

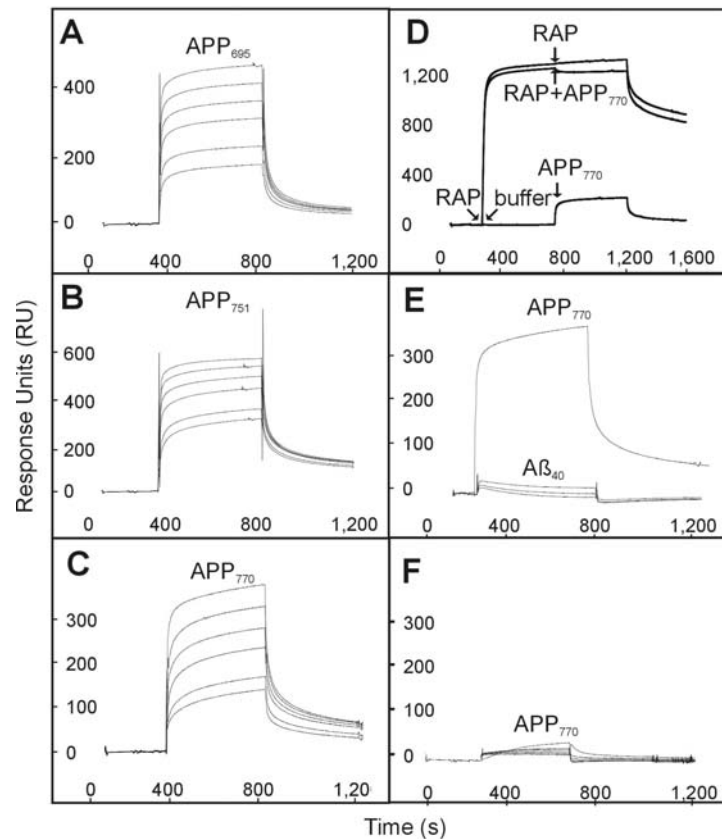
### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Die Interaktion von SorLA mit APP im Gehirn

Um eine mögliche Beteiligung von SorLA an der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen zu erforschen, wurde der Rezeptor hinsichtlich der Interaktion mit dem bei der Alzheimer-Krankheit ursächlich beteiligten APP untersucht. Nachfolgend werden Ergebnisse zur Interaktion von SorLA und APP gezeigt, charakterisiert mittels verschiedener *in vitro*- und *in vivo*-Methoden. Dabei wurden einerseits das Bindeverhalten, die Bindungsstärke, wie auch das Bindeverhältnis der Partner untersucht (3.1.1, 3.1.2). Weiterführend wurden die Lokalisation und Interaktion von APP und SorLA im Zellkulturmodell analysiert (3.1.3, 3.1.4). Es wurde untersucht, welchen Einfluß die Expression von SorLA auf die intrazelluläre Verteilung von APP hat, parallel dazu erfolgte die Analyse der APP-Prozessierung in An- und Abwesenheit von SorLA. Im SorLA-defizienten Mausmodell erfolgte die Untersuchung der SorLA- und APP-Anreicherung in zellulären Kompartimenten, wie auch die Analyse der APP-Prozessierung durch die Bestimmung der Stoffwechselprodukte sAPP und  $\beta$ -Amyloid (3.1.5).

##### 3.1.1 SorLA-APP-Bindungsstudie mittels „Surface Plasmon Resonance“ (SPR)-Analyse

Die SPR-Analyse ist eine Technik, welche die Interaktionen von Molekülen in unmarkierter Form und in Echtzeit mißt. Einer der Interaktionspartner, in diesem Fall die extrazelluläre Domäne von SorLA, wurde auf der Oberfläche des Sensorchips immobilisiert, der zweite Interaktionspartner (extraz. Domäne von APP) wurde in einer Lösung über diesen Sensor geleitet. Die Assoziation, wie auch die Dissoziation wurde über der Zeit bestimmt und in einem Sensogramm dargestellt. Die kinetischen Parameter wurden mit Hilfe der BIAevaluation 3.1 Software ermittelt.



**Abbildung 6 Sensogramme der SPR-Analyse.** Dargestellt ist jeweils die Bindung der extrazellulären Domänen von APP<sub>695</sub> (A), APP<sub>751</sub> (B) und APP<sub>770</sub> (C), in den Konzentrationen von 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 und 5  $\mu\text{M}$ , an der immobilisierten extrazellulären Domäne von SorLA. Die Konkurrenz von RAP und APP<sub>770</sub> um dieselbe Bindungsstelle an SorLA ist dargestellt in D. RAP allein erzielte ein SPR-Signal von ca. 1200 RU, APP<sub>770</sub> allein 370 RU. Die nachträgliche Zugabe von APP<sub>770</sub> auf einen SorLA-Sensor, an dem schon RAP gebunden hatte, erbrachte keine weitere RU-Signalzunahme. Das bedeutet, daß RAP und APP<sub>770</sub> an derselben Domäne innerhalb des Rezeptors binden. Im Vergleich zu APP<sub>770</sub> band  $\beta$ -Amyloid nicht an SorLA (E). Die Bindung von APP<sub>770</sub> an LRP hatte eine deutlich geringerer Affinität als die von APP<sub>770</sub> an SorLA (F im Vergleich zu C).

Die Auswertung der SPR-Daten in Abbildung 6A-C zeigt deutlich, daß SorLA mit den 3 untersuchten APP-Isoformen (APP<sub>695</sub>, APP<sub>751</sub>, APP<sub>770</sub>) interagiert. Die Bindekonstante  $K_D$  lag für alle 3 Isoformen bei 0,2  $\mu\text{M}$ .

Zur näheren Bestimmung der SorLA-Bindungsdomäne wurde RAP verwendet. RAP ist ein Ligand von SorLA, welcher hauptsächlich am CR-Cluster und nur zu einem geringen Teil an der Vps10p-Domäne bindet (Jacobsen et al., 2001). Die Bindung von RAP an SorLA ergab ein Meßsignal von  $\sim 1200$  RU. Wurde nachträglich auf einen SorLA-Sensor, an dem bereits

RAP gebunden war, APP<sub>770</sub> gegeben, so ergab das resultierende Signal  $\sim 1200$  RU (Abbildung 6D). Dies läßt den Schluß zu, daß RAP und APP um die selbe Bindungsdomäne von SorLA konkurrierten. Wäre das resultierende Signal die Summe beider Einzelsignale ( $1200 \text{ RU} + 370 \text{ RU}$ ), so würden beide Proteine an unterschiedlichen Domänen von SorLA binden. Dies läßt den Schluß zu, daß der CR-Cluster die Bindungsstelle für APP ist.

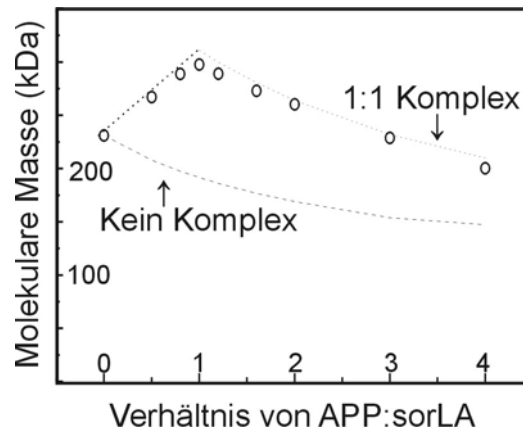
Im Gegensatz zu APP war eine Bindung von  $\beta$ -Amyloid an SorLA nicht nachweisbar (Abbildung 6E).

Um die Interaktion von SorLA und APP mit anderen APP-Partnern zu vergleichen, wurde LRP, ein bekannter APP-Interaktionspartner (Pietrzik et al., 2002, 2004), auf einem SPR-Sensor immobilisiert und die Bindung von APP an LRP untersucht. Die Auswertung der APP-LRP-Interaktion zeigte eine deutlich schwächere Bindung verglichen mit der Bindung von APP an SorLA (Abbildung 6F).

### 3.1.2 Komplexbildung mittels analytischer Ultrazentrifugation

Ausgehend von der mittels SPR-Analyse nachgewiesenen SorLA-APP-Interaktion stellte sich die Frage nach dem stöchiometrischen Verhältnis der Wechselwirkung. Eine traditionelle Methode zur Bestimmung von Molmassen und Molmassenverteilungen in einem Proteingemisch ist die analytische Ultrazentrifugation. Hier wird mit Hilfe der Sedimentations-Equilibrium-Technik das Proteingemisch nach Teilchengröße, -dichte und -form fraktioniert und ermöglicht so Aussagen über die Komplexbildung von, in diesem Fall, SorLA und APP.

Zur Untersuchung der Komplexbildung wurden jeweils die extrazellulären Domänen der Proteine verwendet. In aufsteigend molaren Mengen wurde APP der  $0,1 \mu\text{M}$  SorLA-Lösung zugegeben und die molare Masse des Komplexes in Abhängigkeit vom Verhältnis beider Proteine zueinander bestimmt.



**Abbildung 7** Komplexbildung der extrazellulären Domänen von APP und SorLA mittels analytischer Ultrazentrifugation. Dargestellt ist die gemessene molare Masse des APP-SorLA-Komplexes in Abhängigkeit vom Verhältnis beider Proteine zueinander. Die maximal gemessene molare Masse der Proteinlösung betrug 310 kDa, was einem Komplexverhältnis von 1:1 (APP: SorLA) entsprach. Geringere Massen wurden bei einem Verhältnis von APP zu SorLA  $< 1$  und  $> 1$  gemessen. Der gepunktete Graph entspricht dem theoretischem Verlauf eines 1:1 Komplexes, der gestrichelte Graph entspricht dem Proteinverhalten bei fehlender Komplexbildung.

Die Abbildung 7 stellt das gemessene Molekulargewicht des APP-SorLA-Komplexes in Abhängigkeit vom Verhältnis beider Proteine zueinander dar. Die gemessene molare Masse von 230 kDa entsprach dem Molekulargewicht von SorLA und wurde vor der Zugabe von APP ermittelt. Wurden aufsteigende Konzentrationen von APP<sub>695</sub> (81 kDa) der SorLA-Lösung zutitriert, nahm das gemessene Molekulargewicht aufgrund der Komplexbildung zu und erreichte bei ca. 311 kDa sein Maximum. Dies entsprach einem equimolaren Verhältnis von APP und SorLA (1:1). Zu einer Reduzierung des mittleren Molekulargewichts kam es nach weiterer Zugabe der APP-Domäne (APP: SorLA  $> 1$ ). Dies basiert auf der größeren Menge freier APP-Fragmente, die nun in der Lösung vorlagen, aber mehr an die SorLA-Domäne binden konnte..

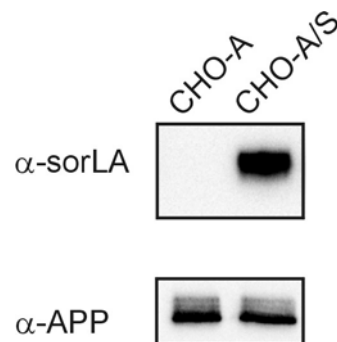
Dieser Versuch bewies die Formierung eines stabilen Komplexes der beiden extrazellulären Domänen bei einem Verhältnis von 1:1 (APP: SorLA).

### 3.1.3 Interaktion von SorLA und APP in CHO-Zellen

Die intrazelluläre Lokalisation sowie Kolo­kalisierung von SorLA und APP, aber auch die Verteilung beider Proteine auf zelluläre Kompartimente war Bestandteil der folgenden Untersuchungen. Diese wurden durchgeführt mit Hilfe eines Zellkulturmodells unter Verwendung von „Chinese hamster ovary“ (CHO)-Zellen.

#### 3.1.3.1 Expression der Proteine in CHO-Zellen

CHO-Zellen, welche die kurze Isoform APP<sub>695</sub> stabil exprimierten, wurden im folgenden CHO-A bezeichnet. Die als CHO-A/S gekennzeichneten Zellen exprimierten neben APP<sub>695</sub> auch SorLA. Die für den Proteinnachweis im Zellysate verwendeten Antikörper waren 6E10 für APP und ein Antiserum, gerichtet gegen den extrazellulären Teil von SorLA.



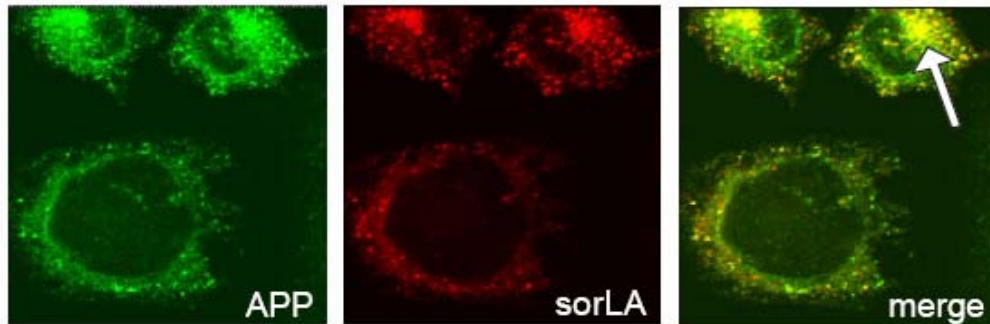
**Abbildung 8** APP-Expression in parental und SorLA-überexprimierender CHO-Zelllinie. Dargestellt im SorLA- und APP-Western Blot ( $\alpha$ -sorLA,  $\alpha$ -APP) ist die jeweilige Proteinmenge der parentalen (CHO-A) und der sowohl für APP als auch für SorLA positiven Zelllinie (CHO-A/S).

Wie in Abbildung 8 zu sehen ist, wurde APP in der parentalen (CHO-A), wie auch in der transfizierten (CHO-A/S) Zelllinie exprimiert ( $\alpha$ -APP). Der SorLA-Rezeptor war nur in der transfizierten Zelllinie zu finden ( $\alpha$ -sorLA). Die Menge an APP war unbeeinflusst von der zusätzlichen Expression von SorLA in den CHO-A/S-Zellen.

#### 3.1.3.2 Kolo­kalisierung von APP und SorLA

Die Untersuchung Immunfluoreszenz-gefärbter Zellen mittels konfokaler Laser-scanning-Mikroskopie läßt Aussagen über die intrazelluläre Lokalisation der Proteine zu.

