Turcotte, M., Korneluk, R. G. und Holcik, M. (2006). "Searching for IRES." *RNA* **12**(10): 1755-85.
- Bajari, T. M., Strasser, V., Nimpf, J. und Schneider, W. J. (2003). "A model for modulation of leptin activity by association with clusterin." *FASEB J* **17**(11): 1505-7.
- Balantinou, E., Trougakos, I. P., Chondrogianni, N., Margaritis, L. H. und Gonos, E. S. (2009). "Transcriptional and posttranslational regulation of clusterin by the two main cellular proteolytic pathways." *Free Radic Biol Med* **46**(9): 1267-74.
- Bartl, M. M., Luckenbach, T., Bergner, O., Ullrich, O. und Koch-Brandt, C. (2001). "Multiple receptors mediate apoJ-dependent clearance of cellular debris into nonprofessional phagocytes." *Exp Cell Res* **271**(1): 130-41.
- Bartuzi, P., Hofker, M. H. und van de Sluis, B. (2013). "Tuning NF-kappaB activity: A touch of COMMD proteins." *Biochim Biophys Acta* **1832**(12): 2315-2321.
- Bell, R. D., Sagare, A. P., Friedman, A. E., Bedi, G. S., Holtzman, D. M., Deane, R. und Zlokovic, B. V. (2007). "Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system." *J Cereb Blood Flow Metab* **27**(5): 909-18.
- Bettuzzi, S., Astancolle, S., Guidetti, G., Moretti, M., Tiozzo, R. und Corti, A. (1999). "Clusterin (SGP-2) gene expression is cell cycle dependent in normal human dermal fibroblasts." *FEBS Lett* **448**(2-3): 297-300.
- Bettuzzi, S., Davalli, P., Davoli, S., Chayka, O., Rizzi, F., Belloni, L., Pellacani, D., Fregni, G., Astancolle, S., Fassan, M., Corti, A., Baffa, R. und Sala, A. (2009). "Genetic inactivation of ApoJ/clusterin: effects on prostate tumorigenesis and metastatic spread." *Oncogene* **28**(49): 4344-52.
- Bettuzzi, S., Hiipakka, R. A., Gilna, P. und Liao, S. T. (1989). "Identification of an androgen-repressed mRNA in rat ventral prostate as coding for sulphated glycoprotein 2 by cDNA cloning and sequence analysis." *Biochem J* **257**(1): 293-6.
- Bettuzzi, S. und Rizzi, F. (2009). "Chapter 5: Nuclear CLU (nCLU) and the fate of the cell." *Adv Cancer Res* **104**: 59-88.
- Bettuzzi, S., Scorcioni, F., Astancolle, S., Davalli, P., Scaltriti, M. und Corti, A. (2002). "Clusterin (SGP-2) transient overexpression decreases proliferation rate of SV40-immortalized human prostate epithelial cells by slowing down cell cycle progression." *Oncogene* **21**(27): 4328-34.
- Bettuzzi, S., Troiano, L., Davalli, P., Tropea, F., Ingletti, M. C., Grassilli, E., Monti, D., Corti, A. und Franceschi, C. (1991). "In vivo accumulation of sulfated glycoprotein 2 mRNA in rat thymocytes upon dexamethasone-induced cell death." *Biochem Biophys Res Commun* **175**(3): 810-5.

- Bhutia, S. K., Das, S. K., Kegelman, T. P., Azab, B., Dash, R., Su, Z. Z., Wang, X. Y., Rizzi, F., Bettuzzi, S., Lee, S. G., Dent, P., Grant, S., Curiel, D. T., Sarkar, D. und Fisher, P. B. (2012). "mda-7/IL-24 differentially regulates soluble and nuclear clusterin in prostate cancer." *J Cell Physiol* **227**(5): 1805-13.
- Biamonti, G. und Caceres, J. F. (2009). "Cellular stress and RNA splicing." *Trends Biochem Sci* **34**(3): 146-53.
- Blaschuk, O., Burdzy, K. und Fritz, I. B. (1983). "Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid." *J Biol Chem* **258**(12): 7714-20.
- Boatright, K. M. und Salvesen, G. S. (2003). "Mechanisms of caspase activation." *Curr Opin Cell Biol* **15**(6): 725-31.
- Boggs, L. N., Fuson, K. S., Baez, M., Churgay, L., McClure, D., Becker, G. und May, P. C. (1996). "Clusterin (Apo J) protects against in vitro amyloid-beta (1-40) neurotoxicity." *J Neurochem* **67**(3): 1324-7.
- Burkey, B. F., Stuart, W. D. und Harmony, J. A. (1992). "Hepatic apolipoprotein J is secreted as a lipoprotein." *J Lipid Res* **33**(10): 1517-26.
- Bush, K. T., Goldberg, A. L. und Nigam, S. K. (1997). "Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance." *J Biol Chem* **272**(14): 9086-92.
- Buttyn, R., Olsson, C. A., Pintar, J., Chang, C., Bandyk, M., Ng, P. Y. und Sawczuk, I. S. (1989). "Induction of the TRPM-2 gene in cells undergoing programmed death." *Mol Cell Biol* **9**(8): 3473-81.
- Caccamo, A. E., Desenzani, S., Belloni, L., Borghetti, A. F. und Bettuzzi, S. (2006). "Nuclear clusterin accumulation during heat shock response: implications for cell survival and thermo-tolerance induction in immortalized and prostate cancer cells." *J Cell Physiol* **207**(1): 208-19.
- Caccamo, A. E., Scaltriti, M., Caporali, A., D'Arca, D., Corti, A., Corvetta, D., Sala, A. und Bettuzzi, S. (2005). "Ca²⁺ depletion induces nuclear clusterin, a novel effector of apoptosis in immortalized human prostate cells." *Cell Death Differ* **12**(1): 101-4.
- Caccamo, A. E., Scaltriti, M., Caporali, A., D'Arca, D., Scorcioni, F., Astancolle, S., Mangiola, M. und Bettuzzi, S. (2004). "Cell detachment and apoptosis induction of immortalized human prostate epithelial cells are associated with early accumulation of a 45 kDa nuclear isoform of clusterin." *Biochem J* **382**(Pt 1): 157-68.
- Caccamo, A. E., Scaltriti, M., Caporali, A., D'Arca, D., Scorcioni, F., Candiano, G., Mangiola, M. und Bettuzzi, S. (2003). "Nuclear translocation of a clusterin isoform is associated with induction of anoikis in SV40-immortalized human prostate epithelial cells." *Ann N Y Acad Sci* **1010**: 514-9.
- Calero, M., Tokuda, T., Rostagno, A., Kumar, A., Zlokovic, B., Frangione, B. und Ghiso, J. (1999). "Functional and structural properties of lipid-associated apolipoprotein J (clusterin)." *Biochem J* **344** Pt 2: 375-83.
- Calkhoven, C. F., Muller, C. und Leutz, A. (2000). "Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression." *Genes Dev* **14**(15): 1920-32.
- Caporali, A., Davalli, P., Astancolle, S., D'Arca, D., Brausi, M., Bettuzzi, S. und Corti, A. (2004). "The chemopreventive action of catechins in the TRAMP mouse model of prostate carcinogenesis is accompanied by clusterin over-expression." *Carcinogenesis* **25**(11): 2217-24.
- Carver, J. A., Rekas, A., Thorn, D. C. und Wilson, M. R. (2003). "Small heat-shock proteins and clusterin: intra- and extracellular molecular chaperones with a common mechanism of action and function?" *IUBMB Life* **55**(12): 661-8.
- Cervellera, M., Raschella, G., Santilli, G., Tanno, B., Ventura, A., Mancini, C., Sevignani, C., Calabretta, B. und Sala, A. (2000). "Direct transactivation of the anti-apoptotic gene apolipoprotein J (clusterin) by B-MYB." *J Biol Chem* **275**(28): 21055-60.
- Chayka, O., Corvetta, D., Dews, M., Caccamo, A. E., Piotrowska, I., Santilli, G., Gibson, S., Sebire, N. J., Himoudi, N., Hogarty, M. D., Anderson, J., Bettuzzi, S., Thomas-Tikhonenko, A. und Sala, A. (2009). "Clusterin, a haploinsufficient tumor suppressor gene in neuroblastomas." *J Natl Cancer Inst* **101**(9): 663-77.
- Chen, T., Turner, J., McCarthy, S., Scaltriti, M., Bettuzzi, S. und Yeatman, T. J. (2004). "Clusterin-mediated apoptosis is regulated by adenomatous polyposis coli and is p21 dependent but p53 independent." *Cancer Res* **64**(20): 7412-9.
- Chi, K. N., Eisenhauer, E., Fazli, L., Jones, E. C., Goldenberg, S. L., Powers, J., Tu, D. und Gleave, M. E. (2005). "A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of OGX-011, a 2'-methoxyethyl antisense oligonucleotide to clusterin, in patients with localized prostate cancer." *J Natl Cancer Inst* **97**(17): 1287-96.
- Chi, K. N., Hotte, S. J., Yu, E. Y., Tu, D., Eigel, B. J., Tannock, I., Saad, F., North, S., Powers, J., Gleave, M. E. und Eisenhauer, E. A. (2010). "Randomized phase II study of docetaxel and prednisone with or without OGX-011 in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer." *J Clin Oncol* **28**(27): 4247-54.
- Choi-Miura, N. H., Ihara, Y., Fukuchi, K., Takeda, M., Nakano, Y., Tobe, T. und Tomita, M. (1992a). "SP-40,40 is a constituent of Alzheimer's amyloid." *Acta Neuropathol* **83**(3): 260-4.
- Choi-Miura, N. H., Takahashi, Y., Nakano, Y., Tobe, T. und Tomita, M. (1992b). "Identification of the disulfide bonds in human plasma protein SP-40,40 (apolipoprotein-J)." *J Biochem* **112**(4): 557-61.
- Choi, I., Kim, J., Park, J. Y. und Kang, S. W. (2013). "Cotransin induces accumulation of a cytotoxic clusterin variant that cotranslationally rerouted to the cytosol." *Exp Cell Res*.

- Choi, N. H., Tobe, T., Hara, K., Yoshida, H. und Tomita, M. (1990). "Sandwich ELISA assay for quantitative measurement of SP-40,40 in seminal plasma and serum." *J Immunol Methods* **131**(2): 159-63.
- Cochrane, D. R., Wang, Z., Muramaki, M., Gleave, M. E. und Nelson, C. C. (2007). "Differential regulation of clusterin and its isoforms by androgens in prostate cells." *J Biol Chem* **282**(4): 2278-87.
- Coldwell, M. J., Sack, U., Cowan, J. L., Barrett, R. M., Vlasak, M., Sivakumaran, K. und Morley, S. J. (2012). "Multiple isoforms of the translation initiation factor eIF4GII are generated via use of alternative promoters, splice sites and a non-canonical initiation codon." *Biochem J* **448**(1): 1-11.
- Collard, M. W. und Griswold, M. D. (1987). "Biosynthesis and molecular cloning of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells." *Biochemistry* **26**(12): 3297-303.
- Criswell, T., Beman, M., Araki, S., Leskov, K., Cataldo, E., Mayo, L. D. und Boothman, D. A. (2005). "Delayed activation of insulin-like growth factor-1 receptor/Src/MAPK/Egr-1 signaling regulates clusterin expression, a pro-survival factor." *J Biol Chem* **280**(14): 14212-21.
- Danik, M., Chabot, J. G., Mercier, C., Benabid, A. L., Chauvin, C., Quirion, R. und Suh, M. (1991). "Human gliomas and epileptic foci express high levels of a mRNA related to rat testicular sulfated glycoprotein 2, a purported marker of cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(19): 8577-81.
- de Silva, H. V., Stuart, W. D., Park, Y. B., Mao, S. J., Gil, C. M., Wetterau, J. R., Busch, S. J. und Harmony, J. A. (1990). "Purification and characterization of apolipoprotein J." *J Biol Chem* **265**(24): 14292-7.
- Debure, L., Vayssiere, J. L., Rincheval, V., Loison, F., Le Drean, Y. und Michel, D. (2003). "Intracellular clusterin causes juxta-nuclear aggregate formation and mitochondrial alteration." *J Cell Sci* **116**(Pt 15): 3109-21.
- Dejean, L. M., Martinez-Caballero, S., Manon, S. und Kinnally, K. W. (2006). "Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins." *Biochim Biophys Acta* **1762**(2): 191-201.
- DeMattos, R. B., O'Dell M, A., Parsadanian, M., Taylor, J. W., Harmony, J. A., Bales, K. R., Paul, S. M., Aronow, B. J. und Holtzman, D. M. (2002). "Clusterin promotes amyloid plaque formation and is critical for neuritic toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(16): 10843-8.
- Devauchelle, V., Essabani, A., De Pinieux, G., Germain, S., Tourneur, L., Mistou, S., Margottin-Goguet, F., Anract, P., Migaud, H., Le Nen, D., Lequerre, T., Saraux, A., Dougados, M., Breban, M., Fournier, C. und Chiochia, G. (2006). "Characterization and functional consequences of underexpression of clusterin in rheumatoid arthritis." *J Immunol* **177**(9): 6471-9.
- Diemer, V., Hoyle, M., Baglioni, C. und Millis, A. J. (1992). "Expression of porcine complement cytotoxicity inhibitor mRNA in cultured aortic smooth muscle cells. Changes during differentiation in vitro." *J Biol Chem* **267**(8): 5257-64.
- Essabani, A., Garcia, L., Zonetti, M. J., Fisco, T., Pucci, S. und Chiochia, G. (2013). "Exon-Skipping Strategy by Ratio Modulation between Cytoprotective versus Pro-Apoptotic Clusterin Forms Increased Sensitivity of LNCaP to Cell Death." *PLoS One* **8**(2): e54920.
- Fink, T. M., Zimmer, M., Tschopp, J., Etienne, J., Jenne, D. E. und Lichter, P. (1993). "Human clusterin (CLI) maps to 8p21 in proximity to the lipoprotein lipase (LPL) gene." *Genomics* **16**(2): 526-8.
- Fischer-Colbrie, R., Zangerle, R., Frischenschlager, I., Weber, A. und Winkler, H. (1984). "Isolation and immunological characterization of a glycoprotein from adrenal chromaffin granules." *J Neurochem* **42**(4): 1008-16.
- Freixes, M., Puig, B., Rodriguez, A., Torrejon-Escribano, B., Blanco, R. und Ferrer, I. (2004). "Clusterin solubility and aggregation in Creutzfeldt-Jakob disease." *Acta Neuropathol* **108**(4): 295-301.
- French, K., Yerbury, J. J. und Wilson, M. R. (2008). "Protease activation of alpha2-macroglobulin modulates a chaperone-like action with broad specificity." *Biochemistry* **47**(4): 1176-85.
- French, L. E., Wohlwend, A., Sappino, A. P., Tschopp, J. und Schifferli, J. A. (1994). "Human clusterin gene expression is confined to surviving cells during in vitro programmed cell death." *J Clin Invest* **93**(2): 877-84.
- Fritz, I. B., Burdzy, K., Setchell, B. und Blaschuk, O. (1983). "Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro." *Biol Reprod* **28**(5): 1173-88.
- Fritz, I. B. und Murphy, B. (1993). "Clusterin Insights into a multifunctional protein." *Trends Endocrinol Metab* **4**(2): 41-5.
- Georgiou, C. D., Grintzalis, K., Zervoudakis, G. und Papapostolou, I. (2008). "Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins." *Anal Bioanal Chem* **391**(1): 391-403.
- Ghiso, J., Matsubara, E., Koudinov, A., Choi-Miura, N. H., Tomita, M., Wisniewski, T. und Frangione, B. (1993). "The cerebrospinal-fluid soluble form of Alzheimer's amyloid beta is complexed to SP-40,40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane-attack complex." *Biochem J* **293** (Pt 1): 27-30.
- Gibson, T. J., Seiler, M. und Veitia, R. A. (2013). "The transience of transient overexpression." *Nat Methods* **10**(8): 715-21.
- Gilmore, T. D. (2006). "Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives." *Oncogene* **25**(51): 6680-4.
- Gleave, M. und Miyake, H. (2005). "Use of antisense oligonucleotides targeting the cytoprotective gene, clusterin, to enhance androgen- and chemo-sensitivity in prostate cancer." *World J Urol* **23**(1): 38-46.

