

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Lösungen, Antikörper, Kits, Zellen und Tiere

Chemikalien

Amine-Coupling-Kit	BIAcore, Schweden
Äther (Diethyläther)	Roth, Deutschland
Aprotinin	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
2-Mercaptoethanol	Merck, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
BSA	BioLabs, Deutschland
CaCl ₂	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
DAB Peroxidase Substrate Kit	Vector Lab., USA
dDAVP	Minirin, Ferring Arzneimittel, Deutschland
DSP	Pierce, USA
DTSSP (Biotin markiert)	Pierce, USA
EDC (N-ethyl-N-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)	Biosensor, Schweden
EGTA	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Eindeckmittel	Fluorescence Mounting Medium, DAKO, Dänemark
ELISA (β-Amyloid _{40/42})	BioSource, USA
Eosin	Roth, Deutschland
Eselserum	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Ethanol	Roth, Deutschland
Ethanolamine	Sigma-Aldrich Co., Deutschland

Glyzin	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Hämalaunlösung	Merck, Deutschland
Iodixanol	OptiPrep™ (60 % w/v), Axis-Shield, Norwegen
Isofluran	CuraMED Pharma GmbH, Deutschland
Ketavet®	Pharmacia-Upjohn, Schweden
Leupeptin	Serva, Deutschland
Luminollösung	Super Signal West Pico Substrate, Pierce, USA
Magermilch	Glücksklee, Deutschland
MgCl ₂	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Molekulargewichtsmarker	Precision Plus Protein™, BIO-RAD, Deutschland
M.O.M.-Block	Vector Lab., USA
NaCl	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
N-hydroxysuccimide	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Nonidet P-40	Fluka, Schweiz
Paraffin	Roth, Deutschland
Pepstatin-A	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Deutschland
PBST	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
PMSF	Serva, Deutschland
poly-L-ornithine	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Ponceau-S	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BIO-RAD, Deutschland
Rompun® (2 %)	Bayer, Deutschland
Sepharose (G-coupled)	Pierce, USA

Sucrose	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Triton X-100	Amresco, USA
Target retrieval solution	DAKO A/S, Dänemark
Tween-20	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Xylol	Roth, Deutschland
Ziegenserum	Zymed, Deutschland

Medien und Zusätze

DMEM	Cambrex Corp., USA
FCS	PAA Lab., Österreich
FuGENE 6	Roche, Deutschland
Ham's F12/DMEM	PAA Lab., Österreich
L-Glutamin	Gibco/Invitrogen, Großbritannien
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Großbritannien
Non-essential amino acids	Gibco/Invitrogen, Großbritannien
OptiMEM®	Gibco/Invitrogen, Großbritannien
Trypsin-EDTA	Cambrex Corp., USA

Antibiotika und verwendete Konzentrationen

Hygromycin B	Invitrogen, Großbritannien, (Zellkultur: 500 µg/ml]
Penicillin/Streptomycin	Cambrex Corp., USA, (Zellkultur: P. 10000 U/ml, S. 10 mg/ml)
Zeocin™	Invitrogen, Großbritannien, (Zellkultur: 333 µg/ml)

Antikörper und verwendete Konzentrationen

(WB: Western Blot, IH: Immunhistologie)

Primärantikörper

- anti-APP, Maus, monoklonal 6E10 (extrazelluläre Domäne, sAPP α /A β), Signet Lab., USA, WB: 1:1000, IH: 1:500
- anti-APP, Maus, monoklonal WO2 (extraz. Domäne, APP/A β), K. Beyreuther (Zentrum für Molekulare Biologie, Heidelberg), WB: 1:2000
- anti-APP, Maus, monoklonal 4G8 (extraz. Domäne, + murines A β), Signet Lab., USA, IH: 1:500
- anti-APP, Kaninchen, Serum CT695 (intrazelluläre Domäne), Zymed, Deutschland, WB: 1:1000, IH: 1:500
- anti-APP, Kaninchen, Serum CT15 (intraz. Domäne), C. Pietrzik (Universität Mainz, Mainz, Deutschland), WB: 1:1000, IH: 1:500
- anti-APP, Maus, monoklonal 22C11 (extraz. Domäne), Chemicon Int., USA, WB: 1:2000
- anti-sAPP β , Kaninchen, Serum 192 (extraz. Domäne), K. Bales (Lilly Comp., USA), WB: 1:1000
- anti-SorLA, Ziege, Serum J. Gliemann (University of Aarhus, Aarhus, Dänemark), WB: 1:300, IH: 1:200
- anti-SorLA, Kaninchen, Serum J. Gliemann (University of Aarhus, Aarhus, Dänemark), WB: 1:1000, IH: 1:500
- anti-NKCC2, Kaninchen, Serum M. Knepper (National Inst. of Health, Bethesda, USA), WB: 1:500, IH: 1:250
- anti-NCC, Kaninchen, Serum M. Knepper (National Inst. of Health, Bethesda, USA), WB: 1:500
- anti-ROMK, Kaninchen, Serum Chemicon Int., USA, WB: 1:300
- anti-EEA1, Kaninchen, Serum Calbiochem, USA, WB: 1:500
- anti-Golgin-97, Maus, monoklonal Molecular Probes, USA, WB: 1:1000
- anti- β_1 -Integrin, Maus, monoklonal Chemicon Int., USA, WB: 1:100
- anti-Grp78, Kaninchen, Serum StressGene, Kanada, WB: 1:2000
- anti-GS28, Ratte, Serum StressGene, Kanada, WB: 1:100
- anti-IL2-R, Ratte, monoklonal Abcam, Großbritannien, WB: 1:500