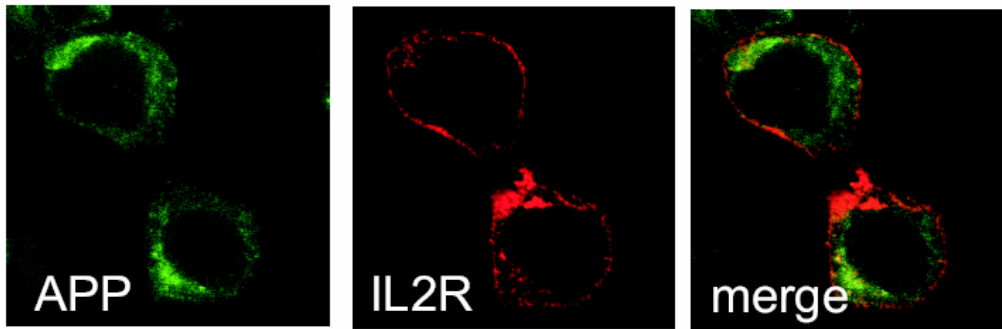
Die hierfür verwendeten CHO-A/S-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät, fixiert und anschließend mit Antikörpern, gerichtet gegen SorLA und APP (siehe 3.1.3.1), inkubiert. Eine Folgeinkubation mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörpern ermöglichte die Analyse der Proteinlokalisierung mit Hilfe konfokaler Laser-scanning-Mikroskopie.



**Abbildung 9** Kolokalisation von APP und SorLA in CHO-A/S-Zellen. Dargestellt ist die APP- (grün) und SorLA-Färbung (rot) in Zellen, die APP und SorLA überexprimieren (CHO-A/S). In der Überlagerung beider Signale (merge) indiziert das resultierende gelbe Signal die Kolokalisation von APP und SorLA. Der überwiegende Teil der Kolokalisation wurde im perinukleären Raum beobachtet (Pfeil).

Wie in Abbildung 9 zu erkennen ist, lokalisierten APP (grün) und SorLA (rot) hauptsächlich im perinukleären Raum und in vesikulären Strukturen der CHO-A/S-Zellen. Deutlich zu erkennen war die Kolokalisation (gelb) beider Proteine in diesen Strukturen.

Um zu zeigen, daß nicht jedes Membranprotein die selbe zelluläre Verteilung aufweist und um daher auszuschließen, daß die Kolokalisationsergebnisse von SorLA und APP artifiziell sind, wurde die CHO-A-Zelllinie mit der cDNA für den Interleukin-2-Rezeptor (IL2R) transfiziert und anschließend die Proteinexpression und -lokalisierung von IL2R und APP untersucht. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 10 dargestellt.



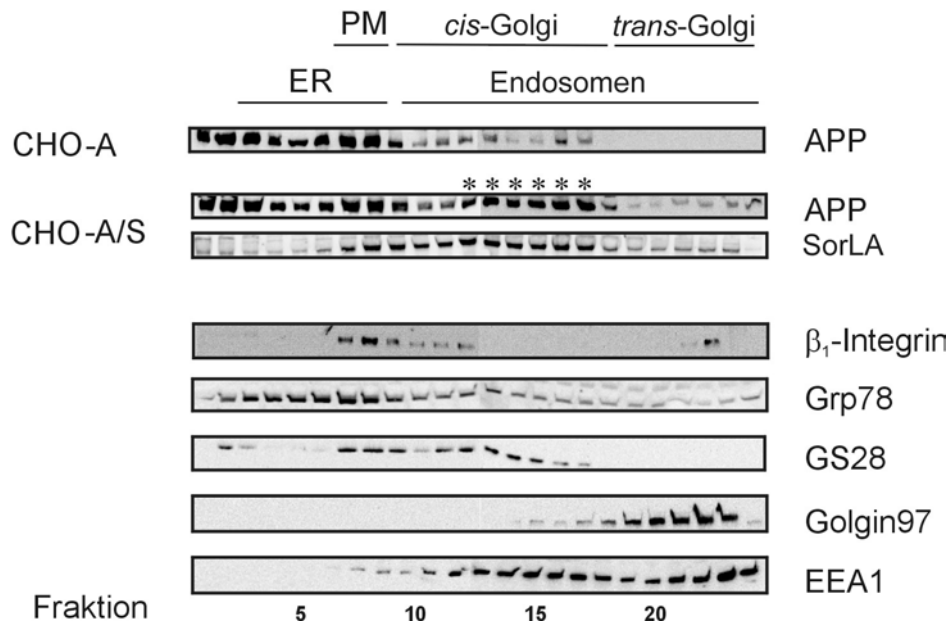
**Abbildung 10 Koexpression des APP und IL2-Rezeptors in CHO-A-Zellen.** Das Fluoreszenzsignal der APP-Färbung (grün) und das der IL2R-Färbung (rot) lag nicht in gleichen zellulären Kompartimenten vor, zu erkennen an der fehlenden Gelbfärbung bei Überlagerung beider Signale (merge).

Das Muster der Färbung des IL-2-Rezeptors (Abbildung 10/IL2R) deckte sich nicht mit dem der APP-Färbung (Abbildung 10/APP). Bei Überlagerung beider Signale war keine Kolokalisation zu beobachten (Abbildung 10/merge). Die Kolokalisation von SorLA und APP in CHO-A/S-Zellen war somit spezifisch.

### 3.1.3.3 Subzelluläre Lokalisation von SorLA und APP

Zur genaueren Bestimmung der Verteilung von SorLA und APP auf zelluläre Kompartimente wurde eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt. Dabei wurden die Zellfragmente basierend auf ihrem Masse- und Dichteverhältnis separiert. Die einzelnen Fraktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot charakterisiert.

Hierfür wurden Antikörper (AK) eingesetzt, die Proteine detektierten, welche in bestimmten Kompartimenten angereichert waren. Verwendet wurden AK gegen das Zellmembranprotein  $\beta_1$ -Integrin zur Markierung der Plasmamembran (PM). AK gegen das „glucose regulated protein“ (Grp78) markierten das endoplasmatische Retikulum (ER). Mit AK gegen den „golgi snap receptor 28“ (GS28) wurden *cis*-Golgi-Vesikel, mit AK gegen das Golgi-Antigen 97 (Golgin97) Vesikel des *trans*-Golgi markiert. AK gegen das frühe endosomale Antigen 1 (EEA1) kennzeichneten frühe Endosomen.



**Abbildung 11 Subzelluläre Fraktionierung der CHO-A- und CHO-A/S-Zellen.** Die subzelluläre Fraktionierung ergab 24 Fraktionen (Fkt.), die verschiedene zelluläre Kompartimente anreicherten. APP lokalisierte in Abwesenheit von SorLA im wesentlichen in Fraktionen, die positiv waren für die Plasmamembran (PM – Fkt. 7, 8) und das endoplasmatische Retikulum (ER – Fkt. 3 - 8), zu geringeren Anteilen in Endosomen- und *cis*-Golgi-reichen Fraktionen (Fkt. 10 – 17). SorLA lokalisierte hauptsächlich in Fraktionen, die neben der Plasmamembran auch endosomale und *cis*-Golgi-Kompartimente anreicherten (Fkt. 7 – 17), geringe Proteinmengen wurden in *trans*-Golgi-Kompartimenten (Fkt. 18 – 23) gefunden. Die Koexpression von APP und SorLA führte zu veränderter APP-Lokalisation (\*). In Gegenwart von SorLA war APP zum großen Teil nachweisbar in SorLA-positiven Fraktionen (Fkt. 12 – 17), das heißt in Fraktionen, die angereichert waren mit *cis*-Golgi und endosomalen Kompartimenten. Die einzelnen Fraktionen wurden durch Antikörper kenntlich gemacht, die gerichtet waren gegen Proteine, welche sich in den jeweiligen Kompartimenten anreicherten.  $\beta_1$ -Integrin markierte die PM, Grp78 das ER, GS28 *cis*-Golgi-Kompartimente, Golgin97 *trans*-Golgi-Kompartimente und EEA1 endosomale Strukturen.

APP-Expression wurde in CHO-A-Zellen hauptsächlich in Fraktionen vorgefunden, die endoplasmatisches Retikulum und Plasmamembran anreicherten (Abbildung 11, Fkt. 1 – 9). Geringere APP-Expression wurde für die Fraktionen 10 – 17 beobachtet. Diese waren charakterisiert durch *cis*-Golgi- und endosomale Vesikel.

SorLA lokalisierte hauptsächlich in den Fraktionen 7 – 17, die bestimmt wurden durch Endosomen und *cis*-Golgi-Vesikel. Geringe Proteinmengen lagen in *trans*-Golgi-reichen Fraktionen vor (Fkt. 18 – 23).



Die Koexpression von SorLA und APP führte in CHO-A/S-Zellen zu veränderter APP-Lokalisation. Ein wesentlich größerer Anteil von APP lag neben der ER- und PM-Fraktion in Fraktionen vor, die positiv für *cis*-Golgi-Vesikel und Endosomen waren (Fkt. 12 – 17).

Da die Gesamtproteinmenge an APP zwischen den beiden Zelllinien nicht variierte (siehe Abbildung 8), kann man von einer intrazellulären Translokation des APP in Gegenwart von SorLA ausgehen. Das bedeutet, daß in Gegenwart von SorLA ein Großteil von APP in die selben Kompartimente transportiert wird, in denen SorLA vorliegt.

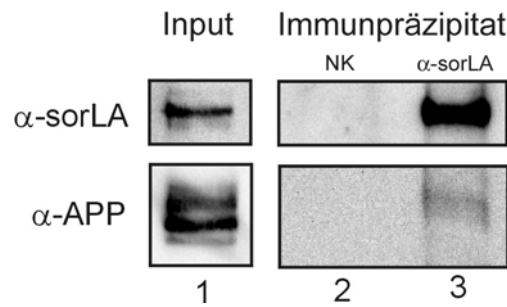
### **3.1.4 Interaktion von SorLA und APP in SH-SY5Y-Zellen**

Um die Prozessierung von APP und die Bildung der Prozessierungsprodukte (sAPP $\alpha/\beta$ ,  $\beta$ -Amyloid) in An- und Abwesenheit von SorLA zu untersuchen, wurde die humane Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y gewählt. Neurone gelten als primäre Quelle für  $\beta$ -Amyloid und bieten somit ein Modell, in dem überwiegend pathophysiologische APP-Prozessierung stattfindet. Diese Zelllinie exprimiert endogen APP<sub>770</sub>, APP<sub>751</sub>, APP<sub>695</sub> und SorLA.

#### **3.1.4.1 Koimmunpräzipitation von SorLA und APP**

Die Koimmunpräzipitation von SorLA und APP sollte Aufschluß darüber geben, ob beide Proteine in diesen Zellen miteinander interagieren und einen Komplex bilden.

Für die Koimmunpräzipitation wurden die SH-SY5Y-Zellen mit einem membranpermeablen Vernetzer inkubiert. Dies erfolgte zum einen, um nur echte Interaktionen der intakten Zellen zu fixieren, zum anderen, um die Proteinkomplexe für die Prozedur der Koimmunpräzipitation zu stabilisieren. Die Detektion von APP und SorLA im Ausgangsmaterial und den Präzipitaten erfolgte mittels Western Blot-Analyse. Die verwendeten Antikörper entsprechen denen aus 3.1.3.1.



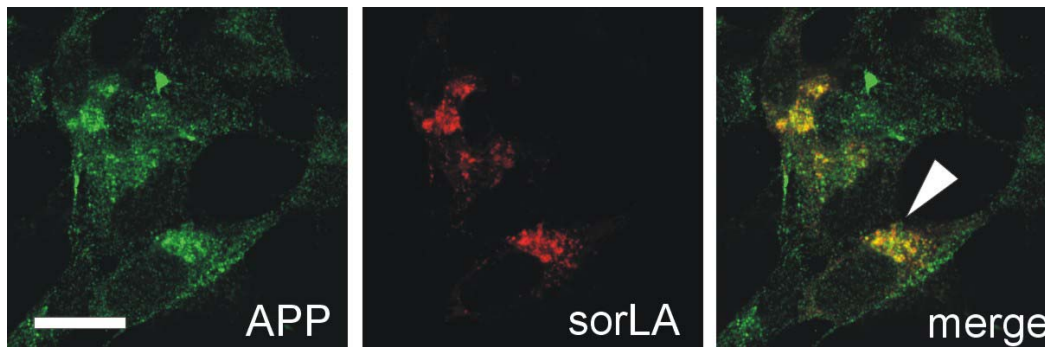
**Abbildung 12 Koimmunpräzipitation von SorLA und APP in SH-SY5Y-Zellen.** Der Nachweis der Proteine im Ausgangsmaterial (Input) ist dargestellt als  $\alpha$ -sorLA und  $\alpha$ -APP in Spalte 1. Das mittels SorLA-Antiserum (Immunpräzipitat,  $\alpha$ -sorLA) präzipitierte SorLA und das daran gebundene APP ist abgebildet in Spalte 3. Weder SorLA noch APP wurde in der Kontrolle (NK) präzipitiert (Spalte 2), in der die Lysat-Sepharose-Inkubation ohne Antikörper erfolgte.

Die Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der Koimmunpräzipitation von APP und SorLA. Die Spalte 1 (Input) bestätigte beide Proteine im verwendeten Zellysat, dem Ausgangsmaterial. Weder SorLA noch APP wurden nach Inkubation mit dem Säulenmaterial ohne Antikörper (Spalte 2) detektiert. APP ließ sich hingegen als SorLA-APP-Komplex über das SorLA-Antiserum an der Säule präzipitieren (Spalte 3).

Man kann davon ausgehen, daß SorLA und APP intrazellulär räumlich dicht beieinander lagen, da der Vernetzer eine Spannweite von nur 12 Å besitzt.

#### 3.1.4.2 APP- und SorLA-Lokalisation mittels Immunfluoreszenz

Um die Lokalisation von APP und SorLA in SH-SY5Y-Zellen mittels Laser-Scanning-Mikroskopie zu untersuchen, wurden die Zellen mit der SorLA-cDNA transfiziert und als SY5Y-S bezeichnet. Dies war notwendig, da das endogene SorLA-Expressionsniveau für die Immunfluoreszenz zu gering war. Die Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät, fixiert und anschließend mit den entsprechenden Antikörpern (siehe 3.1.3.1) inkubiert. Die Bilder wurden mittels konfokaler Laser-scanning-Mikroskopie aufgenommen.

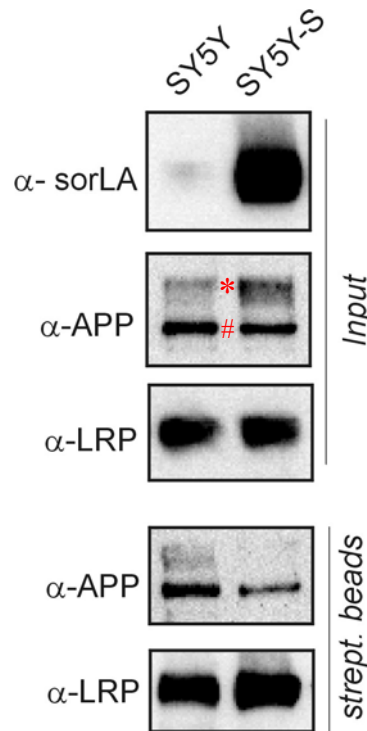


**Abbildung 13** Kolokalisation von APP und SorLA in SY5Y-S-Zellen. APP (grün) und SorLA (rot) kolokalisierten zum größten Teil in perinukleären Kompartimenten (Pfeilspitze), zu erkennen am resultierenden Signal (gelb) als Überlagerung beider Signale (merge).