- Grimm, S. (2012). "The ER-mitochondria interface: the social network of cell death." *Biochim Biophys Acta* **1823**(2): 327-34.
- Gutacker, C., Klock, G., Diel, P. und Koch-Brandt, C. (1999). "Nerve growth factor and epidermal growth factor stimulate clusterin gene expression in PC12 cells." *Biochem J* **339** (Pt 3): 759-66.
- Hamada, N., Miyata, M., Eto, H., Ikeda, Y., Shirasawa, T., Akasaki, Y., Miyauchi, T., Furusho, Y., Nagaki, A., Aronow, B. J. und Tei, C. (2011). "Loss of clusterin limits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via reduced expression of Egr-1 and TNF-alpha." *J Atheroscler Thromb* **18**(3): 209-16.
- Han, B. H., DeMattos, R. B., Dugan, L. L., Kim-Han, J. S., Brendza, R. P., Fryer, J. D., Kierson, M., Cirrito, J., Quick, K., Harmony, J. A., Aronow, B. J. und Holtzman, D. M. (2001). "Clusterin contributes to caspase-3-independent brain injury following neonatal hypoxia-ischemia." *Nat Med* **7**(3): 338-43.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-74.
- Hardardottir, I., Kunitake, S. T., Moser, A. H., Doerrler, W. T., Rapp, J. H., Grunfeld, C. und Feingold, K. R. (1994). "Endotoxin and cytokines increase hepatic messenger RNA levels and serum concentrations of apolipoprotein J (clusterin) in Syrian hamsters." *J Clin Invest* **94**(3): 1304-9.
- Hartmann, K., Rauch, J., Urban, J., Parczyk, K., Diel, P., Pilarsky, C., Appel, D., Haase, W., Mann, K., Weller, A. und et al. (1991). "Molecular cloning of gp 80, a glycoprotein complex secreted by kidney cells in vitro and in vivo. A link to the reproductive system and to the complement cascade." *J Biol Chem* **266**(15): 9924-31.
- Hatters, D. M., Wilson, M. R., Easterbrook-Smith, S. B. und Howlett, G. J. (2002). "Suppression of apolipoprotein C-II amyloid formation by the extracellular chaperone, clusterin." *Eur J Biochem* **269**(11): 2789-94.
- He, Y., Armanious, M. K., Thomas, M. J. und Cress, W. D. (2000). "Identification of E2F-3B, an alternative form of E2F-3 lacking a conserved N-terminal region." *Oncogene* **19**(30): 3422-33.
- Higano, C. S. (2013). "Potential use of custirsen to treat prostate cancer." *Onco Targets Ther* **6**: 785-97.
- Hochgrebe, T., Pankhurst, G. J., Wilce, J. und Easterbrook-Smith, S. B. (2000). "pH-dependent changes in the in vitro ligand-binding properties and structure of human clusterin." *Biochemistry* **39**(6): 1411-9.
- Humphreys, D., Hochgrebe, T. T., Easterbrook-Smith, S. B., Tenniswood, M. P. und Wilson, M. R. (1997). "Effects of clusterin overexpression on TNFalpha- and TGFbeta-mediated death of L929 cells." *Biochemistry* **36**(49): 15233-43.
- Humphreys, D. T., Carver, J. A., Easterbrook-Smith, S. B. und Wilson, M. R. (1999). "Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins." *J Biol Chem* **274**(11): 6875-81.
- Ischia, J., Saad, F. und Gleave, M. (2013). "The promise of heat shock protein inhibitors in the treatment of castration resistant prostate cancer." *Curr Opin Urol* **23**(3): 194-200.
- James, R. W., Hochstrasser, A. C., Borghini, I., Martin, B., Pometta, D. und Hochstrasser, D. (1991). "Characterization of a human high density lipoprotein-associated protein, NA1/NA2. Identity with SP-40,40, an inhibitor of complement-mediated cytolysis." *Arterioscler Thromb* **11**(3): 645-52.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. und Forman, D. (2011). "Global cancer statistics." *CA Cancer J Clin* **61**(2): 69-90.
- Jenne, D. E., Lowin, B., Peitsch, M. C., Bottcher, A., Schmitz, G. und Tschopp, J. (1991). "Clusterin (complement lysis inhibitor) forms a high density lipoprotein complex with apolipoprotein A-I in human plasma." *J Biol Chem* **266**(17): 11030-6.
- Jenne, D. E. und Tschopp, J. (1989). "Molecular structure and functional characterization of a human complement cytolysis inhibitor found in blood and seminal plasma: identity to sulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(18): 7123-7.
- Jin, G. und Howe, P. H. (1999). "Transforming growth factor beta regulates clusterin gene expression via modulation of transcription factor c-Fos." *Eur J Biochem* **263**(2): 534-42.
- Jones, S. E., Meerabux, J. M., Yeats, D. A. und Neal, M. J. (1992). "Analysis of differentially expressed genes in retinitis pigmentosa retinas. Altered expression of clusterin mRNA." *FEBS Lett* **300**(3): 279-82.
- Jordan-Starck, T. C., Lund, S. D., Witte, D. P., Aronow, B. J., Ley, C. A., Stuart, W. D., Swertfeger, D. K., Clayton, L. R., Sells, S. F., Paigen, B. und et al. (1994). "Mouse apolipoprotein J: characterization of a gene implicated in atherosclerosis." *J Lipid Res* **35**(2): 194-210.
- Kalka, K., Ahmad, N., Criswell, T., Boothman, D. und Mukhtar, H. (2000). "Up-regulation of clusterin during phthalocyanine 4 photodynamic therapy-mediated apoptosis of tumor cells and ablation of mouse skin tumors." *Cancer Res* **60**(21): 5984-7.
- Kalmar, B. und Greensmith, L. (2009). "Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress." *Adv Drug Deliv Rev* **61**(4): 310-8.
- Kang, D., Gho, Y. S., Suh, M. und Kang, C. (2002). "Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis." *Bull. Korean Chem. Soc.* **23**(11): 1511-1512.
- Kang, S. W., Rane, N. S., Kim, S. J., Garrison, J. L., Taunton, J. und Hegde, R. S. (2006). "Substrate-specific translocational attenuation during ER stress defines a pre-emptive quality control pathway." *Cell* **127**(5): 999-1013.

- Kang, S. W., Shin, Y. J., Shim, Y. J., Jeong, S. Y., Park, I. S. und Min, B. H. (2005). "Clusterin interacts with SCLIP (SCG10-like protein) and promotes neurite outgrowth of PC12 cells." *Exp Cell Res* **309**(2): 305-15.
- Kapron, J. T., Hilliard, G. M., Lakins, J. N., Tenniswood, M. P., West, K. A., Carr, S. A. und Crabb, J. W. (1997). "Identification and characterization of glycosylation sites in human serum clusterin." *Protein Sci* **6**(10): 2120-33.
- Kempster, S., Collins, M. E., Aronow, B. J., Simmons, M., Green, R. B. und Edington, N. (2004). "Clusterin shortens the incubation and alters the histopathology of bovine spongiform encephalopathy in mice." *Neuroreport* **15**(11): 1735-8.
- Kim, H. J., Yoo, E. K., Kim, J. Y., Choi, Y. K., Lee, H. J., Kim, J. K., Jeoung, N. H., Lee, K. U., Park, I. S., Min, B. H., Park, K. G., Lee, C. H., Aronow, B. J., Sata, M. und Lee, I. K. (2009). "Protective role of clusterin/apolipoprotein J against neointimal hyperplasia via antiproliferative effect on vascular smooth muscle cells and cytoprotective effect on endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(10): 1558-64.
- Kim, N., Yoo, J. C., Han, J. Y., Hwang, E. M., Kim, Y. S., Jeong, E. Y., Sun, C. H., Yi, G. S., Roh, G. S., Kim, H. J., Kang, S. S., Cho, G. J., Park, J. Y. und Choi, W. S. (2011). "Human nuclear clusterin mediates apoptosis by interacting with Bcl-XL through C-terminal coiled coil domain." *J Cell Physiol* **227**(3): 1157-67.
- Kim, S. J., Mitra, D., Salerno, J. R. und Hegde, R. S. (2002). "Signal sequences control gating of the protein translocation channel in a substrate-specific manner." *Dev Cell* **2**(2): 207-17.
- Kirszbaum, L., Sharpe, J. A., Murphy, B., d'Apice, A. J., Classon, B., Hudson, P. und Walker, I. D. (1989). "Molecular cloning and characterization of the novel, human complement-associated protein, SP-40,40: a link between the complement and reproductive systems." *EMBO J* **8**(3): 711-8.
- Klock, G., Storch, S., Rickert, J., Gutacker, C. und Koch-Brandt, C. (1998). "Differential regulation of the clusterin gene by Ha-ras and c-myc oncogenes and during apoptosis." *J Cell Physiol* **177**(4): 593-605.
- Koch-Brandt, C. und Morgans, C. (1996). "Clusterin: a role in cell survival in the face of apoptosis?" *Prog Mol Subcell Biol* **16**: 130-49.
- Kounnas, M. Z., Loukinova, E. B., Stefansson, S., Harmony, J. A., Brewer, B. H., Strickland, D. K. und Argraves, W. S. (1995). "Identification of glycoprotein 330 as an endocytic receptor for apolipoprotein J/clusterin." *J Biol Chem* **270**(22): 13070-5.
- Kozak, M. (2002). "Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation." *Gene* **299**(1-2): 1-34.
- Kumita, J. R., Poon, S., Caddy, G. L., Hagan, C. L., Dumoulin, M., Yerbury, J. J., Stewart, E. M., Robinson, C. V., Wilson, M. R. und Dobson, C. M. (2007). "The extracellular chaperone clusterin potently inhibits human lysozyme amyloid formation by interacting with prefibrillar species." *J Mol Biol* **369**(1): 157-67.
- Kyprianou, N., English, H. F. und Isaacs, J. T. (1990). "Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following androgen ablation." *Cancer Res* **50**(12): 3748-53.
- Kyprianou, N. und Isaacs, J. T. (1989). "'Thymineless' death in androgen-independent prostatic cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* **165**(1): 73-81.
- Lakins, J., Bennett, S. A., Chen, J. H., Arnold, J. M., Morrissey, C., Wong, P., O'Sullivan, J. und Tenniswood, M. (1998). "Clusterin biogenesis is altered during apoptosis in the regressing rat ventral prostate." *J Biol Chem* **273**(43): 27887-95.
- Lakins, J. N., Poon, S., Easterbrook-Smith, S. B., Carver, J. A., Tenniswood, M. P. und Wilson, M. R. (2002). "Evidence that clusterin has discrete chaperone and ligand binding sites." *Biochemistry* **41**(1): 282-91.
- Laping, N. J., Morgan, T. E., Nichols, N. R., Rozovsky, I., Young-Chan, C. S., Zarow, C. und Finch, C. E. (1994). "Transforming growth factor-beta 1 induces neuronal and astrocyte genes: tubulin alpha 1, glial fibrillary acidic protein and clusterin." *Neuroscience* **58**(3): 563-72.
- Law, G. L. und Griswold, M. D. (1994). "Activity and form of sulfated glycoprotein 2 (clusterin) from cultured Sertoli cells, testis, and epididymis of the rat." *Biol Reprod* **50**(3): 669-79.
- Lee, D. H., Ha, J. H., Kim, Y., Bae, K. H., Park, J. Y., Choi, W. S., Yoon, H. S., Park, S. G., Park, B. C., Yi, G. S. und Chi, S. W. (2011). "Interaction of a putative BH3 domain of clusterin with anti-apoptotic Bcl-2 family proteins as revealed by NMR spectroscopy." *Biochem Biophys Res Commun* **408**(4): 541-7.
- Leger, J. G., Montpetit, M. L. und Tenniswood, M. P. (1987). "Characterization and cloning of androgen-repressed mRNAs from rat ventral prostate." *Biochem Biophys Res Commun* **147**(1): 196-203.
- Lemansky, P., Brix, K. und Herzog, V. (1999). "Subcellular distribution, secretion, and posttranslational modifications of clusterin in thyrocytes." *Exp Cell Res* **251**(1): 147-55.
- Leskov, K. S., Araki, S., Lavik, J. P., Gomez, J. A., Gama, V., Gonos, E. S., Trougakos, I. P., Matsuyama, S. und Boothman, D. A. (2011). "CRM1 protein-mediated regulation of nuclear clusterin (nCLU), an ionizing radiation-stimulated, Bax-dependent pro-death factor." *J Biol Chem* **286**(46): 40083-90.
- Leskov, K. S., Criswell, T., Antonio, S., Li, J., Yang, C. R., Kinsella, T. J. und Boothman, D. A. (2001). "When X-ray-inducible proteins meet DNA double strand break repair." *Semin Radiat Oncol* **11**(4): 352-72.
- Leskov, K. S., Klokov, D. Y., Li, J., Kinsella, T. J. und Boothman, D. A. (2003). "Synthesis and functional analysis of nuclear clusterin, a cell death protein." *J Biol Chem* **278**(13): 11590-600.