anti-Lamp1, Kaninchen, Serum Abcam, Großbritannien, WB: 1:500

Sekundärantikörper

(POD: Peroxidase-markiert)

anti-Maus, Alexa488 Molecular Probes, USA, IH: 1:500

anti-Ziege, Alexa546 Molecular Probes, USA, IH: 1:500

anti-Kaninchen, Alexa546, 488 Molecular Probes, USA, IH: 1:500

anti-Ratte, Alexa546 Molecular Probes, USA, IH: 1:500

anti-Kaninchen, POD Sigma-Aldrich Co., Deutschland, WB: 1:1500, IH: 1:1000

anti-Maus, POD Sigma-Aldrich Co., Deutschland, WB: 1:1500, IH: 1:1000

anti-Ziege, POD Sigma-Aldrich Co., Deutschland, WB: 1:1500, IH: 1:1000

Zelllinien

CHO-A „Chinese hamster ovary“-Zellen, APP₆₉₅-positiv, J. Gliemann (University of Aarhus, Aarhus, Dänemark)

SH-SY5Y human, Neuroblastomazelllinie, CRL-2266, ATCC-LGC Promochem, USA

Proteinfragmente

Die extrazelluläre Domäne von SorLA wurde von Jörgen Gliemann (University of Aarhus, Aarhus, Dänemark), die APP-Fragmente von Roberto Cappai (University of Melbourne, Melbourne, Australien), RAP von (Olav M. Andersen, MDC-Berlin, Deutschland) und LRP von Anders Nykjaer (University of Aarhus, Aarhus, Dänemark) zur Verfügung gestellt.

Tiere

SorLA^{-/-} Maus SorLA18, SorLA27, SorLA39, M. Gotthardt (MDC, Berlin)

SorLA^{+/+} Maus 129Bl6 (129SvEmcTer x C57BL₆N),

129Balb/c (129SvEmcTer x Balb_c) The Jackson Laboratory

Tierfutter

SNIFF M-Z extrudiert Alleinfutter für Mäusezucht; SNIFF, Spezialdiäten GmbH, Deutschland

SNIFF M-Z 0 % NaCl SNIFF, Spezialdiäten GmbH, Deutschland

sonstige Materialien

Centricon Millipore, USA

Deckgläser Marienfeld, Deutschland

metabolische Käfige UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, Niederlande

Nitrozellulosemembran Hybond C+, Amersham Biosciences, Schweden

Objektträger SuperFrost Plus, beschichtet, Menzel, Deutschland

Pasteurpipette Roth, Deutschland

Pipetten Eppendorf, Deutschland

SDS-Page Gel 4-15 % Gibco/Invitrogen, Großbritannien

Whatmanpaper® Whatman Int. Ltd., Großbritannien

Zellkulturschalen Greiner Holding AG, Österreich

2.1.2 Apparaturen und Software

Apparaturen

analytische Ultrazentrifuge XL-A, Beckmann, Deutschland

BIAcore Biosensor, Schweden

Brutschrank Binder GmbH, Deutschland

Einbettmaschine/Paraffin	Leica Microsystems GmbH, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	CK-30, Olympus Europe Holding, Deutschland
Gelkammer	BIO-RAD, Deutschland
Intelligent Dark Box	Fuji Photo Film Europe GmbH, Deutschland
LAS-1000 (CCD camera)	Fuji Photo Film Europe GmbH, Deutschland
Laser-scanning Mikroskop	LSM510 Meta, Carl Zeiss AG, Deutschland
Mikrotom Rm2155	Leica Microsystems GmbH, Deutschland
Plattenreader	Synergy HT, BioTek, USA
Telemetriesender	RFBTA11PA-C20, Data Science Int., USA
Ultrospec 2100 pro	Amersham Bioscience
Ultra-Turrax®	IKA Werke, Deutschland
Ultrazentrifuge	AvantiJ25, Beckmann, Deutschland
Western Blot-Kammer	BIO-RAD, Deutschland
Zeiss Axiovert 135	Mikroskop, Carl Zeiss AG, Germany
Zentrifugen	5417R, Eppendorf, Deutschland
	Sorvall-SS34, Kendro Lab. Products, USA
	SW-55, Beckman, Deutschland

Software

BIAevaluation 3.0	Biosensor, Schweden
LSM Release 3.2 Software	Zeiss Germany

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung, Transfektion und Selektion von Zellen

Auftauen von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden aus tiefgefrorenem Material (ca. -170 °C) kultiviert. Dabei wurden das Cryovial (beinhaltend 1 ml Zellsuspension in Einfriermedium) mit 1 ml Medium (37 °C) versehen, im Wasserbad (37 °C) zügig aufgetaut und die 2 ml Zellsuspension in 10 ml (37 °C) Medium aufgenommen. Die Zellen wurden zentrifugiert bei 800 g (RT) für 3 min, der Überstand verworfen, das Pellet in Kultivierungsmedium resuspendiert und in die Kulturschale gegeben.