Die Abbildung 13 zeigt das Immunfluoreszenzbild der SY5Y-S-Zellen, wobei APP in grün und SorLA in rot dargestellt ist. APP lokalisierte intrazellulär in der perinukleären Region, wie auch in vesikulären Strukturen. SorLA kolokalisierte mit APP hauptsächlich in den perinukleären Strukturen, deutlich zu erkennen an der resultierenden Farbe (gelb) bei Überlagerung beider Einzelsignale (merge). Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß APP und SorLA – wie auch schon für die CHO-A/S-Zelllinie gezeigt (Abbildung 9) – in vesikulären und perinukleären Strukturen vorlagen. Dabei kolokalisierten beide Proteine hauptsächlich im perinukleären Bereich.

#### 3.1.4.3 Einfluß von SorLA auf APP-Lokalisation mittels Zellmembranbiotinylierung

Durch die Markierung zellmembranständiger Proteine mit Biotin können diese anschließend an einer Streptavidin-Säule präzipitiert werden. Diese Methode hilft bei der Trennung der Zelloberflächenproteine von intrazellulären Proteinen und ermöglicht so die Analyse der membranständigen Proteinfractionen im Vergleich zur Gesamtproteinmenge. Mittels Biotinylierung und Detektion der Zellmembranproteine sollte die Verteilung von APP in Abhängigkeit von SorLA analysiert werden. Die für die Detektion verwendeten Antikörper entsprechen denen aus 3.1.3.1 für SorLA und APP. Für LRP wurde ein Kaninchenserum verwendet, welches gegen die extrazelluläre Domäne gerichtet ist.



**Abbildung 14 Zelloberflächenbiotinylierung der SY5Y- und SY5Y-S-Zellen.** Die SorLA-Expression ( $\alpha$ -sorLA) wurde im Ausgangsmaterial/Zellysat (Input) der SorLA-überexprimierenden (SY5Y-S) Zelllinie nachgewiesen, die APP-Expression ( $\alpha$ -APP) wurde für die SY5Y- und SY5Y-S-Zellen belegt. Die Expression von SorLA führte in diesen Zellen zur verstärkten Bildung des glykosylierten APP (\*), bei unveränderter Menge an nicht-glykosyliertem APP (#). Das an der Streptavidin-Säule präzipitierte Biotin-markierte APP, welches der Zelloberflächen-APP Fraktion entspricht, ist dargestellt im unteren Bildausschnitt ( $\alpha$ -APP/strept. beads) und war deutlich stärker in der parentalen als in der SorLA-überexprimierenden Zelllinie vertreten. Als Kontrollprotein wurde endogenes LRP ( $\alpha$ -LRP) im Zellysat (Input) wie auch im Präzipitat (strept. beads) detektiert. Eine veränderte LRP-Expression, hervorgerufen durch die SorLA-Überexpression, wurde nicht beobachtet.

Die in Abbildung 14 als Input gekennzeichneten Banden stellen den Nachweis der Proteine im eingesetzten Zellysat dar. Hierbei war SorLA deutlich stärker in der Zelllinie nachweisbar, die das SorLA-Konstrukt überexprimierte ( $\alpha$ -SorLA, Input). APP ließ sich sowohl in der parentalen (SY5Y) als auch in der SorLA-überexprimierenden Zelllinie (SY5Y-S) nachweisen ( $\alpha$ -APP, Input). Dabei wurde festgestellt, daß durch die Expression von SorLA die APP-Bande mit dem größeren Molekulargewicht, welche dem glykosylierten APP (reifes APP) entsprach, in den SY5Y-S- viel stärker als in den parentalen Zellen exprimiert war (Abbildung 14/\*). Unverändert zwischen den Zelllinien war die Menge des nicht-glykosylieren APP (unreifes APP, Abbildung 14/#).

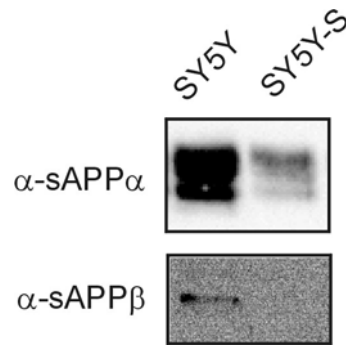
Das Eluat der Streptavidin-Säule und damit die zellmembranständige APP-Fraktion war in der SY5Y-S-Zelllinie schwächer als in der parentalen ( $\alpha$ -APP, strept. beads) vertreten. Dieser Effekt wurde sowohl für das reife APP als auch für das nicht-glykosylierte APP (unreifes APP) beobachtet. Der Unterschied wurde densitometrisch quantifiziert und entsprach einer Reduktion des Signals um 64,2 % ( $\pm$  3,2 %) in der SY5Y-S-Linie im Vergleich zu den parentalen Zellen (100 %).

Der für APP beobachtete und durch SorLA-Überexpression verursachte Effekt war spezifisch, da dieser bei dem untersuchten Kontrollprotein LRP nicht beobachtet wurde ( $\alpha$ -LRP, Input, strept. beads).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß SorLA wesentlich die zelluläre Verteilung des Alzheimer-Proteins beeinflusste. Zum einen wurde beobachtet, daß SorLA die Reifung bzw. Glykosylierung von APP begünstigte oder das reife APP stabilisierte. Zum anderen wurde nachgewiesen, daß SorLA die Verteilung von APP dahingehend beeinflusste, daß weniger APP an der Zellmembran vorlag.

#### **3.1.4.4 Die Bildung von sAPP $\alpha$ / $\beta$ und $\beta$ -Amyloid unter Einfluß von SorLA**

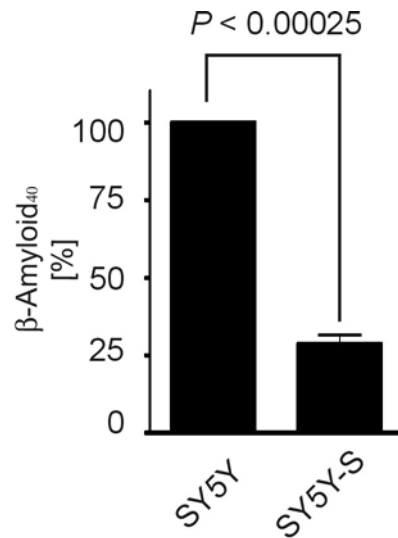
Zur Untersuchung einer möglichen Veränderung der APP-Prozessierung bei An- und Abwesenheit von SorLA wurden die Stoffwechselzwischen- und Endprodukte der APP-Prozessierung bestimmt (siehe Abbildung 5). Hierfür wurde das Zellmedium der SY5Y- und SY5Y-S-Zellen über 48 Stunden gesammelt, aufkonzentriert und mittels Western Blot bzw. „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) hinsichtlich des sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$  und  $\beta$ -Amyloid analysiert. Der verwendete Antikörper gerichtet gegen sAPP $\alpha$  war 6E10, der gegen sAPP $\beta$  war 192.



**Abbildung 15** sAPP $\alpha$  und sAPP $\beta$  im Medium der SY5Y- und SY5Y-S-Zellen. Dargestellt ist die Menge an sAPP $\alpha$  und sAPP $\beta$  im Medium der parentalen (SY5Y) und SorLA-überexprimierenden Zelllinie (SY5Y-S). Deutlich mehr sAPP $\alpha$  und sAPP $\beta$  lagen in der parentalen Linie im Vergleich zur SY5Y-S-Linie vor.

Die Abbildung 15 stellt die Menge an sAPP $\alpha$  und sAPP $\beta$  dar, die mittels Western Blot im Zellmedium nachgewiesen wurde. Dabei war zu erkennen, daß sowohl die Menge an sAPP $\alpha$  als auch die Menge an sAPP $\beta$  durch die Expression von SorLA drastisch reduziert wurde (SY5Y-S). Offensichtlich verhinderte SorLA die Proteolyse von APP durch die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase und minimierte somit die Menge an APP, welche sowohl in den nicht-amyloidogenen wie auch den amyloidogenen Stoffwechselweg überging (siehe Abbildung 5).

Dieses Resultat wurde untermauert durch die Bestimmung des A $\beta$ -Peptids im Medium (Abbildung 16).  $\beta$ -Amyloid entsteht nach enzymatischer Spaltung des C99 oder auch CTF $\beta$  durch die  $\gamma$ -Sekretase.



**Abbildung 16  $\beta$ -Amyloid<sub>40</sub> im Medium der SY5Y- und SY5Y-S-Zellen.** Abgebildet ist die Menge an  $\beta$ -Amyloid<sub>40</sub> im Medium der parentalen (SY5Y) und SorLA-überexprimierenden (SY5Y-S) Zellen. Dabei wurde deutlich, daß SorLA die Menge des Peptids auf 28,3 % ( $\pm$  3 % SEM), im Vergleich zur parentalen Linie, reduzieren konnte ( $p < 0,00025$ , Student's T-Test).

Die Abbildung 16 stellt die Menge des mittels ELISA detektierten  $A\beta_{40}$ -Peptids im Zellmedium der parentalen und SorLA-überexprimierenden Zelllinie dar. Hierbei ergab sich eine deutliche Reduzierung der  $A\beta_{40}$ -Menge auf 28,3 % ( $\pm$  3 % SEM) in den SorLA-überexprimierenden Zellen gegenüber den parentalen Zellen (100 %).

Dieses Ergebnis bestätigte die Daten der sAPP $\alpha/\beta$ -Messungen. SorLA reduzierte die Verstoffwechslung von APP durch die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen und verringerte damit die Bildung von sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$  und  $A\beta_{40}$ .

### 3.1.5 SorLA- und APP-Interaktion im Mausmodell

#### 3.1.5.1 Charakterisierung der SorLA-defizienten Maus

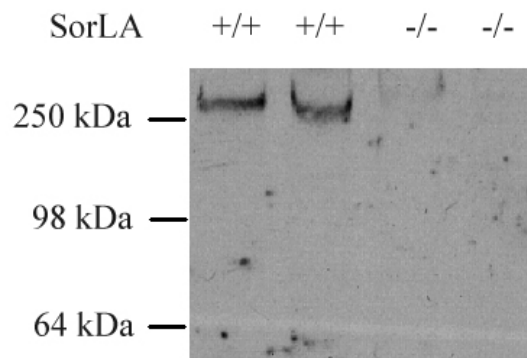
Unter Verwendung eines Mausmodells, in dem das SorLA-Gen (*sorLA*) durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen inaktiviert wurde, konnte die Auswirkung von SorLA auf das Alzheimer-Protein *in vivo* untersucht werden. Das Mausmodell wurde von der

Arbeitsgruppe Willnow (MDC, Berlin) erstellt. Dabei wurde ein Resistenzgen für die Neomycin-Phosphotransferase ins Exon 4 des murinen *sorLA*-Gens eingebracht, was zur fast vollständigen Entfernung der Sequenzen des Exons 4 führte. Das Mausmodell wird im folgenden Abschnitt kurz charakterisiert.

### 3.1.5.2 SorLA-Expression in der Wildtyp- und SorLA-defizienten Maus

Die SorLA-defiziente Maus (*sorLA*<sup>-/-</sup>) war fertil, entwickelte sich normal und war ohne offensichtlichen Phänotyp. Zum Nachweis der fehlenden SorLA-Expression in der Maus wurde das Gehirn mittels Western Blot und Immunhistologie untersucht.

Für die Proteinanalyse wurde Hirnmaterial der Maus verwendet und im Western Blot mit Antikörpern, gerichtet gegen die extrazelluläre Domäne von SorLA, detektiert.



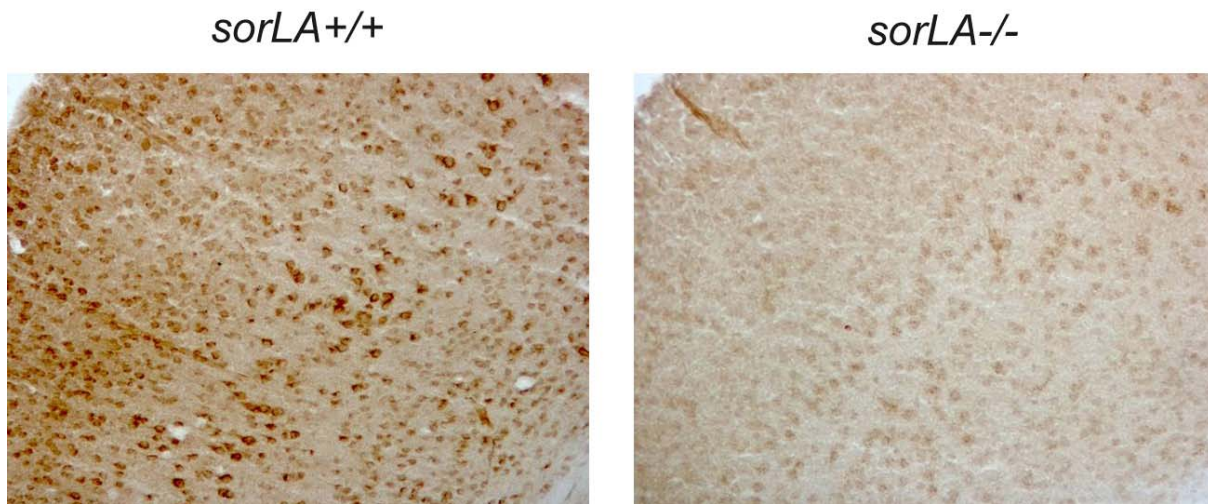
**Abbildung 17 SorLA-Expression im Gehirn der Wildtyp- und SorLA-defizienten Tiere.** Je 2 Wildtyp- (*sorLA*<sup>+/+</sup>) und Gen-defiziente (*sorLA*<sup>-/-</sup>) Tiere wurden mittels Western Blot hinsichtlich SorLA-Expression im Gehirn untersucht. SorLA, mit einem Molekulargewicht von 250 kDa, konnte in den Kontrolltieren nachgewiesen werden, nicht aber in den *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tieren.

Wie in der Western Blot-Analyse (Abbildung 17) zu erkennen ist, ließ sich das SorLA-Protein in den Wildtyp-Tieren (*sorLA*<sup>+/+</sup>) bei einem Molekulargewicht von 250 kDa nachweisen. Es ließ sich keine Proteinbande mit der entsprechenden Größe in den SorLA-defizienten Mäusen (*sorLA*<sup>-/-</sup>) nachweisen.

Dieser Versuch belegte den vollständigen Verlust der SorLA-Expression in homozygoten SorLA-defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren.



Für die immunhistologische Untersuchung wurden von Gehirnen der Mäuse Paraffinschnitte angefertigt und diese mittels immunhistologischer Färbung auf SorLA-Expression hin untersucht. Das verwendete Antiserum war gegen die extrazelluläre Domäne von SorLA gerichtet.