- Li, N., Zoubeidi, A., Beraldi, E. und Gleave, M. E. (2012). "GRP78 regulates clusterin stability, retrotranslocation and mitochondrial localization under ER stress in prostate cancer." *Oncogene*.
- Li, X., Massa, P. E., Hanidu, A., Peet, G. W., Aro, P., Savitt, A., Mische, S., Li, J. und Marcu, K. B. (2002). "IKKalpha, IKKbeta, and NEMO/IKKgamma are each required for the NF-kappa B-mediated inflammatory response program." *J Biol Chem* **277**(47): 45129-40.
- Liao, F. T., Lee, Y. J., Ko, J. L., Tsai, C. C., Tseng, C. J. und Sheu, G. T. (2009). "Hepatitis delta virus epigenetically enhances clusterin expression via histone acetylation in human hepatocellular carcinoma cells." *J Gen Virol* **90**(Pt 5): 1124-34.
- Ling, I. F., Bhongsatiern, J., Simpson, J. F., Fardo, D. W. und Estus, S. (2012). "Genetics of clusterin isoform expression and Alzheimer's disease risk." *PLoS One* **7**(4): e33923.
- Liu, J., Zhang, D., Mi, X., Xia, Q., Yu, Y., Zuo, Z., Guo, W., Zhao, X., Cao, J., Yang, Q., Zhu, A., Yang, W., Shi, X., Li, J. und Huang, C. (2010). "p27 suppresses arsenite-induced Hsp27/Hsp70 expression through inhibiting JNK2/c-Jun- and HSF-1-dependent pathways." *J Biol Chem* **285**(34): 26058-65.
- Liu, T., Liu, P. Y., Tee, A. E., Haber, M., Norris, M. D., Gleave, M. E. und Marshall, G. M. (2009). "Over-expression of clusterin is a resistance factor to the anti-cancer effect of histone deacetylase inhibitors." *Eur J Cancer* **45**(10): 1846-54.
- Loison, F., Debure, L., Nizard, P., le Goff, P., Michel, D. und le Drean, Y. (2006). "Up-regulation of the clusterin gene after proteotoxic stress: implication of HSF1-HSF2 heterocomplexes." *Biochem J* **395**(1): 223-31.
- Londou, A., Mikrou, A. und Zarkadis, I. K. (2008). "Cloning and characterization of two clusterin isoforms in rainbow trout." *Mol Immunol* **45**(2): 470-8.
- Lovell, S. C. (2003). "Are non-functional, unfolded proteins ('junk proteins') common in the genome?" *FEBS Lett* **554**(3): 237-9.
- Lund, P., Weisshaupt, K., Mikeska, T., Jammal, D., Chen, X., Kuban, R. J., Ungethüm, U., Krapfenbauer, U., Herzel, H. P., Schafer, R., Walter, J. und Sers, C. (2006). "Oncogenic HRAS suppresses clusterin expression through promoter hypermethylation." *Oncogene* **25**(35): 4890-903.
- Lymar, E. S., Clark, A. M., Reeves, R. und Griswold, M. D. (2000). "Clusterin gene in rat sertoli cells is regulated by a core-enhancer element." *Biol Reprod* **63**(5): 1341-51.
- Maquat, L. E. und Carmichael, G. G. (2001). "Quality control of mRNA function." *Cell* **104**(2): 173-6.
- Marinelli, M., Quaglino, D., Bettuzzi, S., Strocchi, P., Davalli, P. und Corti, A. (1994). "Increased levels of clusterin mRNA in the ventral prostate of the aging rat are associated to increases in cuboidal (atrophic) cell population and not to changes in apoptotic activity." *Biochem Cell Biol* **72**(11-12): 515-21.
- Markopoulou, S., Kontargiris, E., Batsi, C., Tzavaras, T., Trougakos, I., Boothman, D. A., Gonos, E. S. und Kolettas, E. (2009). "Vanadium-induced apoptosis of HaCaT cells is mediated by c-fos and involves nuclear accumulation of clusterin." *FEBS J*.
- Martindale, J. L. und Holbrook, N. J. (2002). "Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival." *J Cell Physiol* **192**(1): 1-15.
- Matsubara, E., Frangione, B. und Ghiso, J. (1995). "Characterization of apolipoprotein J-Alzheimer's A beta interaction." *J Biol Chem* **270**(13): 7563-7.
- May, P. C., Lampert-Etchells, M., Johnson, S. A., Poirier, J., Masters, J. N. und Finch, C. E. (1990). "Dynamics of gene expression for a hippocampal glycoprotein elevated in Alzheimer's disease and in response to experimental lesions in rat." *Neuron* **5**(6): 831-9.
- McConnell, J. R. und McAlpine, S. R. (2013). "Heat shock proteins 27, 40, and 70 as combinational and dual therapeutic cancer targets." *Bioorg Med Chem Lett* **23**(7): 1923-8.
- McHattie, S., Wells, G. A., Bee, J. und Edington, N. (1999). "Clusterin in bovine spongiform encephalopathy (BSE)." *J Comp Pathol* **121**(2): 159-71.
- McLaughlin, L., Zhu, G., Mistry, M., Ley-Ebert, C., Stuart, W. D., Florio, C. J., Groen, P. A., Witt, S. A., Kimball, T. R., Witte, D. P., Harmony, J. A. und Aronow, B. J. (2000). "Apolipoprotein J/clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis." *J Clin Invest* **106**(9): 1105-13.
- Meijer, H. A. und Thomas, A. A. (2002). "Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region of an mRNA." *Biochem J* **367**(Pt 1): 1-11.
- Michel, D., Chatelain, G., Hérault, Y. und Brun, G. (1995). "The expression of the avian clusterin gene can be driven by two alternative promoters with distinct regulatory elements." *Eur J Biochem* **229**(1): 215-23.
- Michel, D., Chatelain, G., North, S. und Brun, G. (1997). "Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene." *Biochem J* **328** (Pt 1): 45-50.
- Michel, D., Gillet, G., Volovitch, M., Pessac, B., Calothy, G. und Brun, G. (1989). "Expression of a novel gene encoding a 51.5 kD precursor protein is induced by different retroviral oncogenes in quail neuroretinal cells." *Oncogene Res* **4**(2): 127-36.

- Miller, P. F. und Hinnebusch, A. G. (1989). "Sequences that surround the stop codons of upstream open reading frames in GCN4 mRNA determine their distinct functions in translational control." *Genes Dev* **3**(8): 1217-25.
- Miyake, H., Chi, K. N. und Gleave, M. E. (2000). "Antisense TRPM-2 oligodeoxynucleotides chemosensitize human androgen-independent PC-3 prostate cancer cells both in vitro and in vivo." *Clin Cancer Res* **6**(5): 1655-63.
- Moretti, R. M., Mai, S., Montagnani Marelli, M., Rizzi, F., Bettuzzi, S. und Limonta, P. (2011). "Molecular mechanisms of the antimetastatic activity of nuclear clusterin in prostate cancer cells." *Int J Oncol* **39**(1): 225-34.
- Moretti, R. M., Marelli, M. M., Mai, S., Cariboni, A., Scaltriti, M., Bettuzzi, S. und Limonta, P. (2007). "Clusterin isoforms differentially affect growth and motility of prostate cells: possible implications in prostate tumorigenesis." *Cancer Res* **67**(21): 10325-33.
- Morgan, T. E., Laping, N. J., Rozovsky, I., Oda, T., Hogan, T. H., Finch, C. E. und Pasinetti, G. M. (1995). "Clusterin expression by astrocytes is influenced by transforming growth factor beta 1 and heterotypic cell interactions." *J Neuroimmunol* **58**(1): 101-10.
- Mukai, T., Arai, Y., Yatsuki, H., Joh, K. und Hori, K. (1991). "An additional promoter functions in the human aldolase A gene, but not in rat." *Eur J Biochem* **195**(3): 781-7.
- Murphy, B. F., Kirsbaum, L., Walker, I. D. und d'Apice, A. J. (1988). "SP-40,40, a newly identified normal human serum protein found in the SC5b-9 complex of complement and in the immune deposits in glomerulonephritis." *J Clin Invest* **81**(6): 1858-64.
- Nakatani, Y., Brenner, M. und Freese, E. (1990). "An RNA polymerase II promoter containing sequences upstream and downstream from the RNA startpoint that direct initiation of transcription from the same site." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(11): 4289-93.
- Narayan, P., Orte, A., Clarke, R. W., Bolognesi, B., Hook, S., Ganzinger, K. A., Meehan, S., Wilson, M. R., Dobson, C. M. und Klenerman, D. (2011). "The extracellular chaperone clusterin sequesters oligomeric forms of the amyloid-beta(1-40) peptide." *Nat Struct Mol Biol* **19**(1): 79-83.
- Nizard, P., Tetley, S., Le Drean, Y., Watrin, T., Le Goff, P., Wilson, M. R. und Michel, D. (2007). "Stress-induced retrotranslocation of clusterin/ApoJ into the cytosol." *Traffic* **8**(5): 554-65.
- Nuutinen, T., Suuronen, T., Kyrylenko, S., Huuskonen, J. und Salminen, A. (2005). "Induction of clusterin/apoJ expression by histone deacetylase inhibitors in neural cells." *Neurochem Int* **47**(8): 528-38.
- O'Sullivan, J., Whyte, L., Drake, J. und Tenniswood, M. (2003). "Alterations in the post-translational modification and intracellular trafficking of clusterin in MCF-7 cells during apoptosis." *Cell Death Differ* **10**(8): 914-27.
- Oda, T., Wals, P., Osterburg, H. H., Johnson, S. A., Pasinetti, G. M., Morgan, T. E., Stine, W. B., Snyder, S. W., Holzman, T. F. und et al. (1995). "Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress." *Exp Neurol* **136**(1): 22-31.
- Orsi, A., Fioriti, L., Chiesa, R. und Sitia, R. (2006). "Conditions of endoplasmic reticulum stress favor the accumulation of cytosolic prion protein." *J Biol Chem* **281**(41): 30431-8.
- Pajak, B. und Orzechowski, A. (2007). "Ethylendiaminetetraacetic acid affects subcellular expression of clusterin protein in human colon adenocarcinoma COLO 205 cell line." *Anticancer Drugs* **18**(1): 55-63.
- Pankhurst, G. J., Bennett, C. A. und Easterbrook-Smith, S. B. (1998). "Characterization of the heparin-binding properties of human clusterin." *Biochemistry* **37**(14): 4823-30.
- Parczyk, K., Pilarsky, C., Rachel, U. und Koch-Brandt, C. (1994). "Gp80 (clusterin; TRPM-2) mRNA level is enhanced in human renal clear cell carcinomas." *J Cancer Res Clin Oncol* **120**(3): 186-8.
- Park, D. C., Yeo, S. G., Wilson, M. R., Yerbury, J. J., Kwong, J., Welch, W. R., Choi, Y. K., Birrer, M. J., Mok, S. C. und Wong, K. K. (2008). "Clusterin interacts with Paclitaxel and confer Paclitaxel resistance in ovarian cancer." *Neoplasia* **10**(9): 964-72.
- Park, J. und Liu, A. Y. (2001). "JNK phosphorylates the HSF1 transcriptional activation domain: role of JNK in the regulation of the heat shock response." *J Cell Biochem* **82**(2): 326-38.
- Pilarsky, C., Haase, W. und Koch-Brandt, C. (1993). "Stable expression of gp80 (TRPM-2, clusterin), a secretory protein implicated in programmed cell death, in transfected BHK-21 cells." *Biochim Biophys Acta* **1179**(3): 306-10.
- Pirkkala, L., Alastalo, T. P., Zuo, X., Benjamin, I. J. und Sistonen, L. (2000). "Disruption of heat shock factor 1 reveals an essential role in the ubiquitin proteolytic pathway." *Mol Cell Biol* **20**(8): 2670-5.
- Poon, S., Easterbrook-Smith, S. B., Rybchyn, M. S., Carver, J. A. und Wilson, M. R. (2000). "Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state." *Biochemistry* **39**(51): 15953-60.
- Poon, S., Rybchyn, M. S., Easterbrook-Smith, S. B., Carver, J. A., Pankhurst, G. J. und Wilson, M. R. (2002a). "Mildly acidic pH activates the extracellular molecular chaperone clusterin." *J Biol Chem* **277**(42): 39532-40.

- Poon, S., Treweek, T. M., Wilson, M. R., Easterbrook-Smith, S. B. und Carver, J. A. (2002b). "Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway." *FEBS Lett* **513**(2-3): 259-66.
- Pop, C. und Salvesen, G. S. (2009). "Human caspases: activation, specificity, and regulation." *J Biol Chem* **284**(33): 21777-81.
- Prochnow, H., Gollan, R., Rohne, P., Hassemer, M., Koch-Brandt, C. und Baiersdörfer, M. (2013). "Non-secreted clusterin isoforms are translated in rare amounts from distinct human mRNA variants and do not affect Bax-mediated apoptosis or the NF-kappaB signaling pathway." *PLoS One* **8**(9): e75303.
- Pucci, S., Bonanno, E., Pichiorri, F., Angeloni, C. und Spagnoli, L. G. (2004). "Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis." *Oncogene* **23**(13): 2298-304.
- Pucci, S., Mazzarelli, P., Sesti, F., Boothman, D. A. und Spagnoli, L. G. (2009). "Interleukin-6 affects cell death escaping mechanisms acting on Bax-Ku70-Clusterin interactions in human colon cancer progression." *Cell Cycle* **8**(3): 473-81.
- Purrello, M., Bettuzzi, S., Di Pietro, C., Mirabile, E., Di Blasi, M., Rimini, R., Grzeschik, K. H., Ingletti, C., Corti, A. und Sichel, G. (1991). "The gene for SP-40,40, human homolog of rat sulfated glycoprotein 2, rat clusterin, and rat testosterone-repressed prostate message 2, maps to chromosome 8." *Genomics* **10**(1): 151-6.
- Reddy, K. B., Jin, G., Karode, M. C., Harmony, J. A. und Howe, P. H. (1996a). "Transforming growth factor beta (TGF beta)-induced nuclear localization of apolipoprotein J/clusterin in epithelial cells." *Biochemistry* **35**(19): 6157-63.
- Reddy, K. B., Karode, M. C., Harmony, A. K. und Howe, P. H. (1996b). "Interaction of transforming growth factor beta receptors with apolipoprotein J/clusterin." *Biochemistry* **35**(1): 309-14.
- Rennie, P. S., Bruchofsky, N., Akakura, K., Goldenberg, S. L., Otal, N., Akakura, S., Wong, P. und Tenniswood, M. (1994). "Effect of tumour progression on the androgenic regulation of the androgen receptor, TRPM-2 and YPT1 genes in the Shionogi carcinoma." *J Steroid Biochem Mol Biol* **50**(1-2): 31-40.
- Ricci, F., Pucci, S., Sesti, F., Missiroli, F., Cerulli, L. und Spagnoli, L. G. (2007). "Modulation of Ku70/80, clusterin/ApoJ isoforms and Bax expression in indocyanine-green-mediated photo-oxidative cell damage." *Ophthalmic Res* **39**(3): 164-73.
- Richter, K., Haslbeck, M. und Buchner, J. (2010). "The heat shock response: life on the verge of death." *Mol Cell* **40**(2): 253-66.
- Rizzi, F. und Bettuzzi, S. (2008). "Targeting Clusterin in prostate cancer." *J Physiol Pharmacol* **59 Suppl 9**: 265-74.
- Rizzi, F. und Bettuzzi, S. (2010). "The clusterin paradigm in prostate and breast carcinogenesis." *Endocr Relat Cancer* **17**(1): R1-17.
- Rizzi, F., Caccamo, A. E., Belloni, L. und Bettuzzi, S. (2009a). "Clusterin is a short half-life, poly-ubiquitinated protein, which controls the fate of prostate cancer cells." *J Cell Physiol* **219**(2): 314-23.
- Rizzi, F., Coletta, M. und Bettuzzi, S. (2009b). "Chapter 2: Clusterin (CLU): From one gene and two transcripts to many proteins." *Adv Cancer Res* **104**: 9-23.
- Rock, K. L. und Kono, H. (2008). "The inflammatory response to cell death." *Annu Rev Pathol* **3**: 99-126.
- Rosemblit, N. und Chen, C. L. (1994). "Regulators for the rat clusterin gene: DNA methylation and cis-acting regulatory elements." *J Mol Endocrinol* **13**(1): 69-76.
- Rosenberg, M. E., Girton, R., Finkel, D., Chmielewski, D., Barrie, A., 3rd, Witte, D. P., Zhu, G., Bissler, J. J., Harmony, J. A. und Aronow, B. J. (2002). "Apolipoprotein J/clusterin prevents a progressive glomerulopathy of aging." *Mol Cell Biol* **22**(6): 1893-902.
- Rosenberg, M. E. und Silkensen, J. (1995). "Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations." *Int J Biochem Cell Biol* **27**(7): 633-45.
- Roucou, X., Guo, Q., Zhang, Y., Goodyer, C. G. und LeBlanc, A. C. (2003). "Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons." *J Biol Chem* **278**(42): 40877-81.
- Ruiz-Echevarria, M. J. und Peltz, S. W. (2000). "The RNA binding protein Pub1 modulates the stability of transcripts containing upstream open reading frames." *Cell* **101**(7): 741-51.
- Saad, F., Hotte, S., North, S., Eigl, B., Chi, K., Czaykowski, P., Wood, L., Pollak, M., Berry, S., Lattouf, J. B., Mukherjee, S. D., Gleave, M. und Winkquist, E. (2011). "Randomized phase II trial of Custirsen (OGX-011) in combination with docetaxel or mitoxantrone as second-line therapy in patients with metastatic castrate-resistant prostate cancer progressing after first-line docetaxel: CUOG trial P-06c." *Clin Cancer Res* **17**(17): 5765-73.
- Sabatte, J., Faigle, W., Ceballos, A., Morelle, W., Rodriguez Rodrigues, C., Remes Lenicov, F., Thepaut, M., Fieschi, F., Malchiodi, E., Fernandez, M., Arenzana-Seisdedos, F., Lortat-Jacob, H., Michalski, J. C., Geffner, J. und Amigorena, S. (2012). "Semen clusterin is a novel DC-SIGN ligand." *J Immunol* **187**(10): 5299-309.
- Sala, A., Bettuzzi, S., Pucci, S., Chayka, O., Dews, M. und Thomas-Tikhonenko, A. (2009). "Regulation of CLU gene expression by oncogenes and epigenetic factors implications for tumorigenesis." *Adv Cancer Res* **105**: 115-32.
- Santilli, G., Aronow, B. J. und Sala, A. (2003). "Essential requirement of apolipoprotein J (clusterin) signaling for IkappaB expression and regulation of NF-kappaB activity." *J Biol Chem* **278**(40): 38214-9.