Kultivierung

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ kultiviert und je nach Wachstumsgeschwindigkeit und Zelldichte nach 3 bis 4 Tagen passagiert. CHO-Zellen wurden in „Dulbecco’s modified Eagle medium“ (DMEM) mit 10 % „fetal calv serum“ (FCS) und Penicillin/Streptomycin (P: 100 U/ml, S: 100 µg/ml) kultiviert. SH-SY5Y-Zellen wuchsen in Ham’s F12/DMEM (1:1) mit 10 % FCS, 0,1 mM „non-essential amino acids“ (NEAA), 2 mM L-Glutamine und Penicillin/Streptomycin. Für die Kultivierung von APP-positiven CHO-A-Zellen wurde dem Medium das Antibiotikum Hygromycin 500 µg/ml zugegeben.

Passage

Für die Umsetzung von Zellen, wurden diese 2 x mit PBS (ohne Mg²⁺/Ca²⁺) gewaschen und je nach Größe der Kulturschale mit (z. Bsp. 1 ml auf 10 cm Ø Schalen) Trypsin-EDTA versehen. Dem folgte eine Inkubation von ca. 5 min bei 37 °C, daraufhin wurde die Reaktion mit mindestens dem 10fachen Volumen an Kulturmedium abgestoppt, die Zellsuspension vorsichtig homogenisiert und für 3 min bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Kultumedium aufgenommen, vorsichtig homogenisiert und anschließend auf die gewünschte Menge von Zellkulturschalen verteilt.

Transfektion

Für die Transfektion von Zellen wurden diese mit einer Konfluenz von ca. 30 % (CHO) bzw. 60 % (SH-SY5Y) ausgesät und 1 bis 2 Tage später transfiziert. Hierfür wurden die Zellen 2 x mit PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen und Transfektionsmedium (Optimem®) zugegeben (etwa die Hälfte der für die entsprechenden Kulturschalen eigentlich verwendeten Mediummenge). Der Transfektionsmix wurde wie folgt angesetzt: 50 μl Transfektionsmedium, 10 μl Transfektionsreagenz (FuGENE®, Lipofectamine), 1 μg cDNA – leicht schwenken und 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubieren. Im Anschluß wurde der Transfektionsmix auf die Zellen, direkt in das Medium pipettiert. Etwa 16 h später wurde die Kulturschale mit gleichem Volumen an Kulturmedium (beinhaltend 20 % FCS) aufgefüllt, damit resultierend 10 % FCS im Medium vorlagen. 24 h später erfolgte ein Mediumwechsel zu ausschließlich Kulturmedium (mit 10 % FCS).

Selektion

Das für die Transfektion verwendete Konstrukt enthielt neben der cDNA für SorLA eine Sequenz für das Resistenzgen Zeocin, daher konnte eine Selektion der positiven Zellen mit dem Antibiotikum Zeocin™ erfolgen. Dieses wurde 48 h nach der Transfektion dem Kulturmedium zugegeben (333 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Täglich erfolgte ein Mediumwechsel um die abgestorbenen Zellen zu entfernen und den Selektionsdruck hoch zu halten.

Unter diesem Regime gewachsene Zellkolonien wurden mit der Pipette von der Kulturschale mit 20 μl Medium aufgenommen, in 96-well Platten mit 50 μl Trypsin/Kavität übersetzt, 5 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 230 μl Medium aufgefüllt. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt und später die sogenannten Zellklone je nach Wachstumsgeschwindigkeit in größere Kulturschalen durch Passagieren umgesetzt.

2.2.2 Proteinchemie

2.2.2.1 Western Blot-Analyse

Proteinextrakt aus Zellen

Zellrasen auf Kulturschalen (\varnothing 6 cm) wurden 2 x mit PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen, abgeschabt und 3 min bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in

Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 1 % Triton X-100, pH 7,5) unter Zugabe von Proteinaseinhibitoren (1 mM Phenylmethansulfonylfluorid [PMSF], 0,1 mM Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin-A, 10 µg/ml Aprotinin) homogenisiert, 30 min auf Eis inkubiert und nach nochmaliger Homogenisierung für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert. Die Proteinkonzentration des Überstands wurde mittels „Protein Assay Dye Concentrate“ (BIO-RAD) bestimmt und anhand einer „bovine serum albumin“ (BSA)-Proteinstandardkurve berechnet. 100 µg Protein wurde mit ¼ (v/v) 4fach-konzentriertem Lämmli-puffer (0,25 M Tris-HCl, 1,92 M Glycine, 1 % Natriumdodecylsulfat [SDS], 0,008 % Bromphenolblau) unter Zugabe von 5 % 2-Mercaptoethanol für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend auf das Gel aufgetragen.

Proteinextrakt aus Mausgewebe

Hierfür wurde das entsprechende Gewebe (Gehirn, Niere, Nebenniere) dem getöteten Tier entnommen, gewogen und mit Hilfe eines Skalpell zerkleinert. Bei einer Konzentration von 3 ml/mg Lysepuffer-A (20 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 0,25 M Sucrose, pH 7,5, Proteinaseinhibitoren)/Gewebe wurde die Suspension mittels Ultra-Turrax zerkleinert, Zellkerne und -bruchstücken wurden bei 10.000 g (10 min, 4 °C) abzentrifugiert und der Überstand ein weiteres Mal bei 100.000 g (45 min, 4 °C) zentrifugiert. Das Pellet wurde wiederum in ca. 300 µl Lysepuffer-B (50 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 80 mM NaCl, 1 % Triton X-100, pH 8,0, Proteinaseinhibitoren) resuspendiert, die Proteinkonzentration mittels BIO-RAD-Reagenz und BSA-Proteinstandardkurve kalkuliert. 50 µg Protein wurden schließlich mit ¼ (v/v) 4fach-konzentriertem Lämmli-puffer + 5 % 2-Mercaptoethanol versehen, 5 min bei 95 °C inkubiert und auf das Gel aufgetragen.