**Abbildung 18** Immunhistologische Färbung von SorLA im Gehirn der *sorLA*<sup>+/+</sup>- und *sorLA*<sup>-/-</sup>-Maus. Mittels Immunhistologie wurde SorLA im frontalen Kortex der Wildtyp-Maus nachgewiesen. Das Gendefiziente Tier wies keine SorLA-Färbung auf.

Die Abbildung 18 stellt die immunhistologische Färbung von SorLA im frontalen Kortex der *sorLA*<sup>+/+</sup>- und *sorLA*<sup>-/-</sup>-Mäuse dar. Deutlich zu erkennen war die SorLA-Expression in einem Großteil der abgebildeten Zellen im Wildtyp. Keine Färbung ließ sich im Gehirn des SorLA-defizienten Tieres nachweisen.

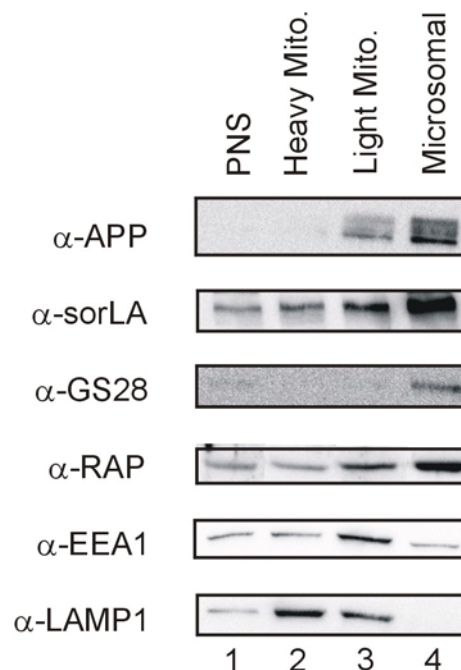
### 3.1.5.3 Subzelluläre Fraktionierung von SorLA und APP im Mausgehirn

Ausgehend von den Zellkulturstudien über die Interaktion von SorLA und APP, sollten die Daten *in vivo* mit Hilfe der SorLA-defizienten Maus verifiziert werden. Ziel dieser Untersuchung war die Zuordnung von SorLA und APP zu den entsprechenden zellulären Kompartimenten. Dies geschah durch subzelluläre Fraktionierung über differentielle

Gradientenzentrifugation und anschließender Charakterisierung der einzelnen Fraktionen mit Hilfe von Markerproteinen in der Western Blot-Analyse.

Hirnmateriale aus *sorLA*<sup>+/+</sup>-Tieren wurde homogenisiert, in mehreren Zentrifugationsschritten separiert und anschließend mittels Western Blot analysiert.

Die einzelnen Fraktionen ließen sich mit Hilfe von Antikörpern gegen Markerproteine charakterisieren (Abbildung 19). Die postnukleäre Fraktion (PNS) kennzeichnet das Ausgangsmaterial nach Sedimentation von Zellkernen und –bruchstücken. Die mikrosomale Fraktion war gekennzeichnet durch die Aufkonzentrierung des Markers für ein *cis*-Golgi-Protein (GS28). Der Antikörper gegen RAP (RAP) zeigte Fraktionen auf, in denen sich Proteine aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) konzentrierten. Dies war der Fall für die leichte mitochondriale und mikrosomale Fraktion. Endosomen, nachgewiesen mit einem Antikörper gegen „early endosomal antigen 1“ (EEA1), lagen hauptsächlich in der leichten mitochondrialen Fraktion vor. Lysosomen, markiert durch einen Antikörper gegen das „lysosomal associated membrane protein 1“ (LAMP1), sedimentierten nach der zweiten und dritten Zentrifugation und lagen somit in der schweren und leichten mitochondrialen Fraktion vor.



**Abbildung 19** Subzelluläre Fraktionierung von Mausgehirnen durch differentielle Gradientenzentrifugation. Die Fraktionen 1 - 4 waren gekennzeichnet durch Anreicherung verschiedener zellulärer Kompartimente. Die postnukleäre Fraktion (1, PNS) stellt das Ausgangsmaterial dar, nach

Sedimentation von Zellkernen, Zellbruchstücken und noch intakten Zellen. Da hier noch keine Anreicherung stattfindet, waren alle verwendeten Markerproteine und SorLA hier nur in geringen Konzentrationen nachgewiesen worden. Die Menge an APP lag unterhalb der Detektionsgrenze und konnte in der PNS nicht nachgewiesen werden. In der 2. Fraktion konzentrierten sich Lysosomen, zu erkennen an dem starken Markersignal für Lysosomen ( $\alpha$ -LAMP1). Darüber hinaus reicherten sich in dieser Fraktion auch Endosomen und Vesikel des endoplasmatischen Retikulums (ER) an, verdeutlicht durch die entsprechenden Markerproteine ( $\alpha$ -EEA1 und  $\alpha$ -RAP). In der 3. Fraktion reicherten sich hauptsächlich Endosomen an ( $\alpha$ -EEA1), aber auch Lysosomen und Vesikel des ER waren hier stark vertreten. In der 4. Fraktion lagen hauptsächlich Vesikel des *cis*-Golgi ( $\alpha$ -GS28) und des ER vor, zum geringen Teil auch Endosomen. APP ließ sich vorwiegend in der 4. Fraktion und in etwas geringeren Mengen in der 3. Fraktion nachweisen. Das heißt, APP lag vorwiegend in *cis*-Golgi-Vesikeln, im ER und in Endosomen vor. SorLA wies den selben Trend auf, wurde aber darüber hinaus auch in der 2., der Lysosomen-reichen Fraktion nachgewiesen.

Sowohl SorLA ( $\alpha$ -sorLA) als auch APP ( $\alpha$ -APP) lagen am stärksten in der mikrosomalen Fraktion vor, gefolgt von der leichten mitochondrialen Fraktion (Abbildung 19). Diese Fraktionen reicherten im wesentlichen ER-, *cis*-Golgi- und endosomale Vesikel an. In geringeren Mengen wurde SorLA in der schweren mitochondrialen Fraktion nachgewiesen, die geprägt ist durch lysosomale Vesikel.

Im Ergebnis dieses Versuchs konnte gezeigt werden, daß APP und SorLA *in vivo* mehrheitlich in gleichen Fraktionen und somit in gleichen Kompartimenten lokalisierten. Dieser Versuch bestätigte die Daten der Zellkulturstudien in CHO- und SH-SY5Y-Zellen.

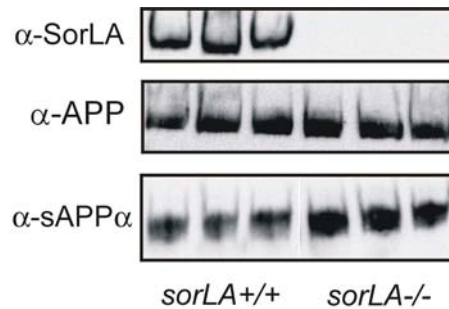
#### 3.1.5.4 Die Bildung von sAPP und $\beta$ -Amyloid im Mausgehirn

Die Ergebnisse der Zellkulturuntersuchungen konnten zeigen, daß SorLA *in vitro* die Prozessierung von APP dahingehend beeinflusste, daß weniger sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$  und weniger  $\beta$ -Amyloid<sub>40</sub> gebildet wurde (3.1.4.4). Es stellte sich daher die Frage, inwiefern SorLA auch die APP-Prozessierung *in vivo* beeinflusst.

Zur Untersuchung einer eventuell unterschiedlichen Prozessierung von APP in An- und Abwesenheit von SorLA wurden die löslichen APP-Varianten (sAPP) mittels Western Blot in Wildtyp- und SorLA-defizienten Mäusen analysiert. In Ermangelung qualitativ hochwertiger Antikörper gegen das murine sAPP $\beta$  konnte daher nur das sAPP $\alpha$ -Fragment detektiert

werden, welches durch die proteolytische Wirkung der  $\alpha$ -Sekretase entsteht (siehe Abbildung 5).

Material aus Gehirnen der  $sorLA^{-/-}$ - und  $sorLA^{+/+}$ -Tiere wurde homogenisiert und mit einem Antikörper, der gegen sAPP $\alpha$  gerichtet ist, mittels Western Blot analysiert.

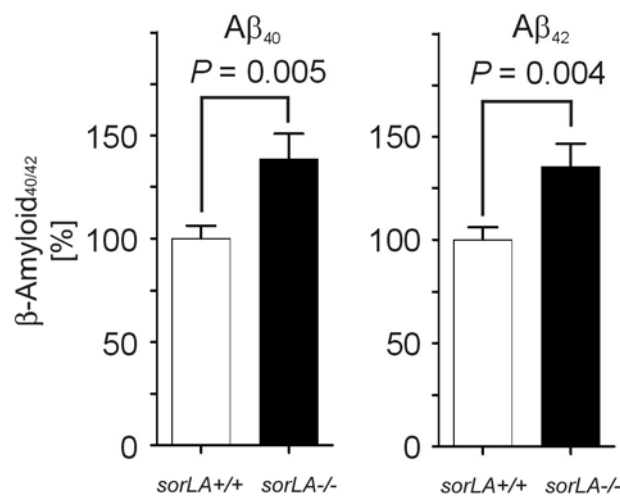


**Abbildung 20** sAPP $\alpha$  im Gehirn von  $sorLA^{+/+}$ - und  $sorLA^{-/-}$ -Mäusen. Deutliche Unterschiede wurden für sAPP $\alpha$  ( $\alpha$ -sAPP $\alpha$ ) zwischen den  $sorLA^{+/+}$ - und  $sorLA^{-/-}$ -Tieren beobachtet. SorLA-defiziente Mäuse wiesen weitaus mehr sAPP $\alpha$  auf als die Kontrolltiere. Die Menge an APP ( $\alpha$ -APP) variierte hingegen nicht.

Wie in Abbildung 20 zu erkennen ist, unterschied sich die Menge des APP im Gehirn nicht zwischen den  $sorLA^{+/+}$ - und  $sorLA^{-/-}$ -Mäusen ( $\alpha$ -APP). Betrachtet man aber die lösliche APP-Variante nach Spaltung durch die  $\alpha$ -Sekretase, so war in  $sorLA^{-/-}$ -Tieren deutlich mehr sAPP $\alpha$  als in  $sorLA^{+/+}$ -Tieren zu verzeichnen ( $\alpha$ -sAPP $\alpha$ ).

Offensichtlich beeinflusst SorLA auch *in vivo* die Prozessierung von APP über den nicht-amyloidogenen Weg, da bei unveränderter APP-Expression die Menge an sAPP $\alpha$  in SorLA-defizienten Tieren deutlich höher war.

Die Untersuchung der Prozessierung von APP über den amyloidogenen Weg erfolgte durch Messung des  $\beta$ -Amyloidpeptids im Gehirn der Maus. Für diese Messung wurden die Lysate von  $sorLA^{+/+}$ - und  $sorLA^{-/-}$ -Gehirnen mittels ELISA auf die Menge an  $\beta$ -Amyloid<sub>40</sub> und <sub>42</sub> hin untersucht. Diese Messungen wurden durchgeführt durch das Labor von Steven M. Paul (Lilly Research Laboratories, Indianapolis, USA).

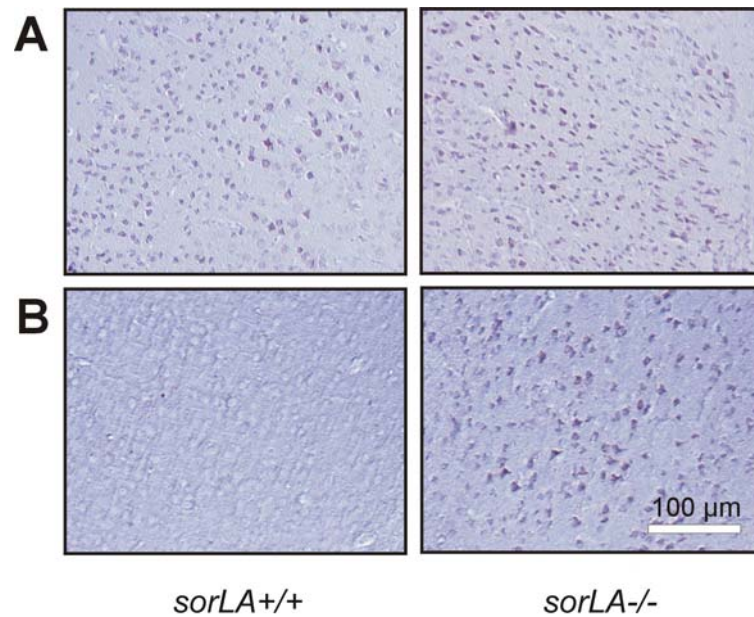


**Abbildung 21**  $\beta$ -Amyloid<sub>40/42</sub>-Messungen im Gehirn von *sorLA*<sup>+/+</sup>- und *sorLA*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Bestimmung des  $\beta$ -Amyloid<sub>40</sub> ergab eine Zunahme um 38,6 % (SEM  $\pm$  12,28 %,  $p = 0,005$ ) im Kortex von SorLA-defizienten Tieren gegenüber den Kontrolltieren (auf 100 % gesetzt). Die Menge an  $\beta$ -Amyloid<sub>42</sub> war in *sorLA*<sup>-/-</sup>-Mäusen gegenüber den Kontrolltieren um 35,6 % (SEM  $\pm$  11,05 %,  $p = 0,004$ ) gestiegen.

Die in Abbildung 21 dargestellten Diagramme zeigen die Ergebnisse der  $\beta$ -Amyloid-Messungen im Kortex der Mausgehirne. Sowohl für das 40er- als auch für das 42er- $\beta$ -Amyloid wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen gemessen. Die Werte der Kontrolltiere wurden auf 100 % gesetzt. In den *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tieren ließ sich für  $\beta$ -Amyloid<sub>40</sub> ein Wert von 138,6 % (SEM  $\pm$  12,28 %,  $p = 0,005$ ) und für  $\beta$ -Amyloid<sub>42</sub> ein Wert von 135,6 % (SEM  $\pm$  11,05 %,  $p = 0,004$ ) messen.

SorLA-defiziente Mäuse prozessieren APP deutlich stärker zu  $\beta$ -Amyloid<sub>40</sub> und -<sub>42</sub> als Kontrolltiere.

Zur Verifizierung dieser Daten wurden mittels Immunhistologie die Mengen an APP und  $\beta$ -Amyloid auf murinen Gehirnschnitten nachgewiesen. Für die APP-Detektion wurde ein Antikörper verwendet, der gegen den c-terminalen Bereich dieses Proteins gerichtet war (CT695), für die  $\beta$ -Amyloid-Färbung wurde ein monoklonaler Antikörper (4G8) verwendet.