- Sarkar, F. H., Li, Y., Wang, Z. und Kong, D. (2008). "NF-kappaB signaling pathway and its therapeutic implications in human diseases." *Int Rev Immunol* **27**(5): 293-319.
- Saura, J., Petegnief, V., Wu, X., Liang, Y. und Paul, S. M. (2003). "Microglial apolipoprotein E and astroglial apolipoprotein J expression in vitro: opposite effects of lipopolysaccharide." *J Neurochem* **85**(6): 1455-67.
- Savkovic, V., Gantzer, H., Reiser, U., Selig, L., Gaiser, S., Sack, U., Kloppel, G., Mossner, J., Keim, V., Horn, F. und Bodeker, H. (2007). "Clusterin is protective in pancreatitis through anti-apoptotic and anti-inflammatory properties." *Biochem Biophys Res Commun* **356**(2): 431-7.
- Sawada, M., Sun, W., Hayes, P., Leskov, K., Boothman, D. A. und Matsuyama, S. (2003). "Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria." *Nat Cell Biol* **5**(4): 320-9.
- Scaltriti, M., Bettuzzi, S., Sharrard, R. M., Caporali, A., Caccamo, A. E. und Maitland, N. J. (2004a). "Clusterin overexpression in both malignant and nonmalignant prostate epithelial cells induces cell cycle arrest and apoptosis." *Br J Cancer* **91**(10): 1842-50.
- Scaltriti, M., Santamaria, A., Paciucci, R. und Bettuzzi, S. (2004b). "Intracellular clusterin induces G2-M phase arrest and cell death in PC-3 prostate cancer cells." *Cancer Res* **64**(17): 6174-82.
- Schepeler, T., Mansilla, F., Christensen, L. L., Orntoft, T. F. und Andersen, C. L. (2007). "Clusterin expression can be modulated by changes in TCF1-mediated Wnt signaling." *J Mol Signal* **2**: 6.
- Schwarz, M., Spath, L., Lux, C. A., Paprotka, K., Torzewski, M., Dersch, K., Koch-Brandt, C., Husmann, M. und Bhakdi, S. (2008). "Potential protective role of apoprotein J (clusterin) in atherogenesis: binding to enzymatically modified low-density lipoprotein reduces fatty acid-mediated cytotoxicity." *Thromb Haemost* **100**(1): 110-8.
- Shaffer, K. L., Sharma, A., Snapp, E. L. und Hegde, R. S. (2005). "Regulation of protein compartmentalization expands the diversity of protein function." *Dev Cell* **9**(4): 545-54.
- Sparbier, K., Wenzel, T. und Kostzrewa, M. (2006). "Exploring the binding profiles of ConA, boronic acid and WGA by MALDI-TOF/TOF MS and magnetic particles." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **840**(1): 29-36.
- Stewart, E. M., Aquilina, J. A., Easterbrook-Smith, S. B., Murphy-Durland, D., Jacobsen, C., Moestrup, S. und Wilson, M. R. (2007). "Effects of glycosylation on the structure and function of the extracellular chaperone clusterin." *Biochemistry* **46**(5): 1412-22.
- Stoneley, M., Paulin, F. E., Le Quesne, J. P., Chappell, S. A. und Willis, A. E. (1998). "C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment." *Oncogene* **16**(3): 423-8.
- Suk, K. (2012). "Delivering alcohol neurotoxicity into nucleus, when clusterin meets BclXL: a commentary." *Alcohol Clin Exp Res* **36**(5): 745-7.
- Suuronen, T., Nuutinen, T., Ryhanen, T., Kaarniranta, K. und Salminen, A. (2007). "Epigenetic regulation of clusterin/apolipoprotein J expression in retinal pigment epithelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **357**(2): 397-401.
- Takase, O., Minto, A. W., Puri, T. S., Cunningham, P. N., Jacob, A., Hayashi, M. und Quigg, R. J. (2008). "Inhibition of NF-kappaB-dependent Bcl-xL expression by clusterin promotes albumin-induced tubular cell apoptosis." *Kidney Int* **73**(5): 567-77.
- Tando, Y., Algul, H., Wagner, M., Weidenbach, H., Adler, G. und Schmid, R. M. (1999). "Caerulein-induced NF-kappaB/Rel activation requires both Ca²⁺ and protein kinase C as messengers." *Am J Physiol* **277**(3 Pt 1): G678-86.
- Tanious, F. A., Veal, J. M., Buczak, H., Ratmeyer, L. S. und Wilson, W. D. (1992). "DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites." *Biochemistry* **31**(12): 3103-12.
- Thomas-Tikhonenko, A., Viard-Leveugle, I., Dews, M., Wehrli, P., Seignani, C., Yu, D., Ricci, S., el-Deiry, W., Aronow, B., Kaya, G., Saurat, J. H. und French, L. E. (2004). "Myc-transformed epithelial cells down-regulate clusterin, which inhibits their growth in vitro and carcinogenesis in vivo." *Cancer Res* **64**(9): 3126-36.
- Tobe, T., Minoshima, S., Yamase, S., Choi, N. H., Tomita, M. und Shimizu, N. (1991). "Assignment of a human serum glycoprotein SP-40,40 gene (CLI) to chromosome 8." *Cytogenet Cell Genet* **57**(4): 193-5.
- Trougakos, I. P. (2013). "The Molecular Chaperone Apolipoprotein J/Clusterin as a Sensor of Oxidative Stress: Implications in Therapeutic Approaches - A Mini-Review." *Gerontology*.
- Trougakos, I. P., Djeu, J. Y., Gonos, E. S. und Boothman, D. A. (2009a). "Advances and challenges in basic and translational research on clusterin." *Cancer Res* **69**(2): 403-6.
- Trougakos, I. P. und Gonos, E. S. (2006). "Regulation of clusterin/apolipoprotein J, a functional homologue to the small heat shock proteins, by oxidative stress in ageing and age-related diseases." *Free Radic Res* **40**(12): 1324-34.
- Trougakos, I. P. und Gonos, E. S. (2009). "Chapter 9: Oxidative stress in malignant progression: The role of Clusterin, a sensitive cellular biosensor of free radicals." *Adv Cancer Res* **104**: 171-210.
- Trougakos, I. P., Lourda, M., Agiostratidou, G., Kletsas, D. und Gonos, E. S. (2005). "Differential effects of clusterin/apolipoprotein J on cellular growth and survival." *Free Radic Biol Med* **38**(4): 436-49.

- Trougakos, I. P., Lourda, M., Antonelou, M. H., Kletsas, D., Gorgoulis, V. G., Papassideri, I. S., Zou, Y., Margaritis, L. H., Boothman, D. A. und Gonos, E. S. (2009b). "Intracellular clusterin inhibits mitochondrial apoptosis by suppressing p53-activating stress signals and stabilizing the cytosolic Ku70-Bax protein complex." *Clin Cancer Res* **15**(1): 48-59.
- Trougakos, I. P., So, A., Jansen, B., Gleave, M. E. und Gonos, E. S. (2004). "Silencing expression of the clusterin/apolipoprotein j gene in human cancer cells using small interfering RNA induces spontaneous apoptosis, reduced growth ability, and cell sensitization to genotoxic and oxidative stress." *Cancer Res* **64**(5): 1834-42.
- Tschopp, J., Chonn, A., Hertig, S. und French, L. E. (1993). "Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9." *J Immunol* **151**(4): 2159-65.
- Urban, J., Parczyk, K., Leutz, A., Kayne, M. und Kondor-Koch, C. (1987). "Constitutive apical secretion of an 80-kD sulfated glycoprotein complex in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cell line." *J Cell Biol* **105**(6 Pt 1): 2735-43.
- Vabulas, R. M., Raychaudhuri, S., Hayer-Hartl, M. und Hartl, F. U. (2010). "Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(12): a004390.
- Vagner, S., Gensac, M. C., Maret, A., Bayard, F., Amalric, F., Prats, H. und Prats, A. C. (1995). "Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes." *Mol Cell Biol* **15**(1): 35-44.
- Viard, I., Wehrli, P., Jornot, L., Bullani, R., Vechietti, J. L., Schifferli, J. A., Tschopp, J. und French, L. E. (1999). "Clusterin gene expression mediates resistance to apoptotic cell death induced by heat shock and oxidative stress." *J Invest Dermatol* **112**(3): 290-6.
- Wang, C., Jiang, K., Gao, D., Kang, X., Sun, C., Zhang, Q., Li, Y., Sun, L., Zhang, S., Guo, K. und Liu, Y. (2013). "Clusterin protects hepatocellular carcinoma cells from endoplasmic reticulum stress induced apoptosis through GRP78." *PLoS One* **8**(2): e55981.
- Wegrowski, Y., Perreau, C., Martiny, L., Haye, B., Maquart, F. X. und Bellon, G. (1999). "Transforming growth factor beta-1 up-regulates clusterin synthesis in thyroid epithelial cells." *Exp Cell Res* **247**(2): 475-83.
- Wehrli, P., Charnay, Y., Vallet, P., Zhu, G., Harmony, J., Aronow, B., Tschopp, J., Bouras, C., Viard-Leveugle, I., French, L. E. und Giannakopoulos, P. (2001). "Inhibition of post-ischemic brain injury by clusterin overexpression." *Nat Med* **7**(9): 977-9.
- Wei, L., Xue, T., Wang, J., Chen, B., Lei, Y., Huang, Y., Wang, H. und Xin, X. (2009). "Roles of clusterin in progression, chemoresistance and metastasis of human ovarian cancer." *Int J Cancer* **125**(4): 791-806.
- Whitmore, L. und Wallace, B. A. (2008). "Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases." *Biopolymers* **89**(5): 392-400.
- Wilson, M., Easterbrook-Smith, S., Lakins, J. und Tenniswood, M. (1995). "Mechanisms of induction and function of clusterin at sites of cell death." *Clusterin: Role in vertebrate development, function and adaptation*. Harmony, J., Springer-Verlag: 75-99.
- Wilson, M. R., Roeth, P. J. und Easterbrook-Smith, S. B. (1991). "Clusterin enhances the formation of insoluble immune complexes." *Biochem Biophys Res Commun* **177**(3): 985-90.
- Wilson, M. R., Yerbury, J. J. und Poon, S. (2008). "Potential roles of abundant extracellular chaperones in the control of amyloid formation and toxicity." *Mol Biosyst* **4**(1): 42-52.
- Wong, P., Pineault, J., Lakins, J., Taillefer, D., Leger, J., Wang, C. und Tenniswood, M. (1993). "Genomic organization and expression of the rat TRPM-2 (clusterin) gene, a gene implicated in apoptosis." *J Biol Chem* **268**(7): 5021-31.
- Wong, P., Taillefer, D., Lakins, J., Pineault, J., Chader, G. und Tenniswood, M. (1994). "Molecular characterization of human TRPM-2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration." *Eur J Biochem* **221**(3): 917-25.
- Wyatt, A. R., Yerbury, J., Poon, S., Dabbs, R. und Wilson, M. (2009a). "Chapter 6: The chaperone action of Clusterin and its putative role in quality control of extracellular protein folding." *Adv Cancer Res* **104**: 89-114.
- Wyatt, A. R., Yerbury, J. J., Berghofer, P., Greguric, I., Katsifis, A., Dobson, C. M. und Wilson, M. R. (2011). "Clusterin facilitates in vivo clearance of extracellular misfolded proteins." *Cell Mol Life Sci* **68**(23): 3919-31.
- Wyatt, A. R., Yerbury, J. J. und Wilson, M. R. (2009b). "Structural characterization of clusterin-chaperone client protein complexes." *J Biol Chem* **284**(33): 21920-7.
- Xue, J., Lv, D. D., Jiao, S., Zhao, W., Li, X., Sun, H., Yan, B., Fan, L., Hu, R. G. und Fang, J. (2012). "pVHL mediates K63-linked ubiquitination of nCLU." *PLoS One* **7**(4): e35848.
- Yang, C. R., Leskov, K., Hosley-Eberlein, K., Criswell, T., Pink, J. J., Kinsella, T. J. und Boothman, D. A. (2000). "Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11): 5907-12.
- Yang, C. R., Yeh, S., Leskov, K., Odegaard, E., Hsu, H. L., Chang, C., Kinsella, T. J., Chen, D. J. und Boothman, D. A. (1999). "Isolation of Ku70-binding proteins (KUBs)." *Nucleic Acids Res* **27**(10): 2165-74.