SDS-Page Gelelektrophorese und Wester Blot-Technik

Die aufbereiteten Proteinextrakte wurden neben einem Molekulargewichtsmarker (Precision Plus Protein™, BIO-RAD) auf das Gel aufgetragen. Der Laufpuffer enthielt (0,6 % Tris-HCl, 2,88 % Glycin, 0,1 % SDS). Die Elektrophorese wurde für ca. 1,5 h bei 20 mA durchgeführt. Unter Verwendung einer Western Blot-Kammer wurden die nach Größe aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Proteintransfer und gleichmäßige Probenladung wurden mittels Ponceau-S-Färbung verifiziert (hier nicht dargestellt). Im Detail, die Membran wurde auf die Gelgröße zugeschnitten und für 5 min in Transferpuffer (1,12 % Glycin, 0,22 % Tris-HCl) equilibriert. Innerhalb der Transfer-Apparatur wurde die

Membran auf 2 in Transferpuffer getränkte Whatmanpapiere aufgelegt. Auf die Membran wurden das Gel sowie 2 weitere Whatmanpapiere aufgelegt, eventuell aufgetretene Luftblasen zwischen den Schichten wurden entfernt durch Rollen einer kleinen Walze über den Blotting-Stapel. Der elektrophoretische Transfer wurde für 2 h bei 300 mA durchgeführt.

Detektion

Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation der Nitrozellulosemembran in 5 % Magermilch, 5 % FCS in PBST (PBS mit 0,05 % Tween-20) für 1h (RT) geblockt. Die Inkubation mit den entsprechenden Primäantikörpern erfolgte in PBST-Lösung (mit 5 % Magermilch) über Nacht bei 4 °C. Verwendete Antikörperkonzentrationen (primäre und sekundäre) sind unter 2.1.1 aufgelistet. Die Inkubation mit Peroxidase-gekoppelten Sekundäantikörpern erfolgte bei RT für 1h in PBST-Lösung (mit 5 % Magermilch). Vor und nach der Sekundäantikörperinkubation lagen jeweils 3 Waschschrte für je 15 min mit PBST (mit 1 % Nonidet P-40; 0,1 % SDS).

Für die Detektion wurde die Membran 2 min in Luminol-Lösung inkubiert, und die Chemilumineszenz mittels Fuji-Imager visualisiert und aufgezeichnet.

2.2.2.2 Koimmunpräzipitation von Proteinen aus Zellen

Präparation des Säulenmaterials

75 µl der Protein-G-gekoppelten Sepharose wurden 2 x mit 450 µl PBS gewaschen und anschließend mit 250 µl Medium und der entsprechenden Menge Antikörper (5 µl anti-SorLA Kaninchenserum oder 2 µl anti-APP WO2) für 3 h bei 10 °C geschüttelt. Anschließend wurde das Säulenmaterial zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Material noch 2 x mit PBS gewaschen.

Präparation der Zellen

Die Zellen wurden 2 x mit PBS (ohne Mg^{2+}/Ca^{2+}) gewaschen, 1 h bei RT mit membranpermeablen Dithiobissuccinimidylpropionate (DSP)/PBS [0,4 mg/ml] (Vernetzer mit 12 Å Spannweite) inkubiert, anschließend die Reaktion für 30 min/RT mit 1/20 (v/v) 1 M Tris-HCl (pH 7,5) gestoppt und die Zellen 2 x mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 0,5 ml PBS

abgeschabt, kurz zentrifugiert und das Pellet mit 100 µl Lysepuffer (mit Proteaseninhibitoren) lysiert.

75 µl des Lysats und 900 µl Medium wurden auf das präparierte Säulenmaterial aufgetragen und bei 10 °C über Nacht schüttelnd inkubiert. Das Säulenmaterial wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Sepharose 5 x mit PBST gewaschen. Schließlich wurden 40 µl Lämmli-puffer (+ 5 % 2-Mercaptoethanol) auf das Säulenmaterial gegeben, der Mix für 5 min bei 95 °C erhitzt, zentrifugiert und der Überstand auf das SDS-Page-Gel aufgetragen. Um gleiche Proteinmengen aufzutragen, wurden die Proteinkonzentrationen der Proben nach Lyse bestimmt und die verwendeten Ausgangsmengen an Lysat für die Säulen dementsprechend angepaßt. Die Detektion erfolgte mittels Western Blot-Analyse.