**Abbildung 22 Immunhistologische Färbung von APP und  $\beta$ -Amyloid auf Schnitten des Mausgehirns.** Die APP-Färbung (A) unterschied sich nicht zwischen dem Kontroll- und dem SorLA-defizienten Tier.  $\beta$ -Amyloid (B) wurde kaum in der *sorLA*<sup>+/+</sup>-Maus detektiert, deutlich mehr Peptid wurde in der *sorLA*<sup>-/-</sup>-Maus nachgewiesen.

Die Abbildung 22 zeigt die immunhistologische Untersuchung bezüglich des APP- und  $\beta$ -Amyloidgehalts im Gehirn einer *sorLA*<sup>-/-</sup>-Maus und eines Kontrolltiers. Die Immunfärbung für APP (A) zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Tieren. Deutlich mehr  $\beta$ -Amyloid wurde auf dem Gehirnschnitt des *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tieres gegenüber dem des Kontrolltieres nachgewiesen (B).

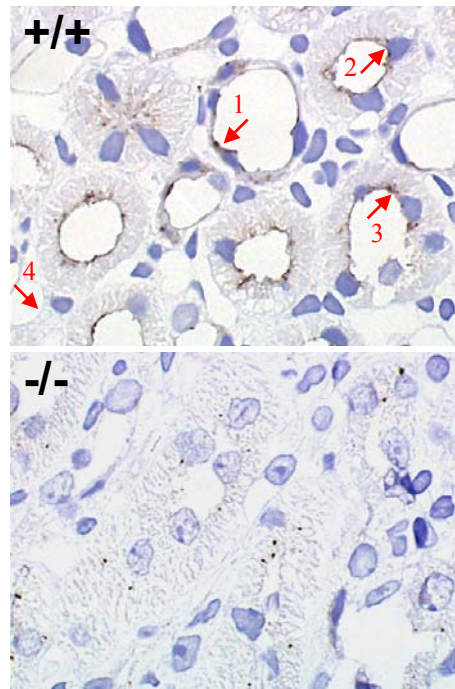
Die Ergebnisse der Untersuchungen der APP-Stoffwechselprodukte in Wildtyp- und SorLA-defizienten Mäusen bestätigten die Daten der Zellkulturstudien. Es konnte sowohl im Zellkulturmodell als auch am Tiermodell gezeigt werden, daß die Abwesenheit von SorLA zu verstärkter Prozessierung von APP über den amyloidogenen und nicht-amyloidogenen Stoffwechselweg führte.

## **3.2 Die Funktion von SorLA in der Mausniere**

Im zweiten Teil meiner Dissertation wurde die Funktion von SorLA in der Niere der Maus analysiert. Bereits 1997 belegten Mörwald et al. mittels Northern Blot-Technik eine sehr hohe Expression von *sorLA* in der Niere. 2002 beschrieben Riedel et al. die Expression des Proteins im Sammelrohr der Niere. Bisher gab es keine weiterführenden Analysen bezüglich der physiologischen Funktion von SorLA in der Niere. Es stellte sich die Frage, ob SorLA neben dem Sammelrohr auch in weiteren Segmenten der Niere exprimiert wird und ob SorLA in der Niere eine ähnliche Protein-sortierende Funktion ausübt, wie für APP im Gehirn und daher bei renalen Transportprozessen essentiell ist. Um diese Frage zu beantworten, wurden Analysen am Tiermodell der SorLA-defizienten Maus im Vergleich zur Wildtypmaus erstellt. Untersuchungen des Expressionsprofils (3.2.1), der physiologischen und endokrinologischen Blut- und Urinwerte (3.2.2, 3.2.4) sowie Blutdruckmessungen (3.2.5) wurden durchgeführt.

### **3.2.1 SorLA-Expressionsprofil in der Niere**

Um das Expressionsprofil von SorLA in der Niere näher zu bestimmen, wurden Paraffinschnitte von Nieren der Wildtyp- und SorLA-defizienten Maus mit dem Antiserum gegen SorLA gefärbt.



**Abbildung 23 Immunhistologische Färbung von SorLA in der Niere der Wildtyp- (+/+) und SorLA-defizienten (-/-) Maus.** SorLA-positive Segmente in der Wildtypmaus waren Sammelrohr (1) und distale Tubuli (2, 3), zu erkennen am fehlenden Bürstensaum und den schmalen Zellen des Sammelrohrs bzw. an der geringen Ausbildung des Bürstensaums der etwas breiteren Zellen der distalen Segmente. Negativ für die SorLA-Färbung war der proximale Tubulus (4), charakterisiert durch einen deutlichen Bürstensaum und breite Tubuluszellen. Die Untersuchung der SorLA-defizienten Maus ergab kein Signal auf dem Nierenschnitt.

Die Abbildung 23 zeigt die immunhistologische Färbung von SorLA in der Mausniere. Im Kontrolltier (+/+) war SorLA im Sammelrohr (1) und in distalen Segmenten der Niere (2, 3) exprimiert. Die distalen Segmente waren durch einen kleinen Bürstensaum an der apikalen Oberfläche der Tubuluszellen charakterisiert. Das Sammelrohr zeichnete sich aus durch das Fehlen des Bürstensaums, sowie durch seine deutlich schmalere Zellen. Keine Färbung war im proximalen Tubulus (4) zu finden, der einen großen, dichten apikalen Bürstensaum aufwies. Darüber hinaus war die Lokalisation des SorLA-Rezeptors zu erkennen. Der Rezeptor war in der Niere hauptsächlich an der apikalen Membran (1, 2, 3) lokalisiert. Es wurde keine Färbung an der basolateralen Membran detektiert. Im Sammelrohr (1) hingegen deutete sich auch eine perinukleäre Färbung ab. In der Niere der *sorLA*<sup>-/-</sup>-Maus (-/-) fehlte die SorLA-Färbung vollständig, was belegt, daß die Inaktivierung des Gens zu einem vollständigen Verlust der SorLA-Expression in der Niere führte.



Die Expression von SorLA an der apikalen Membran distaler Bereiche (Henle-Schleife und distaler Tubulus) und des Sammelrohrs läßt ein Mitwirken - direkt oder indirekt - an Transportprozessen vermuten, die den Natrium-, Chlorid-, Kalium-, Kalzium-, Magnesium-, Ammonium-, Harnstoff- wie auch den Wasserhaushalt betreffen, da Transportprozesse dieser Art im wesentlichen durch Tubuluszellen dieser Segmente bewerkstelligt werden.

Aufgrund der Expression von SorLA in den entsprechenden Nierensegmenten ergaben sich die folgenden Versuchsaufstellungen und induzierten Streßbedingungen.

### **3.2.2 Physiologische Blut- und Urinparameter**

Zur Beschreibung des Nierenphänotyps wurden jeweils Blut- und Urinproben von unbehandelten und gedursteten Tieren entnommen. Durst bzw. Wasserentzug führt zur Reduzierung des Plasmavolumens und damit zur Aktivierung einer Reihe von Regelmechanismen in der Niere, die sowohl den Salz- als auch den Wasserhaushalt betreffen. Diese Methode wurde angewandt, um etwaige Regulationen bzw. Transporteraktivierungen in der SorLA-defizienten Maus aufzudecken, welche aufgrund der Inaktivierung des Gens in der Funktion beeinträchtigt sind.

#### **3.2.2.1 Serumwerte vor und nach Wasserrestriktion**

Zur Bestimmung der Ionenkonzentration im Blut wurde je Gruppe 10 Tieren Blut entnommen und das Serum für die Bestimmungen verwendet.

### Ionenkonzentration im Serum

	WT	SD	KO	SD	p-Wert
Na <sup>+</sup> [mM]	152	± 2,0	153	± 1,3	> 0,1
Cl <sup>-</sup> [mM]	110	± 3,0	109	± 4,4	> 0,1
K <sup>+</sup> [mM]	6,8	± 1,5	5,7	± 0,9	< 0,05
Ca <sup>2+</sup> [mM]	2,4	± 0,1	2,4	± 0,1	> 0,1

**Tabelle 1 Ionenkonzentration im Serum der Wildtyp- (WT) und SorLA-defizienten (KO) Mäuse unter Normalbedingung.** Dargestellt ist die Ionenkonzentration im Serum der Kontroll- und *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tiere für Natrium, Chlorid, Kalium und Kalzium. Die beiden Versuchstiergruppen unterschieden sich nicht in der Konzentration der Serumionen mit Ausnahme von Kalium. Die Kaliumkonzentration lag in den *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tieren deutlich niedriger als in den Kontrolltieren. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte, die Abweichungen entsprechen der Standardabweichung (SD), signifikante Unterschiede entsprechen einem p-Wert < 0,05 (Student t-Test).

In der Natrium-, Chlorid- und Kalziumkonzentration wiesen die beiden Versuchsgruppen keine Unterschiede auf (Tabelle 1). Der Natrium-, Chlorid- und Kalziumwert der Kontrolltiere lag bei 152 mM (SD ± 2,0), 110 mM (SD ± 3,0) bzw. 2,4 mM (SD ± 0,1). Die entsprechenden Salzwerte der *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tiere lagen bei 153 mM (SD ± 1,3), 109 mM (SD ± 4,4) und 2,4 mM (SD ± 0,1). Der Unterschied in der Kaliumkonzentration zwischen den beiden Gruppen war signifikant (p < 0,05). So wiesen die Wildtyptiere eine Konzentration von 6,8 mM (SD ± 1,5) auf, die *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tiere 5,7 mM (SD ± 0,9).

Offenbar zeigten die *sorLA*<sup>-/-</sup>-Mäuse Anzeichen eine Hypokaliämie bei ansonsten unauffälligen Ionenkonzentrationen des Serums.

Zur Bestimmung der Ionenserumwerte nach Wasserentzug wurden je Gruppe 6 Tiere über 24 Stunden gedurstet, das Blut entnommen und das Serum vermessen.

### Ionenkonzentration im Serum nach Wasserentzug

	WT	SD	KO	SD	p-Wert
<b>Na<sup>+</sup></b> [mM]	<b>151</b>	± 2,4	<b>154</b>	± 2,2	< 0,05
<b>Cl<sup>-</sup></b> [mM]	<b>112</b>	± 1,7	<b>113</b>	± 1,4	> 0,1
<b>K<sup>+</sup></b> [mM]	<b>6,5</b>	± 0,5	<b>6,0</b>	± 0,6	> 0,1
<b>Ca<sup>2+</sup></b> [mM]	<b>2,5</b>	± 0,1	<b>2,6</b>	± 0,1	> 0,1

**Tabelle 2 Ionenkonzentration im Serum der Wildtyp- (WT) und SorLA-defizienten (KO) Tiere nach 24 Stunden Wasserentzug.** Abgebildet ist die Konzentration der Serumionen Natrium, Chlorid, Kalium und Kalzium der *sorLA*<sup>+/+</sup>- und *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tiere nach 24 Stunden Wasserentzug. Die Werte für Chlorid, Kalium und Kalzium unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen. Ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ , Student t-Test) wurde für die Natriumkonzentration gemessen. Diese war in den SorLA-defizienten Tieren leicht erhöht. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte, die Abweichungen entsprechen den Standardabweichungen (SD).

In Tabelle 2 ist die Ionenkonzentration im Serum der beiden Versuchstiergruppen nach 24 Stunden Wasserentzug dargestellt. Unter dieser Versuchsbedingung ließen sich keine Unterschiede in der Ionenkonzentration zwischen Kontrollgruppe und SorLA-defizienten Tieren für Chlorid (112 mM [SD ± 1,7] vs. 113 mM [SD ± 1,4]), Kalium (6,5 mM [SD ± 0,5] vs. 6,0 mM [SD ± 0,6]) und Kalzium (2,5 mM [SD ± 0,1] vs. 2,6 mM [SD ± 0,1]) feststellen. Eine etwas höhere Natriumkonzentration wurde in den *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tieren beobachtet, 154 mM (SD ± 2,2) gegenüber 151 mM (SD ± 2,4) in den Kontrolltieren ( $p < 0,05$ ).

Die Daten der Blutanalyse zeigten einen Defekt im Kaliumhaushalt der *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tiere auf. Die SorLA-defizienten Tiere wiesen bei normaler Tierhaltung einen niedrigeren Kaliumserumspiegel auf als die Kontrolltiere. Befanden sich die Tiere im Zustand des Wassermangels, so ließ sich kein Unterschied im Kaliumspiegel nachweisen. Hingegen war

unter dieser Bedingung die Natriumkonzentration im Serum SorLA-defizienter Tiere leicht erhöht.

### 3.2.2.2 Urinvolumen vor und nach Wasserrestriktion

Da Riedel et al. bereits 2002 in Wildtypmäusen (C57BL/6) die SorLA-Expression in Wasserkanal-reichen Vesikeln des Sammelrohrs nachwies, stellte sich die Frage, ob SorLA eventuell an der Regulation der Wasserhomöostase beteiligt ist bzw. ob in SorLA-defizienten Tieren die Wasserresorption beeinträchtigt ist. Urinaufkonzentrierung bei Wasserrestriktion wird zum Großteil durch die Aktivierung des Wasserkanals Aquaporin-2 (AQP2) im Sammelrohr bewerkstelligt und bewirkt so eine verstärkte Wasserrückresorption in diesem Nierensegment. Zur Beantwortung der obigen Frage wurde das ausgeschiedene Urinvolumen der *sorLA*<sup>-/-</sup> im Vergleich zu *sorLA*<sup>+/+</sup>-Tieren gemessen. Dabei wurde die Urinmenge bei freiem Zugang zu Trinkwasser sowie nach 24 h Wasserentzug bestimmt. Für die Urinsammlung wurden die Tiere über Nacht in metabolischen Käfigen gehalten.

#### Urinvolumen

		WT	SD	KO	SD	p-Wert
<b>Wasser ad libidum</b>	[ml/Tag]	<b>1,65</b>	± 0,65	<b>1,48</b>	± 0,82	> 0,1
<b>Wasserentzug</b>	[ml/Tag]	<b>0,59</b>	± 0,33	<b>0,48</b>	± 0,22	> 0,1

**Tabelle 3 Urinvolumen der Wildtyp- (WT) und SorLA-defizienten (KO) Mäuse bei Normalhaltung und nach 24 Stunden Wasserentzug.** Abgebildet ist das ausgeschiedene Urinvolumen (bezogen auf 24 Stunden) bei freiem Zugang zu Trinkwasser und nach Wasserentzug. Die geringen Unterschiede zwischen den Kontroll- und Gen-defizienten Mäusen waren nicht signifikant. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte, die Abweichungen entsprechen den Standardabweichungen (SD).

Die in Tabelle 3 dargestellten Urinvolumina unterschieden sich nicht zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe. Die Wildtypmäuse schieden bei normaler Tierhaltung 1,65 ml/Tag (SD  $\pm$  0,69) aus, bei Wasserrestriktion ging das Volumen zurück auf 0,59 ml/Tag (SD  $\pm$  0,33). SorLA-defiziente Tiere verhielten sich ähnlich: das Urinvolumen ging von anfangs 1,48 ml/Tag (SD  $\pm$  0,82) auf 0,48 ml/Tag (SD  $\pm$  0,22), nach Wasserentzug, zurück.