- Yerbury, J. J., Poon, S., Meehan, S., Thompson, B., Kumita, J. R., Dobson, C. M. und Wilson, M. R.** (2007). "The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures." FASEB J **21**(10): 2312-22.
- Yerbury, J. J., Rybchyn, M. S., Easterbrook-Smith, S. B., Henriques, C. und Wilson, M. R.** (2005a). "The acute phase protein haptoglobin is a mammalian extracellular chaperone with an action similar to clusterin." Biochemistry **44**(32): 10914-10925.
- Yerbury, J. J., Stewart, E. M., Wyatt, A. R. und Wilson, M. R.** (2005b). "Quality control of protein folding in extracellular space." EMBO Rep **6**(12): 1131-6.
- Yuan, B. Z., Chapman, J. A. und Reynolds, S. H.** (2008). "Proteasome Inhibitor MG132 Induces Apoptosis and Inhibits Invasion of Human Malignant Pleural Mesothelioma Cells." Transl Oncol **1**(3): 129-40.
- Zhang, H., Kim, J. K., Edwards, C. A., Xu, Z., Taichman, R. und Wang, C. Y.** (2005). "Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax." Nat Cell Biol **7**(9): 909-15.
- Zlokovic, B. V., Martel, C. L., Matsubara, E., McComb, J. G., Zheng, G., McCluskey, R. T., Frangione, B. und Ghiso, J.** (1996). "Glycoprotein 330/megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 4229-34.
- Zoubeidi, A., Chi, K. und Gleave, M.** (2010a). "Targeting the cytoprotective chaperone, clusterin, for treatment of advanced cancer." Clin Cancer Res **16**(4): 1088-93.
- Zoubeidi, A., Ettinger, S., Beraldi, E., Hadaschik, B., Zardan, A., Klomp, L. W., Nelson, C. C., Rennie, P. S. und Gleave, M. E.** (2010b). "Clusterin facilitates COMMD1 and I-kappaB degradation to enhance NF-kappaB activity in prostate cancer cells." Mol Cancer Res **8**(1): 119-30.
- Zwain, I. H., Grima, J. und Cheng, C. Y.** (1994). "Regulation of clusterin secretion and mRNA expression in astrocytes by cytokines." Mol Cell Neurosci **5**(3): 229-37.

8 ANHANG

8.1 Abkürzungsverzeichnis

In diesem Verzeichnis nicht aufgeführt sind:

- SI-Einheiten, davon abgeleitete und deren Präfixe
- aus dem Periodensystem der Elemente bekannte Kürzel chemischer Elemente
- im Duden zu findende, alltägliche Abkürzungen

×g	Vielfaches der Schwerebeschleunigung
5'-RACE	<i>5'-rapid amplification of cDNA ends</i>
AAP	<i>Abridged Anchor Primer</i>
AP-1/AP-2	<i>activator protein 1/activator protein 2</i>
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
ApoJ	Apolipoprotein J (Clusterin)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AUAP	<i>Abridged Universal Amplification Primer</i>
Aβ	<i>Beta-Amyloid</i>
Bax	<i>B-cell lymphoma 2-associated X protein</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma 2-like 1</i>
BH3	<i>B-cell lymphoma 2 homology domain 3</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BV	Bettvolumen
CBB	Coomassie-Brilliantblau
CD	Circulardichrosimus
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CLE	<i>Clusterin element</i>
CLU	Clusterin
CLU₁₋₄₄₉	Clusterin, Aminosäuren 1 bis 449 (sCLU prä-Protein)
CLU₂₁₋₄₄₉	Clusterin, Aminosäuren 21 bis 449
CLU₃₄₋₄₄₉	Clusterin, Aminosäuren 34 bis 449
CMV	Cytomegalievirus
c-myc	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
ConA	Concanavalin A
Cy3	Cyanin 3
CytC	Cytochrom C
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>2'-desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>2'-desoxyribonucleoside triphosphate</i>

DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
Eppi	Eppendorf-Reaktionsgefäß
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>endoplasmatic reticulum associated protein degradation</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
EtBr	Ethidiumbromid
FKS	fetales Kälberserum
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
gp80	80 kDa Glykoprotein
GRP78	<i>glucose-regulated protein, 78 kDa</i>
GSP	<i>gene specific primer</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
His-Tag	Hexahistidinrest
HSE	<i>heat shock element</i>
HSF	<i>heat shock factor</i>
Hsp	<i>heat shock protein</i>
IDA	<i>iminodiacetic acid</i>
IgG	Immunglobulin gamma
IKK	<i>inhibitor of kappa B-Kinase</i>
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Ku70/80	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LEW	Lysis/Equilibration/Wash
LRP	<i>low density lipoprotein Receptor-related Protein</i>
LSM	<i>laser scanning microscope</i>
M	Molarität
MG-132	N-(benzyloxycarbonyl)leucinylleucinylleucinal
mpH₂O	Reinstwasser („millipore“ Wasser)
MRE	<i>Mean Residue Ellipticity</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nCLU	nukleäres Clusterin
NF-κB	<i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NLS	<i>nuclear localazation sequence</i>
NMD	<i>nonsense mediated mRNA decay</i>
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
OGX-011	Custirsen (ein Clusterin-mRNA-antisense-Nukleotid)

oligo-dT	Thymin-Oligomer-Primer
p53	Tumorprotein 53
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS(T)	<i>phosphate buffered saline (+ Tween®)</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PNGase F	<i>Peptide-N-Glycosidase F</i>
PPP	PAGE Probenladepuffer
PrP	<i>major prion protein</i>
psCLU	<i>pre-secretory Clusterin</i>
qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion
RefSeq	<i>reference sequence</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	reverse Transkription
sCLU	<i>secretory Clusterin</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
SGP-2	<i>sulfated glycoprotein-2 (Clusterin)</i>
SP-40,40	<i>serum protein (40 kDa, 40 kDa) (Clusterin)</i>
sqPCR	semi-quantitative Polymerase Kettenreaktion
SRP	<i>signal recognition particle</i>
SSCR	<i>signal sequence coding region</i>
TdT	Terminale Desoxynukleotidyltransferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UCSC	<i>University of California, Santa Cruz</i>
uORF	<i>upstream open reading frame</i>
UV	ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i>
V5-Tag	13 Aminosäure langer Oligopeptid-Tag des Simian Virus 5
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
WGA	<i>wheat germ agglutinin</i>

8.2 Tabellen

Tab. 8.1: Übersicht über die am häufigsten zitierten Arbeiten zu nicht-sezernierten CLU-Isoformen. Die chronologisch aufgelisteten Publikationen befassen sich alle mit der Expression oder der Funktion nicht-sezernerter CLU-Isoformen. Ein Konsens diesbezüglich besteht nicht. Bezüglich der Biogenese nicht-sezernerter CLU-Formen sind mehrere Hypothesen in der Literatur genannt, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingängig analysiert wurden.

Referenz	Molekulargewicht	Zelltyp	Beobachtungen / Postulierte Biogenese	Postulierte Lokalisation	Postulierte Funktion
Wilson <i>et al.</i> , 1995	-	MCF-7	<ul style="list-style-type: none"> in frühen Stadien der Apoptose könnte CLU-mRNA von freien Ribosomen translatiert werden kryptische NLS auf Exon 3 wird aktiv (hypothetische Annahmen) 	(peri-)nukleär	unbekannt
Reddy <i>et al.</i> , 1996a	43 kDa	HepG2, CCL64	<ul style="list-style-type: none"> auf TGF-β-Stimulation hin wird nukleäre CLU Form gebildet vermutlich über Interne Translationsinitiation (AUG Exon 3) 	nukleär	unbekannt
Lakins <i>et al.</i> , 1998	42 kDa; 32 kDa	Prostata (<i>rattus</i>)	<ul style="list-style-type: none"> 42 kDa Form: potentieller Proteaseschnitt innerhalb der α-Kette des CLU prä-Proteins 32 kDa Form: Biogenese unbekannt 	unbekannt	Apoptose assoziiert
Yang <i>et al.</i> , 1999	60 kDa (psCLU);	MCF-7	<ul style="list-style-type: none"> psCLU bindet an nukleäres Ku70 unbekannt, wie es zur Assoziation von ER-ständigem mit nukleärem Protein kommt 	vermutlich nukleär	vermutlich Inhibition der DNA-Reparatur durch Ku70/80
Yang <i>et al.</i> , 2000	55 kDa	MCF-7	<ul style="list-style-type: none"> unbekannte Modifikation der Translation der CLU-mRNA nach Behandlung mit ionisierender Strahlung (IR) führt zur Translation von AUG Exon 3 Bindung von CLU an Ku70 	nukleär	inhibiert DNA-Reparatur durch Ku70/80
Leskov <i>et al.</i> , 2001	47 kDa (prä-nCLU); 55 kDa (nCLU)	MCF-7	<ul style="list-style-type: none"> prä-nukleäres CLU (nCLU) wird durch interne Translationsinitiation (AUG Exon 3) gebildet post-translationale Modifikation zu nCLU induziert durch IR 	nukleär	inhibiert DNA-Reparatur durch Ku70/80
O'Sullivan <i>et al.</i> , 2003	50-53 kDa	MCF-7	<ul style="list-style-type: none"> durch TNF-α Behandlung transloziert CLU in den Nucleus nukleäres CLU mit Disulfidbrücken, Lokalisation NLS unabhängig hypothetische Biogenese: <ol style="list-style-type: none"> retrograder Transport von psCLU aus ER heraus oder unvollständige, co-translationale Translokation von CLU prä-Protein 	nukleär	Apoptose assoziiert
Leskov <i>et al.</i> , 2003	47 kDa (prä-nCLU); 55 kDa (nCLU)	MCF-7	<ul style="list-style-type: none"> Exon 2-skipping des CLU Transkripts generiert mRNA mit Exon 3 AUG und NLS in vorderer Position; IR induziert post-translationale Modifikation sodass nCLU in den Nucleus translozieren kann 	ungestresst: cytosolisch (prä-nCLU); gestresst: nukleär (nCLU)	induziert Caspase 3 unabhängige Apoptose
Caccamo <i>et al.</i> , 2003	45 kDa	PNT1a	<ul style="list-style-type: none"> Zelluläres CLU transloziert nach Serum-Depletion in den Nucleus Biogenese unbekannt 	nukleär	Anoikis assoziiert
Debure <i>et al.</i> , 2003	-	COS-7, HeLa	<ul style="list-style-type: none"> potentielle Co-Lokalisation von sCLU-α-Kette und den Mitochondrien artifizuell, da α- und β-Kette separat exprimiert wurden 	mitochondrial	induziert Bax-abhängige Apoptose
Caccamo <i>et al.</i> , 2004	45 kDa	PNT1a	<ul style="list-style-type: none"> Zelluläres CLU transloziert nach Etoposid-Behandlung in den Nucleus Biogenese unbekannt 	nukleär	Anoikis assoziiert
Pucci <i>et al.</i> , 2004	~ 45 kDa	Caco-2	<ul style="list-style-type: none"> Nicht-sezernierte CLU-Form wird nach Somatostatin-Behandlung beobachtet Exon 2-skipping nach Leskov <i>et al.</i> 2003 wird als Ursache angegeben 	nukleär	Apoptose assoziiert
Chen <i>et al.</i> , 2004	-	Darmkrebszelllinien	<ul style="list-style-type: none"> Durch Behandlung der Zellen mit Fas-aktivierendem Antikörper und 5'-Fluorouracil kommt es zu massiver nukleärer Akkumulation von CLU Biogenese unbekannt 	nukleär	nukleäres CLU induziert Caspase-abhängige Apoptose
Scaltriti <i>et al.</i> , 2004a	-	PNT1a; PC-3	<ul style="list-style-type: none"> Überexpression von CLU-mRNA-Variante 1 generiert cytoplasmatische CLU-Isoform bei apoptotischen Zellen Translokation in den Nucleus 	cytoplasmatisch, nukleär	(s)CLU Überexpression induziert Apoptose durch nukleäre Translokation
Scaltriti <i>et al.</i> , 2004b	48 kDa	PC-3	<ul style="list-style-type: none"> Überexpression von CLU-Variante 1-cDNA ab Exon 3 resultiert in Apoptose CLU im Cytoplasma zu finden, bei apoptotischen Zellen im Nucleus 	vitale Zellen: cytoplasmatisch; apoptotische Zellen: nukleär	Apoptose durch Induktion von G2/M Zellzyklus Arrest
Trougakos <i>et al.</i> , 2004	49 kDa (prä-nCLU); 55 kDa (nCLU)	KH-OS U2-OS	<ul style="list-style-type: none"> nCLU und prä-nCLU Proteinformen lassen sich nicht über siRNA knock-down beeinflussen nCLU angeblich „zu stabil“ für effektiven knock-down 	-	-
Caccamo <i>et al.</i> , 2005	45 kDa	PNT1a	<ul style="list-style-type: none"> 65 kDa psCLU wird in 45 kDa CLU-Form konvertiert, welche durch Ca²⁺ Depletion in den Kern transloziert Mechanismus unbekannt 	nukleär	Anoikis assoziiert