2.2.2.3 Biotinylierung von Zellmembranproteinen

SH-SY5Y Zellen wurden auf Eis 2 x mit PBS gewaschen, 1,5 h mit Membran-impermeablen Sulfo-N-hydroxysuccinimidobiotin/PBS [0,5 mg/ml] (Biotin-markierter Vernetzer) inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde mit 1/20 (v/v) 1 M Tris-HCl (pH 7,5; 20 min) abgestoppt, die Zellen abgeschabt und anschließend lysiert (Lysepuffer, 1 % Nonidet P-40, Proteaseninhibitoren), sowie die Proteinkonzentration bestimmt. Das gesamte Zellysat der Lösung mit der geringsten Proteinkonzentration wurde aufgetragen, die weiteren Lösungen wurden in der Konzentration an die geringst konzentrierte Probe angepaßt, damit alle aufgetragenen Proben die gleiche Proteinmenge enthielten. Die Lysate wurden auf eine Streptavidin-gekoppelte Sepharosesäule gegeben und 1h bei RT geschüttelt, anschließend wurde das Säulenmaterial 5 x gewaschen und die gebundenen Proteine mit Lämmli-puffer 5 min bei 95 °C eluiert. Das Eluat wurde auf Gradientengele (4 - 15 %) aufgetragen, die Proteine elektrophoretisch getrennt und mittels Western Blot analysiert.

2.2.2.4 Subzelluläre Fraktionierung mittels differentieller Zentrifugation

Für die subzelluläre Fraktionierung wurden je Gruppe 2 Mäuse getötet, die Gehirne entnommen, in kleine Stücke zerteilt und mit dem Ultra-Turrax in Lysepuffer (0,32 M Sucrose, 10 mM HEPES, 2 mM EDTA, Proteaseninhibitoren) homogenisiert. Das

Homogenisat wurde anschließend mehrfach zentrifugiert, wobei nach jedem Schritt das Pellet verworfen wurde. Dem Überstand wurden jeweils 20 µl als Probenmaterial entnommen und das restliche Volumen in den nächsten Zentrifugationsschritt übernommen. Die Zentrifugationen erfolgten aufsteigend 2 x für je 10 min bei 3100 g, 5200 g, 12600 g und für 45 min bei 100000 g.

Der Überstand der 3100 g Zentrifugation wurde bezeichnet als post-nukleare Fraktion (PNF), der Überstand der 5200 g Zentrifugation als schwere mitochondriale Fraktion. Die leichte mitochondriale Fraktion bezeichnet den Überstand der Zentrifugation bei 12600 g und die mikrosomale Fraktion beinhaltet den Überstand der Ultrazentrifugation bei 100000 g. Die Überstände wurden auf 4 – 15 %ige Gradientengele aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und anschließend mittels Western Blot analysiert.

2.2.2.5 Subzelluläre Fraktionierung mittels Gradientendichtezentrifugation

Zellpräparation

Die Zellen von je 5 x 15 cm Ø Kulturschalen wurden 2 x mit PBS gespült, abgeschabt und bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Homogenisationspuffer (10 mM HEPES [pH 7,4], 1 mM EDTA [0,5 M], 250 mM Sucrose, Proteaseninhibitoren) mit Hilfe des Ultra-Turrax aufgeschlossen und anschließend durch eine Kanüle (27 gauge) passiert. Zellkerne und –bruchstücken wurden mittels Zentrifugation bei 1500 g für 10 min entfernt. Der Überstand wurde bei 65.000 g für 1 h zentrifugiert und das resultierende vesikuläre Pellet in 0,8 ml Homogenisationspuffer resuspendiert.

Gradientenpräparation

Die Gradientenstammlösung enthielt 50 % Iodixanol (OptiPrep, 60 % w/v), 0,25 M Sucrose, 1 mM EDTA und 10 mM HEPES (pH 7,4). Die 9 Gradienten wurden erstellt durch Verdünnung der Gradientenstammlösung mit dem Homogenisationspuffer und enthielten 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 20 und 30 % Iodixanol. In einem Zentrifugenbecher wurden die Gradienten wie folgt unterschichtet: 1 ml 2,5%; je 2 ml 5 %; 7,5 % und 10 %; 0,5 ml 12,5 %; 2 ml 15 %; je 0,5 ml 17,5 % und 20 %, 0,3 ml 30 %.

Die resuspendierte Vesikelfraktion wurde auf die Gradientenlösung gegeben und für 2,5 h bei 200.000 g (4 °C) zentrifugiert. Der resultierende Gradient wurde in 1 ml Fraktionen, beginnend von der Bodenfraktion, gesammelt und je Fraktion wurden 15 µl zur Analyse auf ein Gradientengel aufgetragen. Die Proteinanalyse erfolgte mittels Western Blot.

2.2.2.6 β-Amyloid-Bestimmung im konditionierten Zellmedium

Für die Messung der β-Amyloidkonzentration im Medium wurden Zellen (10 cm Ø Schalen) mit PBS (mit Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen und mit frischem Kulturmedium versehen. Dieses wurde für 48 Stunden auf den Zellen belassen, abgenommen und mit Hilfe von Centricons (mit einem cut-off von 3 kDa) aufkonzentriert. Das konzentrierte Medium wurde anschließend mit Hilfe eines „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) zur Bestimmung von β-Amyloid₄₀ und -₄₂ vermessen. Hier wurde dem Herstellerprotokoll gefolgt. Die Extinktionsmessung erfolgte mit Hilfe des Plattenreaders Synergy-HT. Die Kalkulation der Konzentrationen beruht auf einer mitgeführten Standardkurve, bestimmt mit Hilfe von Standardmaterial des ELISA.