Dies belegt, daß die Wasserrückresorption in SorLA-defizienten Tieren nicht gestört war und SorLA insofern die Funktion der Wasserkanäle, welche hauptsächlich im Sammelrohr lokalisiert sind, nicht beeinflusste.

### **3.2.2.3 Urinwerte vor und nach Wasserrestriktion**

Näheren Aufschluß über die Rolle von SorLA bei der Aktivierung von Iontentransportern und Kanälen sollte die Untersuchung der renalen Salzausscheidung SorLA-defizienter Tiere im Vergleich zu Wildtyptieren geben. Hierfür wurde wiederum die Ionenkonzentration im Urin bei freiem Zugang zu Trinkwasser und nach 24 h Wasserentzug gemessen.

Für die Ermittlung der physiologischen Salzkonzentrationen wurden je Gruppe mindestens 40 Tiere verwendet. Die Mäuse wurden zur Sammlung des Urins über Nacht in metabolische Käfige gesetzt.

### Ionenkonzentration im Urin

		WT	SD	KO	SD	p-Wert
<b>Na<sup>+</sup></b>	[mM]	<b>93,1</b>	± 22,2	<b>102,4</b>	± 35,9	> 0,1
<b>Cl<sup>-</sup></b>	[mM]	<b>75,0</b>	± 16,9	<b>94,2</b>	± 35,7	< 0,001
<b>K<sup>+</sup></b>	[mM]	<b>118,6</b>	± 42,6	<b>189,2</b>	± 145,9	< 0,001
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	[mM]	<b>1,2</b>	± 0,5	<b>2,1</b>	± 1,1	< 0,001

**Tabelle 4 Ionenkonzentration im Urin der Wildtyp- (WT) und SorLA-defizienten (KO) Mäuse unter Normalbedingung.** Die dargestellten Daten geben die Ionenkonzentration von Natrium, Chlorid, Kalium und Kalzium im Urin von unbehandelten Kontroll- und *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tieren wieder. Hoch signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ , Student t-Test) ließen sich für die Chlorid-, Kalium- und die Kalziumkonzentration messen. Hier schieden *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tiere deutlich mehr Salz aus, als *sorLA*<sup>+/+</sup>-Mäuse. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte, die Abweichungen entsprechen den Standardabweichungen (SD).

Tabelle 4 zeigt die Konzentrationen von Natrium, Chlorid, Kalium und Kalzium im Urin der Kontroll- und Gen-defizienten Tiere unter Normalbedingung. Dabei war die Chlorid- (94,2 mM [SD ± 35,7] vs. 75,0 mM [SD ± 16,9]), Kalium- (189,2 mM [SD ± 145,9] vs. 118,6 mM [SD ± 42,6]) und Kalziumkonzentration (2,1 mM [SD ± 1,1] vs. 1,2 mM [SD ± 0,5]) in den SorLA-defizienten Tieren signifikant gegenüber den entsprechenden Konzentrationen der Wildtypen erhöht ( $p \leq 0,001$ ). Kein Unterschied zwischen den Gruppen wurde für Natrium beobachtet (102,4 mM [SD ± 35,9] vs. 93,1 mM [SD ± 22,2] – *sorLA*<sup>-/-</sup> vs. *sorLA*<sup>+/+</sup>).

Zur Bestimmung der ausgeschiedenen Ionenkonzentration nach Streßinduktion und somit nach Aktivierung von Ionentransportern und Kanälen, wurden die Tiere über 24 Stunden gedurstet und der Urin für die Analyse aufgefangen.

### Ionenkonzentration im Urin nach Wasserentzug

	WT	SD	KO	SD	p-Wert
<b>Na<sup>+</sup></b> [mM]	<b>120,6</b>	± 35,5	<b>174,1</b>	± 82,3	< 0,01
<b>Cl<sup>-</sup></b> [mM]	<b>130,2</b>	± 39,6	<b>189,0</b>	± 93,8	< 0,01
<b>K<sup>+</sup></b> [mM]	<b>224,7</b>	± 138,4	<b>230,7</b>	± 95,4	> 0,1
<b>Ca<sup>2+</sup></b> [mM]	<b>1,4</b>	± 0,6	<b>2,0</b>	± 0,6	< 0,005

**Tabelle 5 Ionenkonzentration des Urins nach 24 Stunden Wasserentzug SorLA-defizienter Mäuse und der Kontrolltiere.** Unterschiede in den Urinkonzentrationen von Natrium, Chlorid und Kalzium gedursteter *sorLA<sup>-/-</sup>*- und *sorLA<sup>+/+</sup>*-Tiere waren signifikant ( $p < 0,01$ , Student t-Test). Die Kaliumkonzentration unterschied sich nicht zwischen den beiden untersuchten Versuchstiergruppen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte, die Abweichungen entsprechen den Standardabweichungen (SD).

Im Urin gedursteter *sorLA<sup>+/+</sup>*- und *sorLA<sup>-/-</sup>*-Tiere wurden deutliche Unterschiede ( $p < 0,01$ ) in der ausgeschiedenen Salzmenge festgestellt (Tabelle 5). Die Natrium-, Chlorid- und Kalziumkonzentration lag in der Kontrollgruppe bei 120,6 mM (SD ± 35,5), 130,2 mM (SD ± 39,6) und 1,4 mM (SD ± 0,6), respektive. In der SorLA-defizienten Gruppe lagen die entsprechenden Werte bei 174,1 mM (SD ± 82,3), 189,0 mM (SD ± 93,8) und 2,0 mM (SD ± 0,6). Die Kaliumkonzentration unterschied sich nicht zwischen den Gruppen. Hier lag der Wert für Wildtypen bei 224,7 mM (SD ± 138,4), der für SorLA-defiziente Mäuse bei 230,7 mM (SD ± 95,4). Dieses Ergebnis ließ vermuten, daß *sorLA<sup>-/-</sup>*-Tiere unter Durststreß einen Defekt der Natrium-, Chlorid- und Kalziumrückresorption aufweisen.

Die Ausscheidung höherer Salzkonzentrationen in diesem Versuch, gegenüber den Ausscheidungen unbehandelter Tiere (Tabelle 4), erklärt sich durch das verringerte Urinvolumen bei Wasserentzug. Die ausgeschiedene Menge an Urin nach Wasserrestriktion ging auf etwa ein Drittel des Volumens unbehandelter Tiere zurück, die Salzkonzentration nach Wasserentzug stieg maximal bis auf die zweifache Ausgangskonzentration. Dadurch

wird deutlich, daß die absolute Salzmenge des Urins gedursteter Tiere geringer war, als die nicht-gedursteter Tiere.

Mit Hilfe von Wasserentzug konnte eine höhere Salzausscheidung in SorLA-defizienten Tieren im Vergleich zu Wildtypen induziert werden. Es stellte sich daher die Frage, ob die Inaktivierung von *sorLA* die Funktion oder Aktivierung von Kaliumkanälen (betroffen im nicht-gedursteten Zustand), Natrium- und/oder Chloridtransportern (betroffen nicht-gedursteten und gedursteten Zustand) beeinflusste.

### 3.2.3 Untersuchungen von Ionttransportern

Die Ausscheidung unterschiedlicher Ionenkonzentrationen zwischen den beiden Versuchsgruppen veranlaßte die Analyse der eventuell involvierten Transporter.

Aufgrund der Expression von SorLA an der dem Harn zugewandten Membran (apikal oder auch luminal) der distalen Nierensegmente und des Sammelrohrs konnte der Natrium-Wasserstoff-Exchanger (NHE) ausgeschlossen werden. Dieser wird nur im proximalen Tubulus und nicht in distalen Segmenten exprimiert. Der wesentliche Natrium-Chlorid-Transporter im distalen Segment ist der Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter-2 (NKCC2). Er wird ausschließlich im dicken aufsteigenden Ast oder auch „thick ascending limb“ (TAL) der Henle-Schleife exprimiert und übernimmt ca. 30 % der renalen Natrium- und Chloridresorption. Ein weiterer  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Transporter ist der Natrium-Chlorid-Cotransporter (NCC), welcher im distalen Konvolut und im Verbindungstubulus exprimiert wird und für ca. 7 % der gesamten Natrium- und Chloridresorption aufkommt. Für die Feineinstellung des Natrium-Chlorid-Haushalts ist der epitheliale Natrium-Kanal (eNaC) verantwortlich. Er wird im Sammelrohr exprimiert und reguliert ca. 3 % der Natriumresorption der Niere. Untersuchungen des eNaC wurden nicht durchgeführt, da die Unterschiede in der ausgeschiedenen Salzmenge zwischen Wildtyp- und SorLA-defizienten Mäusen für einen Transporter sprachen, der für einen weitaus größeren Anteil der Salzurückresorption verantwortlich war.

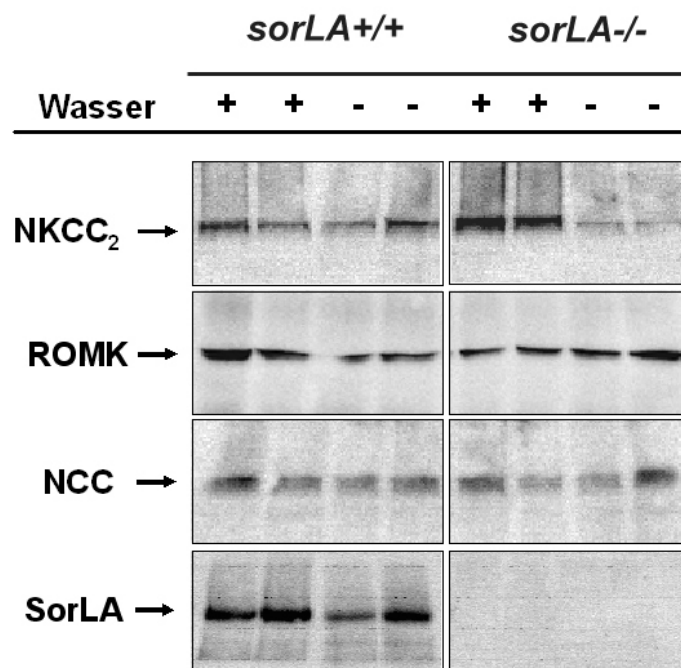
Für die Untersuchungen der Ionttransporter wurden Nieren von gedursteten und unbehandelten *sorLA*<sup>-/-</sup>- und *sorLA*<sup>+/+</sup>-Tieren entnommen. Die Nieren wurden zum Teil zu



Membranextrakt für die Western Blot-Analyse verarbeitet, zum Teil wurden die Nieren fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend die Paraffinschnitte mittels Antikörperfärbung untersucht.

### NKCC2, ROMK, NCC – Western Blot-Analyse

Neben der Expression von NKCC2 und NCC wurde, aufgrund der Unterschiede in der Kalium-Ausscheidung, auch die Expression des apikalen „rat outer-medulla K<sup>+</sup> channel“ (ROMK) untersucht. ROMK wird im TAL und im Sammelrohr exprimiert und ist verantwortlich für K<sup>+</sup>-Recycling und K<sup>+</sup>-Sekretion. Für die Untersuchung dieser Transportproteine wurde Nierenmaterial unbehandelter und gedursteter Kontrolltiere bzw. SorLA-defizienter Tiere verwendet und dieses mit Hilfe von Antikörpern, gerichtet gegen die extrazellulären Domänen von NKCC2, NCC, ROMK und SorLA, im Western Blot analysiert.



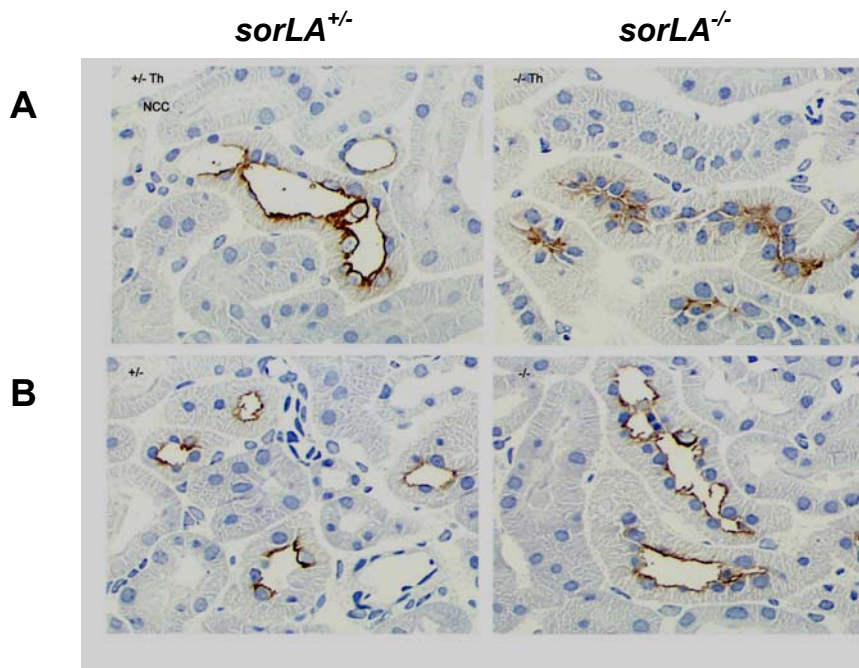
**Abbildung 24** Western Blot-Analyse der NKCC2, ROMK und NCC Expression in *sorLA*<sup>+/+</sup>- und *sorLA*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Untersuchung des Expressionsniveaus von Transportern und Kanälen in unbehandelten und gedursteten Tieren erbrachte keine Veränderung der Proteinmenge für NKCC2, ROMK und NCC in den Kontrolltieren. SorLA-defiziente Tiere wiesen ebenfalls keine veränderten Proteinmengen für NCC und ROMK

auf, jedoch war die Menge an NKCC2 in gedursteten Tieren gegenüber der von unbehandelten *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tieren deutlich reduziert.

Die Abbildung 24 stellt die Ergebnisse der Western Blot-Analyse der Ionentransporter dar. Für ROMK und NCC wurde keine Expressionsänderung durch Dursten induziert, weder in Kontrolltieren noch in SorLA-defizienten Tieren. Auch für den NKCC2 ergab sich nach Dursten keine Änderung der Proteinmenge im Membranextrakt der Wildtypen. Dies stimmt mit der Literatur überein. NKCC2-Aktivierung nach Wasserentzug geht nicht einher mit einer Änderung des Proteinexpressionsniveaus, sondern mit einer veränderten Lokalisation von NKCC2-reichen Vesikeln aus dem Zytoplasma an die Zellmembran (Nielsen et al., 1998; Ortiz, 2006). Insofern sollte nach NKCC2-Aktivierung kein Unterschied in der Proteinmenge des Gesamtmembranextrakts auftreten. Anders verhielt es sich für SorLA-defiziente Mäuse. Hier wurde im Durstversuch beobachtet, daß die Proteinmenge des NKCC2 deutlich reduziert war im Vergleich zu unbehandelten Tieren.