Kang <i>et al.</i> , 2005	60kDa	PC-12	<ul style="list-style-type: none"> sCLU wird re-internalisiert und ist im Cytosol lokalisiert; Rezeptoren und genauer Mechanismus unbekannt 	cytosolisch	Bindung an SCLIP-Protein
Zhang <i>et al.</i> , 2005	60kDa	HEK-293T, H1080, PC-3M	<ul style="list-style-type: none"> psCLU bindet an Bax nicht geklärt, wie psCLU ins Cytosol bzw. zu den Mitochondrien gelangt 	mitochondrial	Inhibition der Apoptose
Caccamo <i>et al.</i> , 2006	45 kDa	PNT1a; PC-3	<ul style="list-style-type: none"> CLU transloziert durch sub-letalen Hitzeschock ins Cytoplasma, durch letalen Hitzeschock in den Nukleus auf welche Art und Weise dies passiert ist unbekannt 	cytoplasmatisch; nukleär	cytoplasmatisches CLU: Thermotoleranz; nukleäres CLU: Caspase 3-abhängige Apoptose
Moretti <i>et al.</i> , 2007	49kDa	PNT1a; PC-3, DU-145	<ul style="list-style-type: none"> Überexpression von CLU₃₄₋₄₄₉ führt zu nukleärer Akkumulation 	nukleär	Beschädigung des Cytoskeletts durch Bindung an α -Actinin
Nizard <i>et al.</i> , 2007	60 kDa (psCLU)	U-251	<ul style="list-style-type: none"> psCLU gelangt über den ERAD-Weg ins Cytosol kann dort unter Zellstress-Bedingungen akkumulieren 	cytosolisch	ER-Stress assoziiert
Pajak und Orzechowski, 2007	60kDa	COLO-205	<ul style="list-style-type: none"> eine CLU-Isoform akkumuliert in nukleärer Fraktion nach Etoposid- oder EDTA-Behandlung 	nukleär	Zelltod-assoziiert
Ricci <i>et al.</i> , 2007	50kDa	ARPE-19	<ul style="list-style-type: none"> CLU ist nach 24 h Behandlung mit Indocyaningrün im Nukleus zu finden, Vermutliche Bindung an Ku70 	nukleär	Apoptose assoziiert
Balantinou <i>et al.</i> , 2009	47kDa	U2-OS	<ul style="list-style-type: none"> Akkumulation einer 47 kDa großen, nicht-sezernierten CLU-Form nach MG-132 oder Epoxomicin-Behandlung 	nicht-sezerniert	-
Markopoulou <i>et al.</i> , 2009	47kDa	HaCaT, HepG2	<ul style="list-style-type: none"> Behandlung mit Vanadium fördert das Auftreten einer nicht-sezernierten CLU-Isoform potentiell über vermehrtes Exon 2-skipping von CLU-mRNA Variante 1 	cytosolisch/nukleär	fördert Apoptose
Pucci <i>et al.</i> , 2009	~ 50kDa	CaCo-2	<ul style="list-style-type: none"> Durch Behandlung mit IL-6 oder Somatostatin wird nicht-sezernierte CLU-Form beobachtet Vermutlich Bindung an Ku70 	vermutlich nukleär	fördert Bax-induzierte Apoptose
Rizzi <i>et al.</i> , 2009a	45 - 50kDa	PC-3	<ul style="list-style-type: none"> Behandlung von Zellen mit MG-132 führt zu massiver Akkumulation von CLU im Nukleus 	nukleär	Apoptose assoziiert
Trougakos <i>et al.</i> , 2009b	80 kDa (psCLU), 40 kDa (sCLU)	U2-OS	<ul style="list-style-type: none"> psCLU und sCLU sind nicht nur im ER/Golgi, sondern auch im nukleoplasmatischen Kontinuum und an Mitochondrien assoziiert; Nachweis durch Immunogold-Elektronenmikroskopie Stabilisierung des Ku70/Bax-Komplexes 	mitochondrial, nukleoplasmatisch	Mediator der Bax-abhängigen Apoptose
Wei <i>et al.</i> , 2009	50kDa	SKOV-3	<ul style="list-style-type: none"> Überexpression von CLU₃₄₋₄₄₉ führt zu cytosolischer Lokalisation durch artifizielles Einfügen einer NLS am N-Terminus wird eine nukleäre Lokalisation erreicht 	cytosolisch	Induktion von Apoptose sobald CLU im Nukleus vorhanden ist
Bhutia <i>et al.</i> , 2012	49kDa	DU-145	<ul style="list-style-type: none"> Überexpression von IL-24 fördert massive Akkumulation von CLU im Nukleus Anscheinend durch Erhöhung des Exon 2-skippings von CLU-mRNA-Variante 1 Artifizuell, da die Zellen bereits sCLU überexprimierten 	nukleär	Apoptose assoziiert
Leskov <i>et al.</i> , 2011	~ 55kDa	MCF-7	<ul style="list-style-type: none"> Spezifischer <i>knock-down</i> von nCLU durch siRNA sowie Verwendung eines potentiell nCLU-spezifischen Antikörpers Überexpression von CLU₃₄₋₄₄₉ führt zur nukleären Akkumulation nach IR 	ungestresst: cytosolisch IR: nukleär	C-terminalen 120 AS von CLU induzieren Apoptose
Moretti <i>et al.</i> , 2011	50kDa	PC-3	<ul style="list-style-type: none"> Überexpression von CLU₃₄₋₄₄₉ resultiert in spontaner nukleärer Akkumulation co-Lokalisation mit Vimentin 	cytosolisch, nukleär	nCLU-positive Zellen sterben ab
Li <i>et al.</i> , 2012	60 kDa (psCLU)	LNCaP	<ul style="list-style-type: none"> psCLU transloziert unter ER-Stressbedingungen vom ER ins Cytosol Vermittelt durch Bindung an GRP78 Bindung an Mitochondrien 	cytosolisch, mitochondrial	Inhibition der Bax-vermittelten Apoptose
Xue <i>et al.</i> , 2012	~ 55kDa	HEK-293T, HeLa	<ul style="list-style-type: none"> CLU₃₄₋₄₄₉ kann LyS₆₃-Polyubiquitiniert werden, wodurch es aus dem Cytosol in den Nukleus transloziert 	cytosolisch, nukleär	kein Einfluss auf die Zellvitalität
Choi <i>et al.</i> , 2013	~ 50 kDa	HeLa	<ul style="list-style-type: none"> Teile des CLU prä-Proteins werden aufgrund des „schwachen“ ER-Signalpeptids nicht co-translational ins ER transloziert, sondern ins Cytosol synthetisiert 	cytoplasmatisch	möglicherweise cytotoxisch durch Aggregation
Essabani <i>et al.</i> , 2013	-	LNCaP	<ul style="list-style-type: none"> durch Infektion eines lentiviralen Konstrukts wird das Exon 2-skipping gefördert, sodass mehr CLU₃₄₋₄₄₉ entstehen kann Inhibiert Bindung von Bax an Ku70 	-	Induktion der Bax-vermittelten Apoptose

Tab. 8.2: Übersicht der in dieser Arbeit klonierten cDNA-Konstrukte. Angegeben sind die einzelnen cDNA-Konstrukte, die die jeweiligen Matrizen für PCRs oder Ligationen sowie die verwendeten Klonierungsprimer und deren Sequenzen. Alle klonierten cDNA-Konstrukte wurden als Integrate in den Expressionsvektor pcDNA6/V5-His unter Verwendung der angegebenen Restriktionsendonukleasen kloniert. In den Primersequenzen sind die Schnittstellen für *Hind*III, *Bam*HI, *Pau*I, *Mfe*I, *Eco*R und *Xho*I sowie die durch *in vitro* Mutagenese ausgetauschten Nukleotide markiert.

Integrat	Modifikationen	DNA-Template	Eingesetzte Primer	Bemerkungen
Variante 1 [NM_001831.3]	wt	Humane genomische DNA; Variante 1 in pcDNA6, <i>Hind</i> III/ <i>Pau</i> I restr.	Clu34hum-E1-F: GTCTG AAGCT TCTTCCGGGGATTCTTTG Clu34hum-E1-R: CGGTACAGCGGCACCTGTGC	PCR-Fragment per <i>Pau</i> I-Restriktion an Exon 1 von Variante 1 ligiert, dann Klonierung über <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI in pcDNA6 (vgl. Diplomarbeit Hans Prochnow)
Variante 1 [NM_001831.3] mut 1	Exon 1 ATG → ATA	Variante 1 [NM_001831.3] in pcDNA6; Variante 1 in pcDNA6, <i>Hind</i> III/ <i>Pau</i> I restr.	pcDNA-seq-F: TAATACGACTCACTATAGGG CluRS-E1mut-R2: GGCTGCAAACTCTG T ATGAC CluRS-E1mut-F2: TTGGCGGTGAGTCAT T CAG ApoJ-hum-Lesk-R: GCTCCTTCAGCTTTGTCTCTG	<i>in vitro</i> Mutagenese, anschließend PCR-Fragment per <i>Pau</i> I-Restriktion an Exon 1 von Variante 1 ligiert, dann Klonierung über <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI in pcDNA6 (vgl. Diplomarbeit Hans Prochnow)
Variante 1 [NM_001831.3] mut 2	Exon 2 ATG → ATA	Variante 1 [NM_001831.3] in pcDNA6, Variante 1 mut 4 in pcDNA6, beide <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI restr.	-	entsprechende Fragmente per <i>Pau</i> I Restriktion/Ligation vereint und über <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI in pcDNA6 kloniert (vgl. F2-Praktikum Maria Knaup)
Variante 1 [NM_001831.3] mut 3	Exon 1 ATG → ATA Exon 2 ATG → ATA	Variante 1 mut 1 [NM_001831.3] in pcDNA6, Variante 1 mut 4 in pcDNA6, beide <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI restr.	-	entsprechende Fragmente per <i>Aas</i> I Restriktion/Ligation vereint und über <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI in pcDNA6 kloniert (vgl. F2-Praktikum Maria Knaup)
Variante 1	wt	oligo-dT Erststrang aus EA.hy926 Zellen	CGAAAG AAGCT TAGGAGGA GGCCG GGGCAC AG CGCTGT GGATCC CTCTCCCGGTGCTTTTGGG	cDNA-Klonierung über <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI in pcDNA6, vgl. Diplomarbeit Hans Prochnow
Variante 1 mut 1	Exon 3 ATG → TTG	Variante 1 in pcDNA6	pcDNA-seq-F: TAATACGACTCACTATAGGG CluE3mut-R2: CTTACTTCCCTGATTGGACA T TTC CluE3mut-F2: GACAAATGAGCTCCAGGA T TGTC pcDNA-seq-R: CTGGAACTAGAAGGCCACAG	<i>in vitro</i> Mutagenese, anschließende Klonierung über <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Matthias Hassemer)
Variante 1 mut 2	Exon 2 CTG → TTG	Variante 1 in pcDNA6	pcDNA-seq-F: TAATACGACTCACTATAGGG CLU-Ex2-CTG3-mut-R: CTGGTCCCCCA T GACCTGC CLU-Ex2-CTG3-mut-F: GGGCAGGT T TGGGGGAC pcDNA-seq-R: CTGGCAACTAGAAGGCCACAG	<i>in vitro</i> Mutagenese, anschließende Klonierung über <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Janine Schlöder)
Variante 1 mut 3	Exon 3 ATG → TTG Exon 2 CTG → TTG	Variante 1 mut 1 in pcDNA6, Variante 1 mut 2 in pcDNA6, beide <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI restr.	-	entsprechende Fragmente per <i>Aas</i> I Restriktion/Ligation vereint und über <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI in pcDNA6 kloniert (vgl. F2-Praktikum Maria Knaup)
Variante 1 mut 4	Exon 2 ATG → ATA	Variante 1 in pcDNA6	pcDNA-seq-F: TAATACGACTCACTATAGGG CluE2mut-R3: CAGCAGAGCTT T AT T ATGCC CluE2mut-F3: AGAATTGGAGGCAT T A T AAG pcDNA-seq-R: CTGGCAACTAGAAGGCCACAG	<i>in vitro</i> Mutagenese, anschließende Klonierung über <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI in pcDNA6

Integrat	Modifikationen	DNA-Template	Eingesetzte Primer	Bemerkungen
Variante 1 mut 5	Exon 2 ATG→ATA Exon 3 ATG→TTG	Variante 1 mut 1 in pcDNA6 Variante 1 mut 4 in pcDNA6, beide HindIII/BamHI restr.	-	entsprechende Fragmente per AclI Restriktion/Ligation vereint und über HindIII/BamHI in pcDNA6 kloniert (vgl. F2-Praktikum Maria Knaup)
Variante 1 mut 6	Exon 2 ATG→ATA Exon 2 CTG→TTG	Variante 1 mut 4 in pcDNA6	analog zu Variante 1 mut 2	<i>in vitro</i> Mutagenese, anschließende Klonierung über HindIII/BamHI in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Janine Schlöder)
Variante 1 mut 7	Exon 2 ATG→ATA Exon 2 CTG→TTG Exon 3 ATG→TTG	Variante 1 mut 1 in pcDNA6 Variante 1 mut 6 in pcDNA6, beide HindIII/BamHI restr.	-	entsprechende Fragmente per AclI Restriktion/Ligation vereint und über HindIII/BamHI in pcDNA6 kloniert (vgl. F2-Praktikum Maria Knaup)
Variante 1 mut 8	Exon 2 ATG→ATA Exon 2 CTG(stretch)→TTG	Variante 1 mut 4 in pcDNA6	pcDNA-seq-F: TAATACGACTCACTATAGGG CLU-Ex2-CTG1-mut-R2: CCCACAAACAACAAGTCTT CLU-Ex2-CTG2-mut-F: TTTGTGGGCTTGTTGACCTGGGAG pcDNA-seq-R: CTGGCAACTAGAAAGGCACAG	<i>in vitro</i> Mutagenese, anschließende Klonierung über HindIII/BamHI in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Philipp Heller)
Variante 1 mut 9	Exon 2 CTG→TTG Exon 2 CTG(stretch)→TTG	Variante 1 mut 2 in pcDNA6	analog zu Variante 1 mut 8	<i>in vitro</i> Mutagenese, anschließende Klonierung über HindIII/BamHI in pcDNA6
Variante 1 mut 10	Exon 2 ATG→ATA Exon 2 CTG(stretch)→TTG Exon 2 CTG→TTG	Variante 1 mut 8 in pcDNA6	analog zu Variante 1 mut 2	<i>in vitro</i> Mutagenese, anschließende Klonierung über HindIII/BamHI in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Janine Schlöder)
Variante 1 [ΔEx2]	ΔExon2	Variante 1 in pcDNA6	pcDNA-seq-F: TAATACGACTCACTATAGGG CLU34-Ex1-Ex3-Fus-R: CTGATTGGACATTCGGTCAGCGGCCCTCTGT CLU34-Ex1-Ex3-Fus-F: GGTGCCGCTGACCGAAATGTCCAATCAGGGAA pcDNA-seq-R: CTGGCAACTAGAAAGGCACAG	<i>in vitro</i> Mutagenese, anschließende Klonierung über HindIII/BamHI in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Julia Hartmann)
Variante 2	wt	oligo-dT Erststrang aus MG-132 (10 μM) behandelten HEK-293 Zellen	Clu35-Exon-1-F: AGAGAGAAGCTTGGCAGGAACAACCTGGCAGG ApoJ-hum-Lesk-R: GCTCCTTCAGCTTTGTCTCTG	PCR-Fragment per AclI-Restriktion mit Variante 1 ligiert, dann Klonierung über HindIII/BamHI in pcDNA6
Variante 2 mut 1	ΔuORF1	Variante 2 in pcDNA6	Clu35-ΔATG1.1-F: TTTTAAAGCTTGGCAGTGTGGAGGGCTGGC ApoJ-hum-Lesk-R: GCTCCTTCAGCTTTGTCTCTG	PCR-Fragment per AclI-Restriktion mit Variante 1 ligiert, dann Klonierung über HindIII/BamHI in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Thomas Nick)
Variante 2 mut 2	ΔuORF1	Variante 2 in pcDNA6	Clu35-ΔATG1.2-F: CCGAAAGCTTAGGAAATGTCTTCTTGCC ApoJ-hum-Lesk-R: GCTCCTTCAGCTTTGTCTCTG	PCR-Fragment per AclI-Restriktion mit Variante 1 ligiert, dann Klonierung über HindIII/BamHI in pcDNA6; kürzeres 5'-Ende als Variante 2 mut 2 (vgl. F2-Praktikum Thomas Nick)
Variante 2 mut 3	ΔuORF2+3	Variante 2 in pcDNA6	Clu35-ΔATG2-F: TTTTAAAGCTTCACAGGCGCCGCCCAAG ApoJ-hum-Lesk-R: GCTCCTTCAGCTTTGTCTCTG	PCR-Fragment per AclI-Restriktion mit Variante 1 ligiert, dann Klonierung über HindIII/BamHI in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Thomas Nick)
Variante 2 mut 4	ΔuORF4	Variante 2 in pcDNA6	Clu35-ΔATG3-F: CCCAAGCTTAGGGCTGGCTCTGTTGCC ApoJ-hum-Lesk-R: GCTCCTTCAGCTTTGTCTCTG	PCR-Fragment per AclI-Restriktion mit Variante 1 ligiert, dann Klonierung über HindIII/BamHI in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Thomas Nick)
Variante 2 mut 5	uORF1 ATG→TTG	Variante 2 in pcDNA6	pcDNA-seq-F: TAATACGACTCACTATAGGG CLU35-E1-nCLU-ATG-mut-R: ACTGCCCAACCCCTCTAAGC CLU35-E1-nCLU-ATG-mut-F: GAGGGCTGGGGCAGTGTG pcDNA-seq-R: CTGGCAACTAGAAAGGCACAG	<i>in vitro</i> Mutagenese, anschließende Klonierung über HindIII/BamHI in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Janine Schlöder)