2.2.3 Immunhistologische Techniken

2.2.3.1 Immunfluoreszenz von Zellen

Für die Immunfluoreszenzexperimente wurden Zellen nach der Passage auf Deckgläser (Ø 14 mm, beschichtet mit Poly-L-Ornithine) ausgesät und bis zur Ausbildung von Elongationen, als Zeichen vollständigen Anwachsens (ca. 48h), bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Deckgläser wurden zweimal kurz mit PBS (mit Ca²⁺/Mg²⁺) gespült, mit 4 % Paraformaldehyd/PBS für 10 min bei RT fixiert und nochmals gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation der Zellen mit 10 % Serum der Spezies des Sekundärantikörpers (mit 0,2 % BSA, 0,3 % Triton, PBS) für 1h bei RT. Anschließend wurde der Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert, nachfolgend die Deckgläser für 2 h mit PBS gewaschen. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (in 1 % Triton/PBS) wurde anschließend auf die Zellen gegeben und diese für 2 h (RT, in Dunkelheit)

inkubiert. Konzentrationen der Primär- und Sekundärantikörper sind unter 2.1.1 aufgelistet. Der Sekundärantikörperinkubation folgte wiederum ein Waschschriff mit PBS für 2h bei RT. Schließlich wurden die Deckgläser mit Eindeckmedium versehen und mit der Oberseite nach unten auf Objektträger aufgelegt, kurz angedrückt und getrocknet.

Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laser-scanningmikroskop aufgenommen und mittels der LSM Release 3.2 Software verarbeitet.

2.2.3.2 Immunfluoreszenz von Gewebeschnitten

Für die Immunfluoreszenz von Gewebeschnitten wurden die Tiere mit 4 % Rompun / 16 % Ketavet (in 0,9 % Saline) anästhesiert. Für die kardiale Perfusion mit PBS und 4 % PFA/PBS wurden die anästhesierten Tiere auf dem Rücken gelagert, die Pfoten mit Nadeln auf der Unterlage fixiert, der Bauch- und Brustraum geöffnet, die herzseitigen Rippen entfernt und eine Zwillingskanüle, welche an das PBS- bzw. PFA/PBS-Reservoir über Schläuche angebunden war, in die linke Herzkammer eingeführt und mit einer Klammer fixiert. Nun wurde die rechte Herzkammer angeschnitten und das Gefäßsystem mit PBS gespült. Nach vollständiger Spülung, zu erkennen am PBS-Ausfluß aus der rechten Herzkammer, wurde das Ventil der Zwillingskanüle auf PFA/PBS geschaltet und das Gefäßsystem für 2 min mit 4 % PFA/PBS gespült. Anschließend wurden die Nieren entnommen und nochmals über Nacht in 4 % PFA/PBS fixiert. Dem folgte ein Wässerungsschritt über mindestens 4 h unter fließendem Leitungswasser. Nach Entwässerung über eine Alkoholreihe (je 2 h 70 % Ethanol und 90 % Ethanol, über Nacht 96 % Ethanol, nochmals 2 h 96 % Ethanol) wurden die Gewebe 2 x 20 min in Xylol gelagert, je 2 h in flüssigem Paraffin (60 °C) gelagert und schließlich in Paraffinblöcke eingebettet.

Für die Erstellung der Gewebeschnitte wurde der Gewebe-Paraffinblock in ein Mikrotom eingespannt und 4 µm starke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgetragen und getrocknet. Für die Immunfluoreszenz wurden die Objektträger deparaffinisiert und rehydriert. Dies geschah durch folgende Inkubationsschritte: 1 h bei 55 °C, 3 x 5 min Xylol, 3 x 3 min 96 % Ethanol, 3 min 90 % Ethanol, 3 min 70 % Ethanol, 3 min 50 % Ethanol, 2 x 3 min destilliertes Wasser. Dem schloß sich eine Inkubation zur Antigen-Freisetzung an: 20 min bei 95 °C in „target retrieval solution“ (TRS), 20 min Abkühlung, 3 min dest. Wasser, 3

min PBS (mit 0,1 % Triton). Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Gewebeschnitte mit M.O.M.TM-Block für 60 min bei RT inkubiert, anschließend mit PBS für 5 min gewaschen. Die Primärantikörperinkubation erfolgte in PBS (mit 0,2 % Triton, 1 % BSA) über Nacht bei 4 °C. Verwendete Primär- und Sekundärantikörper bzw. –konzentrationen sind unter 2.1.1 aufgelistet. Anschließend wurden die Objektträger bei 2 x 5 min in PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Schließlich wurden die Schnitte mit 3 x 5 min mit PBS und 1 x 5 min mit dest. Wasser gewaschen, mit Eindeckmedium benetzt und Deckgläser aufgelegt. Die Bilder wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

2.2.3.3 Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten

Das Protokoll für die immunhistologische Peroxidase-basierende Diaminobenzidin-Färbung (auch DAB-Färbung genannt) ist angelehnt an das Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten. Unterschiede liegen lediglich in der Blockierung, in den verwendeten Sekundärantikörpern und in der anschließenden Substratinkubation. Für die Inaktivierung der endogenen Peroxidase und damit für die Reduzierung unspezifischer Färbung wurden die Schnitte 10 min in 3 % H₂O₂/PBS inkubiert und anschließend 5 min in PBS gewaschen, bevor die M.O.M.TM-Blockierung durchgeführt wurde. Verwendete Primär- und Sekundärantikörper können wiederum unter 2.1.1 nachgelesen werden. Die Objektträger wurden nach der Sekundärantikörperinkubation 3 x 5 min mit PBS und 1 x 5 min mit dest. Wasser gewaschen, mit dem DAB-Kit inkubiert, anschließend 1 min mit dest. Wasser gewaschen, für 10 s in Eosin inkubiert, gefolgt von 5 min waschen und schließlich in Hämalaun für 10 s inkubiert. Die Hämalaunfärbung wurde gestoppt durch spülen mit Leitungswasser. Für die Analyse der Proteinfärbung wurden die Schnitte mit Eindeckmedium benetzt und Deckgläser aufgelegt.