### **NCC-Histologie**

Der NCC übernimmt distal der Henle-Schleife die größte Natrium- und Chloridresorption und wird aktiviert durch die Hormone Aldosteron und Östradiol sowie bei Dehydrierung durch das anti-diuretische Hormon (ADH oder auch Vasopressin). Die Ergebnisse der NCC-Histologie sind dargestellt in Abbildung 25.

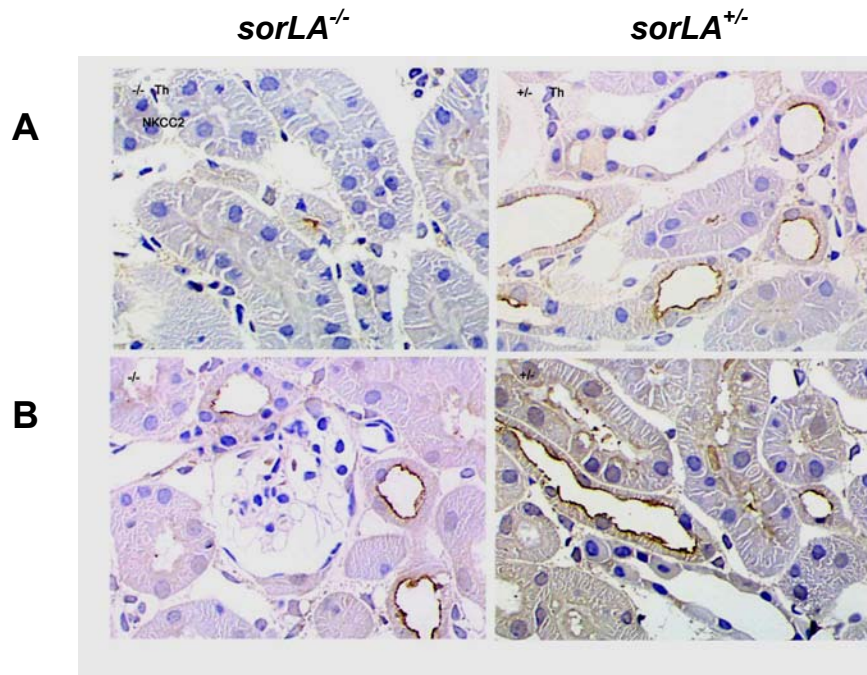


**Abbildung 25** NCC-Expression in Kontrolltieren (*sorLA*<sup>+/-</sup>) und SorLA-defizienten (*sorLA*<sup>-/-</sup>) Tieren, vor und nach Wasserentzug. Dargestellt ist die immunhistologische Färbung des NCC in heterozygoten (Kontrolltiere) und homozygoten SorLA-defizienten Tieren bei freiem Zugang zu Trinkwasser (**B**) und nach 24 stündiger Wasserrestriktion (**A**). Es wurde kein Unterschied in der NCC-Färbung für die beiden Versuchsbedingungen und zwischen den Versuchsgruppen beobachtet.

Die NCC-Expression in der Niere von Kontrolltieren war unverändert gegenüber der Expression SorLA-defizienter Tiere (Abbildung 25). Weder in unbehandelten noch in gedursteten Tieren war ein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen zu verzeichnen. Das bedeutet, daß die Aktivierung des NCC nicht durch die Inaktivierung des SorLA-Gens beeinträchtigt war und SorLA somit keinen Einfluß auf die Expression von NCC hatte.

### NKCC2-Histologie

Der NKCC2 ist ein Transporter, der nur in der Niere und hier im TAL der Henle-Schleife exprimiert und durch Vasopressin Ausschüttung (z. Bsp. nach Dehydrierung) aktiviert wird.

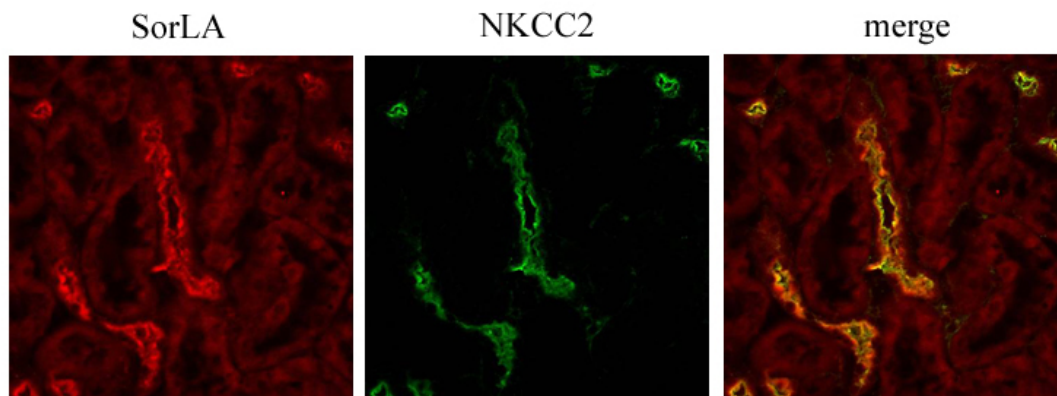


**Abbildung 26 Immunhistologische Färbung des NKCC2 in der Niere der Kontroll- (*sorLA<sup>+/-</sup>*) und SorLA-defizienten (*sorLA<sup>-/-</sup>*) Maus, unbehandelt und nach 24 h Wasserentzug.** Die NKCC2-Menge im Kontrolltier war nach Wasserentzug (A) weitgehend unverändert. Im gedursteten SorLA-defizienten Tier war die Menge an NKCC2 (A) gegenüber dem ungedursteten *sorLA<sup>+/-</sup>*- und *sorLA<sup>-/-</sup>*-Tier (B), wie auch gegenüber dem gedursteten Kontrolltier, deutlich reduziert.

Das Resultat der NKCC2-Studie ist dargestellt in Abbildung 26 und belegt, daß bei unbehandelten Tieren kein Unterschied in der NKCC2 Expression zwischen den Gruppen nachzuweisen war. Jedoch ging die NKCC2-Expression in SorLA-defizienten Tieren fast vollständig verloren nachdem die Tiere gedurstet wurden. Dies wurde nicht in der Kontrollgruppe beobachtet. Dieses Ergebnis wird gestützt von der Western Blot-Analyse des NKCC2, die ebenfalls eine Abnahme der Proteinmenge nach Dehydrierung in *sorLA<sup>-/-</sup>*-Mäusen aufzeigte.

### **NKCC2- und SorLA-Kolokalisation mittels Immunfluoreszenztechnik**

Die vorangegangenen Western Blot- und immunhistologischen Untersuchungen belegten eine mögliche Interaktion von SorLA und NKCC2 im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife. Mittels Immunfluoreszenztechnik wurde daraufhin die Lokalisation von SorLA und NKCC2 auf Nierenschnitten von Wildtyp-Mäusen analysiert.



**Abbildung 27** Immunhistologische Fluoreszenzfärbung von SorLA und NKCC2 in der Niere der Wildtyp-Maus. SorLA und NKCC2 lokalisierten in gleichen Segmenten, was aufgrund der ausschließlichen Expression von NKCC2 im TAL, der dicke aufsteigende Ast der Henle-Schleife war. Bei Überlagerung beider Signale (merge) wurde die Kolokalisation beider Proteine deutlich, zu erkennen am resultierenden Signal (gelb).

Die Abbildung 27 zeigt die Lokalisation von SorLA (rot) und NKCC2 (grün) auf Gewebeschnitten von Wildtyp-Mausnieren. Beide Proteine waren in gleichen Nierensegmenten exprimiert. Bei Überlagerung der Signale (Abbildung 27/merge) wurde zum größten Teil Kolokalisation beider Proteine (gelb) nachgewiesen. Dies, zusammen mit den Daten der vorangegangenen Western Blot- und immunhistologischen Analysen gedursteter Tiere, läßt einen Zusammenhang zwischen der *sorLA*-Defizienz und der fehlenden Expression von NKCC2 (nach Aktivierung) vermuten.

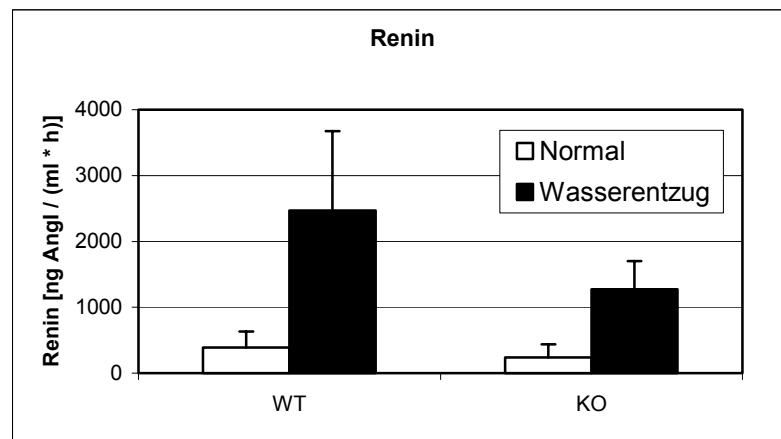
### 3.2.4 Endokrinologische Blut- und Urinparameter

Neben der phänotypischen Bestimmung der Nierenausscheidung galt mein Interesse den an der Nierenregulation beteiligten Hormonen. Eine wesentliche Komponente ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Aber auch die Bestimmung des antidiuretisch wirksamen Vasopressins erschien wichtig, da offensichtlich Zielproteine des Vasopressins (NKCC2) in ihrer Funktion in SorLA-defizienten Tieren beeinträchtigt waren.

### 3.2.4.1 Renin

Zur Untersuchung der Endokrinologie in SorLA-defizienten Tieren wurden die Hormone des RAAS näher untersucht. Dies erfolgte an unbehandelten und gedursteten Tieren, da Wasserrestriktion die Aktivierung des RAAS zur Folge hat. Hierfür wurde den Tieren Blut entnommen und das Plasma für die Hormonbestimmung verwendet.

Renin wird unter Wassermangel aus einer dichten Zellschicht, den Tubulusepithelzellen der Macula densa, die sich im distalen Bereich des TAL der Henle-Schleife befinden, ausgeschüttet. Dies erfolgt, um sowohl die Salz- als auch die Wasserrückresorption zu verstärken.



**Diagramm 6 Reninkonzentration in Wildtyp- (WT) und SorLA-defizienten (KO) Mäusen bei Normalhaltung und nach Wasserrestriktion.** Die Plasmakonzentration von Renin stieg nach Wasserentzug in Kontroll- und Gen-defizienten Tieren gleichermaßen. Der Ausgangswert der *sorLA*<sup>+/+</sup>-Mäuse lag bei 388,5 ng AngI/(ml\*h) (± 242,9), der der *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tiere bei 238,7 ng AngI/(ml\*h) (± 198,4). Die Werte nach Wasserentzug lagen bei 2468,8 ng AngI/(ml\*h) (± 1205,9) für *sorLA*<sup>+/+</sup>- und bei 1273,0 ng AngI/(ml\*h) (± 427,3) für *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tiere. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war für die Durstbedingung signifikant ( $p < 0,05$ ). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte (± Standardabweichung).

Die in beiden Versuchsgruppen gemessenen Reninwerte sind im Diagramm 6 dargestellt. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der SorLA-defizienten Gruppe wurde Renin nach Wasserreduktion ausgeschüttet. Die Reninwerte der Wildtypen stiegen von anfangs 388,5 ng AngI/(ml\*h) (SD ± 242,9) auf 2468,8 ng AngI/(ml\*h) (SD ± 1205,9) nach Wasserrestriktion. Die Werte der SorLA-defizienten Tiere lagen unter Normalbedingung bei 238,7 ng

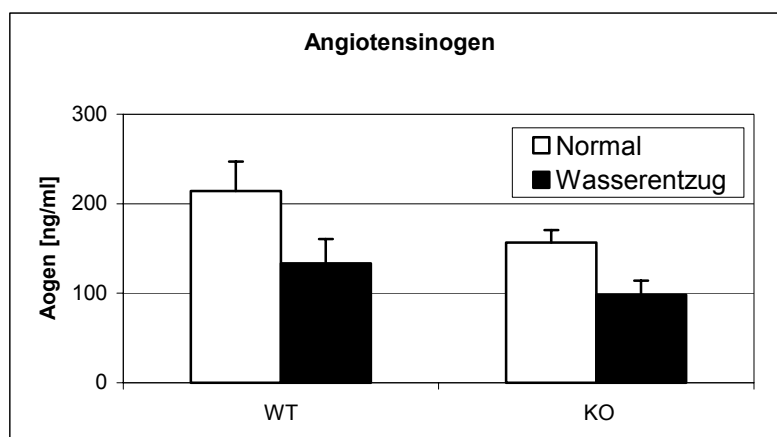
AngI/(ml\*h) (SD  $\pm$  198,4) und stiegen nach Wasserentzug auf 1273,0 ng AngI/(ml\*h) (SD  $\pm$  427,3). Interessanterweise variierte der Faktor, um den die Reninmenge anstieg, zwischen den beiden Gruppen nicht so stark wie die absoluten Werte. So war eine Reninzunahme in den Kontrolltieren um den Faktor 6 zu verzeichnen, in den Gen-defizienten Tieren um den Faktor 5. Hingegen lag in den Kontrolltieren etwa die doppelte Menge an Renin unter beiden Versuchsbedingungen vor. Ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen beiden Gruppen wurde für die Daten des Wasserentzugs beobachtet.

Um diesen Effekt, aber auch die Auswirkung der Inaktivierung von *sorLA* auf die Ausschüttung weiterer Hormone des RAAS näher zu klären, wurden Angiotensinogen, das Substrat für Renin, und Angiotensin-I, das Produkt dieser enzymatischen Spaltung, untersucht.

### 3.2.4.2 Angiotensinogen

Angiotensinogen wird in der Leber gebildet und gespeichert und ist bisher das einzig bekannte Substrat für Renin. Es wird durch Renin in das Dekapeptid Angiotensin-I umgewandelt.

Zur Gewinnung des Plasmas für die Bestimmung von Angiotensinogen (Aogen) wurde identisch vorgegangen wie für die Reninbestimmung.