Integrat	Modifikationen	DNA-Template	Eingesetzte Primer	Bemerkungen
Variante 3	wt	oligo-dT Erststrang aus MG-132 (10 µM) behandelten HEK-293 Zellen	CLU36-Oligo-1a: CTGAGTAAAGCTTTGATTACTTCTCATGAGAGGCACTCC CLU-humE9/E8-R: CGCTGTGGATCCCTCCCGGTGCTTTTGG	cDNA-Klonierung über <i>HindIII</i> / <i>BamHI</i> in pcDNA6
Variante 3 mut 1	ΔUORF1	Variante 3 in pcDNA6	Clu36delta1aATG1: TGTGAAGCTTGGCACTCCTTGTAAATGTG ApoJ-hum-Lesk-R: GCTCCTTCAGCTTTGTCTCG	PCR-Fragment per <i>AasI</i> -Restriktion mit Variante 1 ligiert, dann Klonierung über <i>HindIII</i> / <i>BamHI</i> in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Matthias Hassemer)
Variante 3 mut 2	ΔUORF2	Variante 3 in pcDNA6	Clu36delta1aATG2: GAGAAGCTTCTACTGAGTGCAGATGG ApoJ-hum-Lesk-R: GCTCCTTCAGCTTTGTCTCG	PCR-Fragment per <i>AasI</i> -Restriktion mit Variante 1 ligiert, dann Klonierung über <i>HindIII</i> / <i>BamHI</i> in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Matthias Hassemer)
Variante 3 mut 3	ΔUORF3	Variante 3 in pcDNA6	Clu36delta1aATG3: TTGGAAGCTTCTGAGCGGGCTTTGG ApoJ-hum-Lesk-R: GCTCCTTCAGCTTTGTCTCG	PCR-Fragment per <i>AasI</i> -Restriktion mit Variante 1 ligiert, dann Klonierung über <i>HindIII</i> / <i>BamHI</i> in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Matthias Hassemer)
Variante 3 mut 4	ΔUORF4	Variante 3 in pcDNA6	Clu36delta1aATG4: AGGGAAGCTTTGAACCAITTCAGGAAGGG ApoJ-hum-Lesk-R: GCTCCTTCAGCTTTGTCTCG	PCR-Fragment per <i>AasI</i> -Restriktion mit Variante 1 ligiert, dann Klonierung über <i>HindIII</i> / <i>BamHI</i> in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Matthias Hassemer)
Variante 3 mut 5	ΔUORF5	Variante 3 in pcDNA6	Clu36delta1aATG5: AGACAAGCTTATGGAGGGTGC AAAAGAC ApoJ-hum-Lesk-R: GCTCCTTCAGCTTTGTCTCG	PCR-Fragment per <i>AasI</i> -Restriktion mit Variante 1 ligiert, dann Klonierung über <i>HindIII</i> / <i>BamHI</i> in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Matthias Hassemer)
Variante 3 mut 6	UORF5 ATG→TTG	Variante 3 in pcDNA6	pcDNA-seq-F: TAATACGACTCATATAGGG CLU36-E1-nCLU-ATG-mut-R: CCATTTGCCCAACACAGAACCC CLU36-E1-nCLU-ATG-mut-F: TCTGTGGCAAATGGAGG pcDNA-seq-R: CTGGCAACTAGAAAGGCACAG	in vitro Mutagenese, anschließende Klonierung über <i>HindIII</i> / <i>BamHI</i> in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Janine Schlöder)
Variante 3 mut 7	Exon 1 ATG→ATA	Variante 3 in pcDNA6	pcDNA-seq-F: TAATACGACTCATATAGGG Clu36-E1mut-R2: CTTTGCAGCCTCAATTG Clu36-E1mut-F2: GTTCTGTGTGGCAAAATGGAG ApoJ-hum-Lesk-R: GCTCCTTCAGCTTTGTCTCTG	in vitro Mutagenese, PCR-Fragment per <i>AasI</i> -Restriktion an Exon 2 von Variante 1 ligiert, dann Klonierung über <i>HindIII</i> / <i>BamHI</i> in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Julia Hartmann)
Variante 3 mut 8	Exon 2 ATG→ATA	Variante 3 in pcDNA6	pcDNA-seq-F: TAATACGACTCATATAGGG CluE2mut-R3: CAGCAGAGTCTTATATGCC CluE2mut-F3: AGAATTGGAGGCATATTAAG ApoJ-hum-Lesk-R: GCTCCTTCAGCTTTGTCTCTG	in vitro Mutagenese, PCR-Fragment per <i>AasI</i> -Restriktion an Exon 2 von Variante 1 ligiert, dann Klonierung über <i>HindIII</i> / <i>BamHI</i> in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Julia Hartmann)
Variante 3 mut 9	Exon 1 ATG→ATA Exon 2 ATG→ATA	Variante 3 mut 8 in pcDNA6	Analog zu Variante 3 mut 7	in vitro Mutagenese, PCR-Fragment per <i>AasI</i> -Restriktion an Exon 2 von Variante 1 ligiert, dann Klonierung über <i>HindIII</i> / <i>BamHI</i> in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Julia Hartmann)
alle Varianten ohne V5/His-Tag	-	Variante 1 in pcDNA6	TAATACGACTCATATAGGG pcDNA-seq-F: CGCTGTGGATCTCCTCCCGGTGCTTTTGG Clu-hum-E9/E8-R2: CG	PCR-Fragment per <i>AasI</i> Restriktion/Ligation mit entsprechenden 5'-Enden der benötigten Varianten vereint und über <i>HindIII</i> / <i>BamHI</i> in pcDNA6 kloniert
Variante 1 mut 5 in pQE30	Exon 2 ATG→ATA Exon 3 ATG→TTG	Variante 1 mut 5 in pcDNA6	Mfe1-RBS-CLU21-449-F: CGCGGCAATTGATTAAGAGGAGAAAATTAA- CTATGGGGACACAGCGTCTCAGAC pcDNA-seq-R: CTGGCAACTAGAAAGGCACAG	PCR-Fragment per <i>MfeI</i> - und <i>PmeI</i> -Restriktion in <i>EcoRI</i> und <i>SmaI</i> restringierten pQE30 kloniert
Variante 1 mut 6 in pQE30	Exon 2 ATG→ATA Exon 2 CTG→TTG	Variante 1 mut 6 in pcDNA6	Mfe1-RBS-CLU34-449-F: CGCGGCAATTGATTAAGAGGAGAAAATTAA- CTATGTCCAATCAGGGAAGTACG pcDNA-seq-R: CTGGCAACTAGAAAGGCACAG	PCR-Fragment per <i>MfeI</i> - und <i>PmeI</i> -Restriktion in <i>EcoRI</i> und <i>SmaI</i> restringierten pQE30 kloniert
Bax	-	oligo-dT Erststrang aus HEK-293 Zellen	Bax-hum-F: AAAA GAAATTCATGGACGGTCCGGGGAG Bax-hum-R: TTTT ETGAGTCAGCCCATCTTCTCCAG	cDNA-Klonierung über <i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i> in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Philipp Heller)
Bcl-XL	-	oligo-dT Erststrang aus HEK-293 Zellen	Bcl-XL-hum-F: AAAA GAAATTCATGTCTCAGAACCCG Bcl-XL-hum-R: AAAA CTGGAGTCATTTCCGACTGAAGAG	cDNA-Klonierung über <i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i> in pcDNA6 (vgl. F2-Praktikum Philipp Heller)

Tab. 8.3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten, analytischen PCR-Primer Gezeigt sind die Primerkombinationen, welche für quantitative oder semi-quantitative PCRs der angegebenen CLU-mRNA-Varianten eingesetzt wurden sowie die Größe des resultierenden Amplikons. Weiterhin sind die für die 5'-RACE verwendeten Primer aufgelistet.

Quantitative PCR Primer	forward (Lokalisation)	reverse (Lokalisation)	Amplikon Größe
total CLU	CLU(total)-hum-qPCR-F: CTATCTGGGGTCCACCAC (Exon 7)	CLU(total)-hum-qPCR-R: CTCAGTGACACCCGGAAGGAAC (Exon 8)	71 bp
CLU Variante 1	CLU-Ex1a-F: ACAGGGTCCCGTGACC (Exon 1a)	CLU36-hum-qPCR-R: CAGCAGAGTCTTCATCATGCC (Exon 2)	65 bp
CLU Variante 2	CLU35-hum-qPCR-F: ATGCAGATGATTCCGGTGT (Exon 1b)	CLU35-hum-qPCR-R: AGCTTTGGCAGCGCTCTGA (Exon 2)	80 bp
CLU Variante 3	CLU36-Ex1c-F2: TCGTCTCTGTTGGTCTCTGTGATG (Exon 1c)	CLU36-hum-qPCR-R: CAGCAGAGTCTTCATCATGCC (Exon 2)	77 bp
CLU Variante 1 [Δex2]	CLU34-Ex1-Ex3-F5: GGGTGCCCGCTGACCGAAAT (Exon 1a / Exon 3)	CLU-Ex3-R: GAGTCTTATCTGTTTACCCCG (Exon 3)	93 bp
Semi-quantitative PCR Primer			
Hsp27	Hsp27-hum-F: GGAGTGTGCGCAGTGGTTAGG	Hsp27-hum-R: GGGAGGAGGAAACTTTGGGTG	350 bp
GAPDH	GAPDH-rat-F2: GCCAAAAGGGTTCATCTCTC	GAPDH-rat-R2: GCTTCACCACCTTTTGATGTC	445 bp
total CLU	CLU-EX3-F: AAAATGCTCAACGGGGTG (Exon 3)	CLU34/36-R2: TTCAGGAGGGCTTACACTCT (Exon 4)	214 bp
CLU Variante 1	CLU34-Ex1a-F: ACAGGGTCCCGCTGACC (Exon 1a)	CLU34/36-R2: TTCAGGAGGGCTTACACTCT (Exon 4)	400 bp
CLU Variante 2	CLU35-Ex1b-F2: CACTGGGAACCTCTACTCTC (Exon 1b)	CLU34/36-R2: TTCAGGAGGGCTTACACTCT (Exon 4)	550 bp
CLU Variante 3	CLU36-Ex1c-F2: TCGTCTCTGTTGGTCTCTGTGATG (Exon 1c)	CLU34/36-R2: TTCAGGAGGGCTTACACTCT (Exon 4)	412 bp
	CLU34-ex1/ex3-F2: ACAGGGTCCCGCTGACCGA (Exon 1a / Exon 3)	CLU34/36-R2: TTCAGGAGGGCTTACACTCT (Exon 4)	274 bp
	CLU34-ex1/ex3-F3: CAGGGTGCCGCTGACCGAA (Exon 1a / Exon 3)	CLU34/36-R2: TTCAGGAGGGCTTACACTCT (Exon 4)	273 bp
	CLU34-ex1/ex3-F4: AGGGTGCCGCTGACCGAAA (Exon 1a / Exon 3)	CLU34/36-R2: TTCAGGAGGGCTTACACTCT (Exon 4)	272 bp
	CLU34-ex1/ex3-F5: GGGTGCCGCTGACCGAAAT (Exon 1a / Exon 3)	CLU34/36-R2: TTCAGGAGGGCTTACACTCT (Exon 4)	271 bp
	CLU34-ex1/ex3-F6: GGTGCCGCTGACCGAAATG (Exon 1a / Exon 3)	CLU34/36-R2: TTCAGGAGGGCTTACACTCT (Exon 4)	270 bp
CLU Variante 3 [Δex2]	CLU36-ex1/ex3-F2: TTCTGTGATGGCAAATGGAAT (Exon 1c / Exon 3)	CLU34/36-R2: TTCAGGAGGGCTTACACTCT (Exon 4)	274 bp
CLU Variante 1 (NM_001831.3)	CLU34-hum-e1-F: CTTTCCGGGCATTCTTTG (Exon 1a)	CLU34/36-R2: TTCAGGAGGGCTTACACTCT (Exon 4)	538 bp
5'RACE Primer			
CLU Gene specific primer (GSP) 1	-	CLU(total)-hum-qPCR-R: CTCAGTGACACCCGGAAGGAAC (Exon 8)	
GSP 2	-	Clus-hum-R: GTGCGTAGAACTTCATGCA (Exon 4)	
	-	CLU34/36-R2: TTCAGGAGGGCTTACACTCT (Exon 4)	
GSP 3	-	Apol-hum-Lesik-R: GCTCCTTCAGCTTTGTCTCTG (Exon 4)	
	-	CLU36-hum-qPCR-R: CAGCAGAGTCTTCATCATGCC (Exon 2)	
Abridged anchor primer (AAP)	5' RACE AAP: GGCCACGGCTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGGIIIG	-	
Abridged universal amplification primer (AUAP)	5' RACE AUAP: GGCCACGGCTCGACTAGTAC	-	