2.2.4 Analytische Ultrazentrifugation

Die Bestimmung der molekularen Massen, sowie die Analyse der Komplexbildung wurde mittels Sedimentationsequilibrium Technik, mit Hilfe einer analytischen Ultrazentrifuge, durchgeführt. 70 µl der Proteinextrakte der extrazellulären SorLA- und APP-Domäne (in 10 mM HEPES, pH 7,4; 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂) wurden in einer 6-Kammerzelle für 2

Stunden bei 20.000 g zentrifugiert, gefolgt von 36 – 38 h Equilibrium bei 11.300 g, 10 °C. Die radiale Absorptionsverteilung des Sedimentationsequilibriums wurde bei 3 verschiedenen Wellenlängen (220, 225 und 230 nm) gemessen und mit Hilfe von POLYMOLE gefittet. Zur Analyse der Komplexstöchiometrie wurden aufsteigend molare Mengen von APP695 zu 0,1 µM SorLA-Lösung gegeben. Die Versuche der analytischen Ultrazentrifugation führte Joachim Behlke, MDC Berlin-Buch, durch.

2.2.5 „Surface Plasmon Resonance“ (SPR)-Analyse

Der extrazelluläre Teil von SorLA wurde auf dem CM5 BIAcore Sensor Chip mit Hilfe des „Amine Coupling Kit“ immobilisiert. Im Detail: nach der Chip-Aktivierung durch die Injektion von 0,2 M N-ethyl-N-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) und 0,05 M N-hydroxysuccimide, wurde gereinigtes SorLA-Protein (in 25 mM Natriumacetat, pH 5,0, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂) verdünnt auf eine Konzentration von 10 µg/ml durch die Zugabe von 10 mM Natriumacetat, pH 4,5, und anschließend über die BIAcore Kammer mit einer Flußrate von 5 µl/min geleitet. Nach der Proteinbindung wurde der BIAcore Chip mit 1 M Ethanolamin, pH 8,5, benetzt. Der Chip wurde mit einer Dichte von 56 fmol/mm² SorLA (extrazell. Domäne) beschichtet. Die Analyseproteine wurden mit Ca-HBS (HBS Puffer mit 5 mM CaCl₂) entsalzt und die Proteinbindung wurde bei einer Flußrate von 5 µl/min durchgeführt. Bevor die Proteinproben geladen wurden, wurde der Chip in Ca-HBS Puffer equilibriert, welcher auch als Laufpuffer diente. Aliquots von 40 µl der Proteinprobe wurden mittels KINJECT Option injiziert. Die Regeneration des Sensor Chips erfolgte mit 500 mM NaCl, 20 mM EDTA, 10 mM Glyzin, pH 4,0. Die kinetischen Parameter wurden mittels BIAevaluation 3.0 Software (BIAcore, Schweden) bestimmt. Für den LRP-chip wurde identisch vorgegangen. Die Moleküldichte lag hier bei 19,9 fmol/mm².

2.2.6 Tierversuche

2.2.6.1 Tierhaltung

Die im Rahmen dieser Studie verwendeten Mäuse wurden in klimatisierten Räumlichkeiten untergebracht. Dabei war jeder Käfig mit eigener Frischluftzufuhr versehen. Tag/Nacht-Rhythmus wurde mittels automatischer Lichtregulation auf 12/12 Stunden gehalten, Umschaltzeit war 6 Uhr morgens und 18 Uhr abends. Die Tiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Futter. Die maximale Anzahl der adulten Tiere pro Käfig betrug 6.

Injektionen von Medikamenten wurden intraperitoneal durchgeführt. Die dabei verwendete Konzentration für dDAVP war 10 ng/25 g Körpergewicht.

2.2.6.2 Urinsammlung mittels metabolischer Käfige

Zur Analyse des Mausurins wurde dieser mittels metabolischer Käfige aufgefangen. Die Tiere wurden dazu über Nacht in metabolische Käfige gesetzt, die mit Trinkflasche und Urinauffangbehälter versehen waren. Die Versorgung mit Futter konnte über diesen Zeitraum nicht gewährleistet werden, da es aufgrund des Aufbaus der Käfige zur Vermengung von Urin und Futter gekommen wäre.

2.2.6.3 Blutentnahme an der Maus

Zur retrobulbären Punktierung des Venenplexus wurde die Maus mittels Äther kurzzeitig narkotisiert. Dem narkotisierten Tier wurde eine Hämatokritkapillare oder Pasteurpipette in den Augenwinkel (am Augapfel vorbei) eingeführt und der Venenkomplex im Innern der Augenhöhle angestochen. Das Blut sammelte sich in der Kapillare und konnte so zur Weiterverwendung in andere Gefäße überführt werden. Das entnommene Volumen entsprach etwa 600 µl. Anschließend wurde Zellstoff auf die Wunde aufgedrückt um die Blutung zu stillen und die Einstichstelle zu schließen. Zur Gewinnung von Plasma wurde dem Blut ca. 50 µl Na-EDTA (0,5 M) zugegeben, zur Gewinnung von Serum wurde das Blut kurz geschüttelt und für ca. 15 min bei 4 ° C inkubiert, anschließend erfolgte jeweils eine Zentrifugation über

10 min bei 10000 g. Der Überstand wurde zur Bestimmung von endokrinologischen bzw. physiologischen Werten verwendet, das Pellet verworfen.

2.2.6.4 Blutdruckmessung in Mäusen mittels Telemetrie

Den Tieren (ca. 25-30g) wurde zur telemetrischen Blutdruckmessung eine Sendeeinheit unter Inhalationsnarkose (Isofluran) implantiert. Der Sender wiegt 3,4 Gramm und wurde von den Tieren ohne Komplikationen toleriert. Die Einheit wurde vor der Operation kalibriert. Anschließend wurde unter aseptischen Bedingungen eine Laparotomie vorgenommen und die abdominale Aorta freigelegt. Hierfür wurden die Tiere am Bauch rasiert und anschließend mit Enthaarungscreme enthaart. Während und nach der OP befanden sich die Tiere auf einer Wärmplatte, die die Körpertemperatur konstant hielt. Am Abdomen wurde ein ca. 2-3 cm langer Schnitt gesetzt, die Aorta vom Fett und umgebenden Gewebe freigelegt und von der Vene Cava separiert. Anschließend wurde die Aorta für die Dauer des Senderbefestigens mit einer Klammer versehen. Nach Punktion der Aorta wurde die Spitze des Katheters der Sendereinheit in das Gefäß eingebracht und mit Gewebekleber fixiert. Die Sendereinheit wurde ventral am Peritoneum mit Hilfe einiger Nähte verankert. Während der gesamten OP wurden die Organe mit erwärmter 0,9 % Saline gespült um die Gewebe feucht zu halten. Nach Verifizierung des Funktionierens der Einheit, wurde die abdominale Inzision geschlossen. Anschließend wurden die Tiere in Einzelkäfigen untergebracht und nach einer Rekonvaleszenz- und Akklimatisierungsperiode von 7 Tagen wurde mit den Messungen begonnen. Die Daten wurden mittels Radiosignal vom Sender (in der Maus) an den Empfänger (unterhalb des Käfigs) gesendet und mittels Software (Dataquest A.R.T. systems 1.0) ausgewertet. Alle 5 Minuten wurden für 10 s die Daten aufgenommen. Für die Basiswerte wurde vom 7. bis 9. Tag nach der Operation gemessen. Anschließend wurden die Tiere gedurstet und ebenfalls die Daten gespeichert. Für die Salzdiät wurde den Tieren über 7 Tage die Spezialdiät gefüttert und anschließend gemessen.

2.2.7 Bestimmung endokrinologischer Werte im Plasma und Urin

2.2.7.1 Angiotensinogen, Angiotensin-I, Renin

Die Bestimmungen von Angiotensinogen, Angiotensin-I und Renin wurden von Frau Irene Strauß (MDC-Berlin) durchgeführt und basierten jeweils auf dem kompetitiven „Radioimmunosorbentassay“ (RIA). Das Meßprinzip beruht auf Kompetetion von radioaktiv-markiertem Antigen (Tracer) mit dem jeweiligen natürlichen Antigen bzw. Hormon der Probe (hier: Angiotensinogen bzw. Angiotensin-I oder Renin) um einen im Unterschuß vorliegenden Antikörper, der spezifisch gegen das Antigen gerichtet ist. Dabei wird nach Inkubation (über Nacht, RT) der Probe mit Tris-RIA-Puffer, spezifischem Antiserum und Jod¹²⁵-markiertem Tracer die Radioaktivität der Antikörper-Antigen-Komplexe im Pellet (nach Zentrifugation) bestimmt. Hohe Radioaktivität entspricht einer hohen Tracerbindung am Antikörper, was wiederum geringe Kompetetion bedeutet und somit einer geringen Antigen-(Hormon)-konzentration in der Probe entspricht. Anhand von Standardmaterial und –kurve wurde die genaue Konzentration des Hormons in der Probe berechnet.

2.2.7.2 Bestimmung von Vasopressin im Urin

Die Bestimmung von Vasopressin im Urin erfolgte durch das Labor von Prof. Diederich (Universitätsklinikum „Benjamin Franklin“, Charité, Berlin) und basierte auf dem gleichen Prinzip, wie die Messungen von Angiotensinogen, Angiotensin-I und Renin. Der verwendete Tracer war 3-(J¹²⁵)-Jodotyrosyl-Vasopressin.

2.2.7.3 Bestimmung von Aldosteron im Plasma

Die Messungen von Aldosteron im Plasma wurden durchgeführt von Frau Dr. A. Blottner (Nuklearmedizinische Klinik, Helios-Klinikum, Berlin-Buch) und basierte analog den Angiotensin-I- und Reninmessungen auf einem kompetitiven RIA.

2.2.8 Bestimmung von Ionenkonzentrationen im Serum und im Urin

Die Bestimmungen der Salzkonzentrationen im Serum und Urin erfolgten durch Frau Nernheim im Labor von Dr. D. Becker (Institut für Laboratoriumsdiagnostik, Helios-Klinikum, Berlin-Buch) mit Hilfe eines „Automatic Analyzer Roche/Hitachi 912“ der Firma Hoffmann-La Roche, Mannheim.