8.3 Sequenzen der klonierten CLU-cDNAs

8.3.1 CLU-cDNA-Variante 1 in pcDNA6

Die folgende Sequenz von Variante 1 ist abgeleitet aus dem NCBI EST „BP211675“ und wurde über die Restriktionsenzyme *HindIII* und *BamHI* in den Vektor pcDNA6 ligiert.

```

...AAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCA
CTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTT
AAGCTTGCGGCGTCGCCAGGAGGAGCGCGCGGGCACAGGGTGCCGCTGACCGAGGCGTGCAAAGACTCCA
GAATTGGAGGCATGATGAAGACTCTGCTGCTGTTTGTGGGGCTGCTGCTGACCTGGGAGAGTGGGCAGGT
CCTGGGGGACCAGACGGTCTCAGACAATGAGCTCCAGGAAATGTCCTCAATCAGGGAAGTAAGTACGTCAAT
AAGGAAATTCAAATGCTGTCAACGGGGTGAACAGATAAAGACTCTCATAGAAAAACAAACGAAGAGC
GCAAGACACTGCTCAGCAACCTAGAAGAAGCCAAGAAGAAGAAAGAGGATGCCCTAAATGAGACCAGGGA
ATCAGAGACAAAGCTGAAGGAGCTCCCAGGAGTGTCAATGAGACCATGATGGCCCTCTGGGAAGAGTGT
AAGCCCTGCCTGAAACAGACCTGCATGAAGTTCTACGCACGCGTCTGCAGAAGTGGCTCAGGCCTGGTTG
GCCGCCAGCTTGAGGAGTTCCTGAACCAGAGCTCGCCCTTCTACTTCTGGATGAATGGTGACCGCATCGA
CTCCCTGCTGGAGAACGACCGGCAGCAGACGCACATGCTGGATGTCATGCAGGACCACTTCAGCCGCGCG
TCCAGCATCATAGACGAGCTCTCCAGGACAGGTTCTTACCCGGGAGCCCCAGGATACCTACCACTACC
TGCCCTT CAGCTGCCCCACCGGAGGCTCACTTCTTCTTTCCCAAGTCCCGCATCGTCCGCAGCTTGAT
GCCCTTCTCTCCGTACGAGCCCCTGAACTTCCACGCCATGTTCCAGCCCTTCTTGAGATGATACACGAG
GCTCAGCAGGCCATGGACATCCACTTCCATAGCCCGGCTTCCAGCACCCGCCAACAGAATTCATACGAG
AAGGCGACGATGACCGGACTGTGTGCCGGGAGATCCGCCACAACCTCCACGGGCTGCCTGCGGATGAAGGA
CCAGTGTGACAAGTGCCGGGAGATCTTGTCTGTGGACTGTTCCACCAACAACCCCTCCAGGCTAAGCTG
CGGCGGGAGCTCGACGAATCCCTCCAGGTCGCTGAGAGGTTGACCAGGAAATACAACGAGCTGCTAAAGT
CCTACCAGTGGAAAGATGCTCAACACCTCCTCCTTCTGCTGGAGCAGCTGAACGAGCAGTTTAACTGGGTGTC
CCGGCTGGCAAACCTCACGCAAGGCGAAGACCAGTACTATCTGCGGGTCAACACGGTGGCTTCCCACACT
TCTGACTCGGACGTTCTTCCGGTGTCACTGAGGTGGTCTGTAAGCTTTTACTCTGATCCCATCACTG
TGACGGTCCCTGTAGAAGTCTCCAGGAAGAACCCTAAATTTATGGAGACCGTGGCGGAGAAAGCGCTGCA
GGAATACCGCAAAAAGCACCGGGAGGAGGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGAATTCGAGATATCCAG
CACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGGTTTGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCG
GTCTCGATTCTACGCTACCGTCACTCATCACCATCACCATTGAGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGAC
TGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCC
ACTCCCACTGTCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATT...

```

pcDNA6-Sequenz **HindIII** Exon 1a sCLU-Startcodon ER-Signalsequenz
AasI CTG-Startcodon Exon 3-Startcodon BamHI Stoppcodon

8.3.2 Weitere CLU-cDNA-Varianten in pcDNA6

Im Folgenden sind lediglich die 5'-Bereiche der jeweiligen cDNAs angegeben. Die übrige Sequenz deckt sich mit der oben angegebenen von Variante 1 (vgl. 8.3.1).

8.3.2.1 Variante 1 [*Δex2*]

Abgeleitet aus dem NCBI EST „BP211675“.

```

...AAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCA
CTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTT
AAGCTTGCGGCGTCGCCAGGAGGAGCGCGCGGGCACAGGGTGCCGCTGACCGAAATGTCCTCAATCAGGGA...

```

pcDNA6-Sequenz **HindIII** Exon 1a Exon 3-Startcodon

8.3.2.2 Variante 1 (NM_001831.3)

```

...AAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCA
CTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTT
AAGCTTGCTTCCGCGGCATTCTTTGGGCGTGAGTCATGCAGGTTGCAGCCAGCCCCAAAGGGGGTGTG
TGCGCGAGCAGAGCGCTATAAATACGGCGCCTCCAGTGCCACAACGCGGCGTCGCCAGGAGGAGCGCG
CGGGCACAGGGTGCCGCTGACCGAGGCGTGCAAAGACTCCAGAAATTGGAGGCATGATGAAGACTCTGCTG
CTGTTTGTGGGGCTGCTGCTGACCTGGGAGAGTGGCAGGTCTGCGGGGACCAGACGGTCTCAGACAAATG
AGCTCCAGGAAATGTC CAATCAGGGAAGTAAGTACGTCAATAAGGAAATTCAAAATGCTGTCAACGGGG...
    
```

pcDNA6-Sequenz HindIII Exon 1a sCLU-Startcodon Exon 1-Startcodon
 ER-Signalsequenz CTG-Startcodon Aasi Exon 3-Startcodon

8.3.2.3 Variante 2

Abgeleitet aus dem NCBI-Datenbankeintrag „NR_038335.1“.

```

...AAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCA
CTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTT
AAGCTTGCCAGGAACACTGGCAGGGCAGCCTGCTGTCGGCTTAGAGGGGATGGGCAGTGTGGAGGGCCTG
GCAGAGCAAGAGGACTCATCCTTCAAAGGGACTTTCTCTGGGAAGCCTGCTCCTCGGGCCACTGCGAAC
CCTCTACTCTCCGAAGGGAATTGTCCTTCTGCGCTTCCACTACTCCACCCCTGAATGCACAGGCAGC
CCGGCCCAAGTCTCCCACTAGGGATGCAGATGGATTCCGGTGTGAAGGGCTGGCTGCTGTTGCCTCCGGCT
CTTGAAAGTCAAGTTCAGAGGCGTGCAAAGACTCCAGAATTGGAGGCATGATGAAGACTCTGCTGCTGTT
TGTGGGGCTGCTGCTGACCTGGGAGAGTGGCAGGTCTGCGGGGACCAGACGGTCTCAGACAATGAGCTC
CAGGAAATGTC CAATCAGGGAAGTAAGTACGTCAATAAGGAAATTCAAAATGCTGTCAACGGGGTAAA...
    
```

pcDNA6-Sequenz HindIII Exon 1a Startcodons uORFs sCLU-Startcodon
 ER-Signalsequenz CTG-Startcodon Aasi Exon 3-Startcodon

8.3.2.4 Variante 3

Abgeleitet aus und „NR_045494.1“.

```

...AAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCA
CTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTT
AAGCTTTGATTACTTCTCATGAGAGGCACTCCTTGTTAATGTGCTACTGAGTGTCCAGATGGGCCTGCTG
GGCTGAGCGGGCTTTGGATGTGAACCATTTCAGGAAGGGGAACCCATCGTCTGTTGGTCTGTGATGG
CAAATGGAGGCGTGCAAAGACTCCAGAATTGGAGGCATGATGAAGACTCTGCTGCTGTTTGTGGGGCTGC
TGCTGACCTGGGAGAGTGGCAGGTCTGCGGGGACCAGACGGTCTCAGACAATGAGCTCCAGGAAATGTC
CAATCAGGGAAGTAAGTACGTCAATAAGGAAATTCAAAATGCTGTCAACGGGGTAAAACAGATAAAGAC...
    
```

pcDNA6-Sequenz HindIII Exon 1c Startcodons uORFs Exon 1-Startcodon
 sCLU-Startcodon ER-Signalsequenz CTG-Startcodon Aasi Exon 3-Startcodon

8.3.3 CLU-cDNA-Varianten in pQE-30

Um die CLU-Isoformen CLU₂₁₋₄₄₉ in Bakterien exprimieren zu können, wurde CLU-mRNA-Variante 1 mut 5 ab der Sequenz unmittelbar *downstream* des CTG-Startcodons auf Exon 2 in pQE30 kloniert. Analog wurde zur Expression von CLU₃₄₋₄₄₉ Variante 1 mut 6 ab dem Exon 3-Startcodon in pQE30 kloniert.

8.3.3.1 Variante 1 mut 5 in pQE-30 (codiert für CLU₂₁₋₄₄₉)

```

...TCGAGAAATCATAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCAATTGTGAGCG
GATAACAATTTACACAGAATTGATTAAAGAGGAGAAATTAACTATGGGGGACCAGACGGTCTCAGACAA
TGAGCTCCAGGAACTGTCCAATCAGGGAAGTAAGTACGTCAATAAGGAAATTCAAAATGCTGTCAACGGG
GTGAAACAGATAAAGACTCTCATAGAAAAACAAACGAAGAGCGCAAGACACTGCTCAGCAACCTAGAAAG
AAGCCAAGAAGAAAGAAAGAGGATGCCCTAAATGAGACCAGGGAAATCAGAGACAAAGCTGAAGGAGCTCCC
AGGAGTGTGCAATGAGACCATGATGGCCCTCTGGGAAGAGTGTAAAGCCCTGCCTGAAACAGACCTGCATG
AAGTTCTACGCACGCGTCTGCAGAAGTGGCTCAGGCCCTGGTGGCCGCCAGCTTGAGGAGTTCTTGAACC
AGAGCTCGCCCTTCTACTTCTGGATGAATGGTGAACCGCATCGACTCCCTGCTGGAGAACGACCCGGCAGCA
GACGCACATGCTGGATGTATGCAGGACCACTCAGCCGCGCGTCCAGCATCATAGACGAGCTCTTCCAG
GACAGGTTCTTCAACCGGGAGCCCAAGGATACCTACCACTACCTGCCCTTCAAGCTGCCCAACGGAGGC
CTCACTTCTTCTTCCCAAGTCCCGCATCGTCCGAGCTTGATGCCCTTCTCTCCGTACGAGCCCCTGAA
CTTCCACGCCATGTTCCAGCCCTTCTTGTAGATGATACACGAGGCTCAGCAGGCCATGGACATCCAATTC
CATAGCCCGGCCTTCCAGCACCCGCCAACAGAATTCATACGAGAAGGCGACGATGACCGGACTGTGTGCC
GGGAGATCCGCCAACCTCCACGGGCTGCCTGCGGATGAAGGACCAGTGTGACAAAGTCCCGGGAGATCTT
GTCTGTGGACTGTTCCACCAACAACCCCTCCAGGCTAAGCTGCGGCGGGAGCTCGACGAATCCCTCCAG
GTCGCTGAGAGTTGACCAGGAAATACAACGAGCTGCTAAAGTCCTACCAGTGGAAAGATGCTCAACACCT
CCTCCTTGTGGAGCAGCTGAACGAGCAGTTTAACTGGGTGTCCCGGCTGGCAAACCTCACGCAAGGCGA
AGACCAGTACTATCTGCGGGTCAACACGGTGGCTTCCACACTTCTGACTCGGACGTTCTTCCGGTGTCT
ACTGAGGTGGTGTGAAAGCTCTTTGACTCTGATCCCATCACTGTGACGGTCCCTGTAGAAGTCTCCAGGA
AGAACCCTAAATTTATGAGACCGTGGCGGAGAAAGCGCTGCAGGAATACCGCAAAAAGCACCCGGGAGGA
GGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAG
GGCCCGGGTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACCGGTACCGGTATC
ATCACCATCACCATTGAGTTTGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGA
TAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAGAACGCTCGGTTGCCCGGGCGTTTT...

```

pQE-30-Sequenz
BamHI

EcoRI-MfeI (ligiert)
pcDNA6-Sequenz

Ribosombindungsstelle
Stoppodon

pQE-30-Startcodon
PmeI-SmaI (ligiert)

8.3.3.2 Variante 1 mut 6 in pQE-30 (codiert für CLU₃₄₋₄₄₉)

```

...TCGAGAAATCATAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCAATTGTGAGCG
GATAACAATTTACACAGAATTGATTAAAGAGGAGAAATTAACTATGTCCAATCAGGGAAGTAAGTACGT
CAATAAGGAAATTCAAAATGCTGTCAACGGGGTGAACAGATAAAGACTCTCATAGAAAAACAAACGA...

```

pQE-30-Sequenz

EcoRI-MfeI (ligiert)

Ribosombindungsstelle

pQE-30-Startcodon

8.4 Mikroskopische Aufnahmen

Im Einband der vorliegenden Arbeit ist eine CD-ROM beigelegt, welche das Dokument nochmals in digitaler Form enthält (.pdf-Datei). Des Weiteren sind alle LSM-Aufnahmen sowie die zugehörigen *Z-stacks* hinterlegt (vgl. 4.4.2.2). Tab. 8.4 zeigt eine Übersicht über die Nummerierung der einzelnen LSM-Dateien auf der CD-ROM

Tab. 8.4: Nummerierung der einzelnen Ordner auf der CD-ROM gemäß den durchgeführten LSM-Aufnahmen.

	Unbehandelt Gegenfärbung: ConA	Unbehandelt Gegenfärbung: WGA	MG-132-behandelt Gegenfärbung: ConA	MG-132-behandelt Gegenfärbung: WGA
Variante 1	01	02	11	12
sCLU/CLU₁₄₄₉	03	04	13	14
Variante 1 [Δex2]	05	06	15	16
CLU₂₁₄₄₉	07	08	17	18
CLU₃₄₄₄₉	09	10	19	20

VERÖFFENTLICHUNGEN

Auszüge dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Wissenschaftliche Artikel:

Prochnow, H., Gollan, R., Rohne, P., Hassemer, M., Koch-Brandt, C. und Baierdörfer, M. (2013). "Non-secreted clusterin isoforms are translated in rare amounts from distinct human mRNA variants and do not affect Bax-mediated apoptosis or the NF-kappaB signaling pathway." PLoS One **8**(9): e75303.

Posterpräsentationen:

Prochnow H., Baierdörfer M., Koch-Brandt C. (2011): *Ectopic expression of full length human CLU mRNA variants in HEK 293 cells and characterization of the produced protein isoforms.* 6th CLU (Clusterin/ApoJ) Workshop/Parma

Prochnow H., Baierdörfer M., Koch-Brandt C. (2010): *Apolipoprotein J/Clusterin, a protein with different isoforms and different functions?* CNC 2010 First Cell Networks Conference/Heidelberg

VERSICHERUNG

Hiermit versichere ich gemäß § 11, Abs. 3d der Promotionsordnung vom 22.12.2003, dass ich die Dissertation mit dem Titel „Charakterisierung und funktionelle Analyse verschiedener Isoformen von Clusterin (Apolipoprotein J)“ selbst angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe die vorliegende Dissertation bei keiner anderen Fakultät bzw. keinem anderen Fachbereich als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht und noch keinen Promotionsversuch an einer anderen Universität oder in einem anderen Fachbereich unternommen.

Datum

Hans-Peter Prochnow