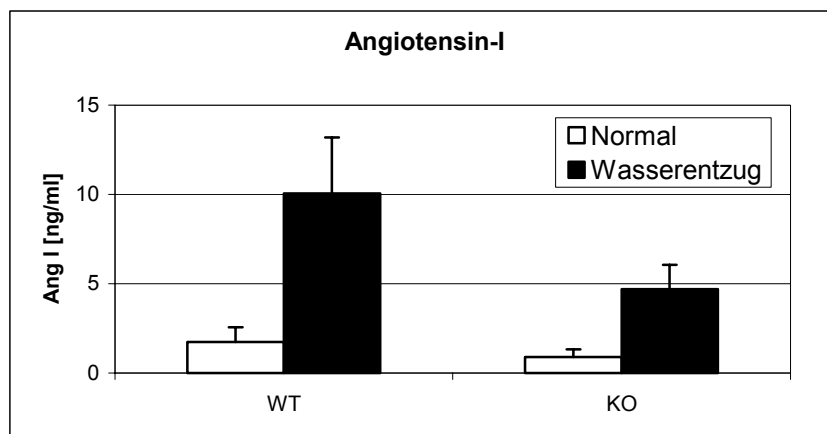
**Diagramm 7** Angiotensinogenkonzentration im Plasma der Wildtyp- (WT) und SorLA-defizienten (KO) Mäuse bei Normalhaltung und nach 24 h Wasserentzug. Das Dursten der Kontrolltiere führte zu einer

Abnahme der Angiotensinogenkonzentration von 214,2 ng/ml ( $\pm 32,9$ ) auf 133,5 ng/ml ( $\pm 27,21$ ). Der gleiche Trend wurde in SorLA-defizienten Tieren beobachtet, hier nahm die Konzentration von 156,6 ng/ml ( $\pm 13,9$ ) auf 98,2 ng/ml ( $\pm 15,9$ ) ab. Die gemessenen Werte entsprechen Mittelwerten ( $\pm$  Standardabweichung).

Wie in Diagramm 7 zu erkennen ist, wurde in beiden Versuchstiergruppen nach Wasserrestriktion verstärkte Angiotensinogenspaltung durch Renin beobachtet. In den Kontrolltieren lag eine Abnahme um 38 % vor (von 214,2 ng/ml (SD  $\pm 32,9$ ) auf 133,5 ng/ml (SD  $\pm 27,2$ )), in Gen-defizienten Tieren nahm der Aogen-Gehalt um 37 % ab (von 156,6 ng/ml (SD  $\pm 13,9$ ) auf 98 ng/ml (SD  $\pm 16,0$ )). Trotz der prozentual ähnlichen Reduzierung lagen die Absolutwerte wiederum weit auseinander. Die Aogen-Werte der Wildtyp-Tiere waren für beide Versuchsbedingungen um ca. ein Drittel höher ( $p < 0,05$ ) als die der SorLA-defizienten Tiere.

### 3.2.4.3 Angiotensin-I

Neben der Angiotensinogenbestimmung wurde das Produkt der enzymatischen Spaltung durch Renin, das Angiotensin-I, untersucht. Angiotensin-I (AngI) ist eine biologisch unwirksame Substanz und wird vorwiegend in der Lunge durch das „angiotensin converting enzym“ (ACE) in das vasoaktive Angiotensin-II umgebaut. Für diesen Versuch wurde von gedursteten und nicht-gedursteten SorLA-defizienten und Wildtyp-Tieren Serum entnommen und der Angiotensin-I-Spiegel bestimmt.



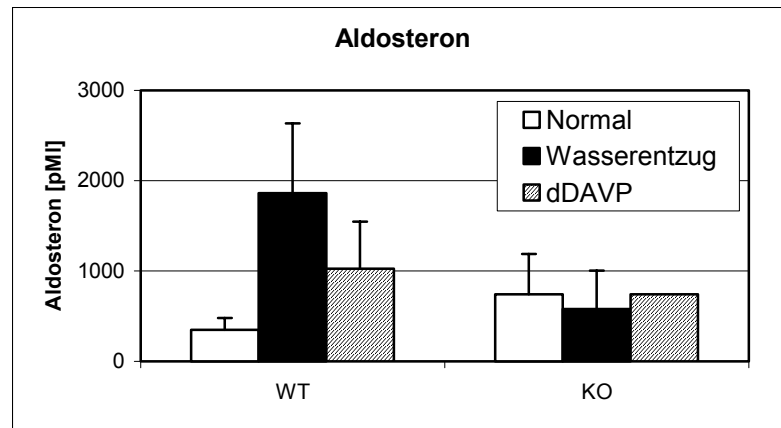


**Diagramm 8** Angiotensin-I im Serum der Wildtyp- (WT) und SorLA-defizienten (KO) Tiere bei Normal- und Wasserentzugsbedingung. Die Angiotensin-I-Konzentration nahm durch Wasserrestriktion in den Wildtypen von 1,7 ng/ml ( $\pm 0,8$ ) auf 10,1 ng/ml ( $\pm 3,1$ ) zu, in SorLA-defizienten Tieren von 0,9 ng/ml ( $\pm 0,4$ ) auf 4,7 ( $\pm 1,3$ ) ng/ml. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten ( $\pm$  Standardabweichung).

Wie das Diagramm 8 zeigt, waren beide Versuchsgruppen in der Lage nach Wasserentzug verstärkt Angiotensinogen zu Angiotensin-I zu spalten. Sowohl in den Kontrolltieren (1,7 ng/ml [SD  $\pm$  0,8] vs. 10,1 ng/ml [SD  $\pm$  3,1]) als auch in SorLA-defizienten Tieren (0,9 ng/ml [SD  $\pm$  0,4] vs. 4,7 ng/ml [SD  $\pm$  1,4]) nahm die Menge an AngI um etwa den Faktor 5 zu. Das bedeutet, daß der Grad der Erhöhung des AngI-Spiegels, trotz unterschiedlicher Ausgangswerte, für beide Gruppen gleich war. Das wiederum deutet darauf hin, daß in SorLA-defizienten Tieren keine Beeinträchtigung der AngI-Aktivierung vorliegt.

#### 3.2.4.4 Aldosteron

Um zu untersuchen, ob in SorLA-defizienten Tieren die Aldosteronausschüttung durch AngI über Angiotensin-II induzierbar ist, wurde neben Aogen, AngI und Renin auch Aldosteron gemessen. Aldosteron ist ein Steroidhormon und wird von den Zellen der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde gebildet und ausgeschüttet. Die wesentliche Funktion von Aldosteron liegt in der Kontrolle des Natrium- und Kaliumgleichgewichts und damit des Salz- und Wasserhaushalts. Die Aldosteronmessung erfolgte ebenfalls im Serum von Wildtyp- und SorLA-defizienten Tieren unter Normalbedingung, nach 24 h Wasserentzug und nach Gabe des synthetischen Vasopressinanalogs desamino-D-Arginin-Vasopressin (dDAVP oder auch Desmopressin). Vasopressin bzw. Desmopressin ist verantwortlich für die Aktivierung des NKCC2 und des ROMK im TAL der Henle-Schleife und für die des Wasserkanals (AQP2) im Sammelrohr. Darüber hinaus induziert Vasopressin die Aldosteronausschüttung. Das Ergebnis der Aldosteronmessung ist im Diagramm 9 dargestellt.

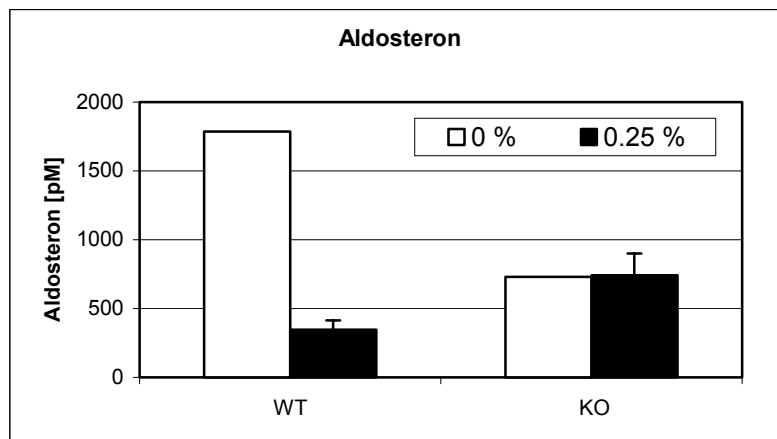


**Diagramm 9** Aldosteron im Serum der Kontrolltiere (WT) und *SorLA*-defizienter Tiere (KO) unter Normalbedingung, nach 24 h Wasserentzug und nach Gabe von dDAVP. Die Aldosteronkonzentration der Wildtypen stieg von anfangs 347,0 pM ( $\pm$  131,8) auf 1863,0 pM ( $\pm$  770,6) nach Wasserentzug und auf 1025,6 pM ( $\pm$  519,0) nach dDAVP Gabe. Die Aldosteronkonzentration der *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tiere war unter Normalbedingung deutlich höher (741,1 pM [ $\pm$  447,0];  $p < 0,05$ ) als die der *sorLA*<sup>+/+</sup>-Tiere. Weder Wasserentzug (578,1 pM [ $\pm$  424,3]), noch dDAVP (740,5 pM, 2 Serenpools) führten zu einer höheren Aldosteronkonzentration in den Gendefizienten Tieren. Angegebene Werte entsprechen Mittelwerten ( $\pm$  Standardabweichung).

Unter Normalbedingung wurde in den Kontrolltieren 347,0 pM (SD  $\pm$  131,8) Aldosteron gemessen, in *SorLA*-defizienten Tieren 741,1 pM (SD  $\pm$  447,0) (Diagramm 9). Wurden die Tiere gedurstet, so stieg die Reninausschüttung, was über das RAA-System zu einer erhöhten Aldosteronausschüttung führte. Dies wurde in den Kontrolltieren beobachtet (1863,00 pM [SD  $\pm$  770,6]), jedoch nicht in *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tieren (578,11 pM [SD  $\pm$  424,3]). Die Gabe von Desmopressin führte zu einer Erhöhung der Aldosteronwerte in den Kontrolltieren (1025,6 pM [SD  $\pm$  519,0]), aber nicht in *SorLA*-defizienten Tieren (740,50 pM, keine Standardabweichung berechenbar, da 2 Serenpools verwendet wurde). Dabei divergierten die Meßwerte unter Normalbedingung und nach Wasserentzug signifikant zwischen den beiden Versuchsgruppen ( $p < 0,05$ ).

Dieser Versuch zeigte deutlich, daß *SorLA*-defiziente Tiere Anzeichen eines Hyperaldosteronismus aufweisen, der begleitet wird von fehlender Aldosteronregulation.

Darüber hinaus wurde die Aldosteronausschüttung unter Salz mangeldiät gemessen. Hierfür wurde den Tieren über 2 Wochen ein Spezialfutter gegeben, was sich von dem Standardfutter nur in dem NaCl-Gehalt unterschied. Dieser lag bei ca. 0 %, demgegenüber enthielt das Standardfutter 0,25 % NaCl.



**Diagramm 10 Aldosteronkonzentration im Serum der Kontrolltiere (WT) und SorLA-defizienten (KO) Tiere unter Salz mangeldiät (0 % NaCl).** Die Konzentration von Aldosteron in den Kontrolltieren lag bei 347,0 pM ( $\pm$  131,8) bei Normalkost. Sie stieg unter salzreduzierter Kost auf 1785,0 pM. Die entsprechenden Werte SorLA-defizienter Tiere lagen bei 741,1 pM ( $\pm$  447,0) unter Normalbedingung und bei 730,0 pM bei Salz mangeldiät. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten ( $\pm$  Standardabweichung) bzw. dem Mittelwert aus 2 Serenpools bei den Messungen der 0 % NaCl-Diät.

Die fehlende Regulation des Aldosteronhaushalts wurde ebenfalls beobachtet, wenn die Tiere einem Salzstreß ausgesetzt wurden (Diagramm 10). Erhielten die Tiere eine salzarme Diät (0 % NaCl), so reagierte der Körper mit vermehrter Aldosteronausschüttung, die zu verstärkter Salzurückresorption führte. Dies wurde in den Kontrolltieren beobachtet (1785 pM vs. 347,00 pM [SD  $\pm$  131,8] Aldosteron – 0 % vs. 0,25 %). Nicht beobachtet wurde dieser Effekt in SorLA-defizienten Tieren (730 pM vs. 741,13 pM [SD  $\pm$  447,0] Aldosteron – 0 % vs. 0,25 %). Für die Aldosteronbestimmungen unter Salz mangeldiät wurden je 2 Serenpools vermessen, daher konnten keine Standardabweichungen berechnet werden.

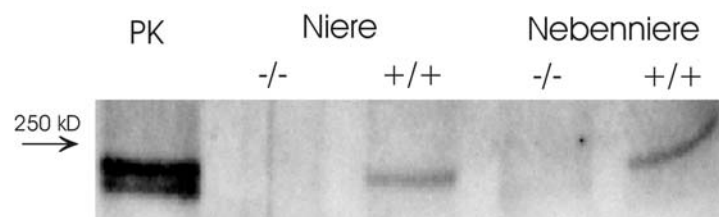
Was bei allen Versuchsbedingungen zur Bestimmung der Aldosteronkonzentration beobachtet werden konnte, war eine Fehlfunktion der Aldosteronregulation in SorLA-defizienten

Mäusen. Diese Tiere waren nicht in der Lage, dem hohen Salzverlust (Wasserrestriktion, salzarme Diät) mit verstärkter Aldosteronausschüttung ins Blut entgegen zu wirken. Möglicherweise ist der erhöhte Salzverlust in *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tieren (3.2.2.3) die Folge der fehlenden Aldosteronregulation, da Aldosteron die Natriumrückresorption und Kaliumausscheidung über den eNaC und ROMK reguliert.

#### 3.2.4.4.1 SorLA-Expression in der Nebenniere

Die Ergebnisse der Aldosteronmessung verdeutlichten, daß SorLA-defiziente Tiere nicht in der Lage waren die Aldosteronausschüttung zu regulieren. Insofern stellte sich die Frage inwieweit die Nebenniere, als Ort der Aldosteronbildung und –ausschüttung, in den Defekt der Aldosteronregulation SorLA-defizienter Tiere involviert war. Yamazaki H. et al. (1996) und Mörwald et al. (1997) konnten mittels Northern Blot-Technik die Expression von *sorLA* in der Nebenniere nachweisen. Es gibt bisher keine Literatur, die das Protein in der Nebenniere dokumentiert.

Für die Analyse des Proteins in der Nebenniere wurde diese von Wildtyp- und SorLA-defizienten Tieren homogenisiert und das SorLA-Protein mittels Western Blot detektiert. Das hierfür verwendete Antiserum ist gegen die extrazelluläre Domäne von SorLA gerichtet.



**Abbildung 28** Western Blot-Analyse der Nebenniere und Niere von Wildtyp- (+/+) und SorLA-defizienten (-/-) Mäusen. Abgebildet ist die Bande des Proteins SorLA, welches bei ca. 250 kDa im SDS-Page der Wildtypmausniere und -nebeniere migrierte. SorLA wurde weder in der Niere noch in der Nebenniere der SorLA<sup>-/-</sup>-Maus nachgewiesen. Als Positivkontrolle (PK) diente Membranextrakt, gewonnen aus Gehirnmaterialeiner *sorLA*<sup>+/+</sup>-Maus.

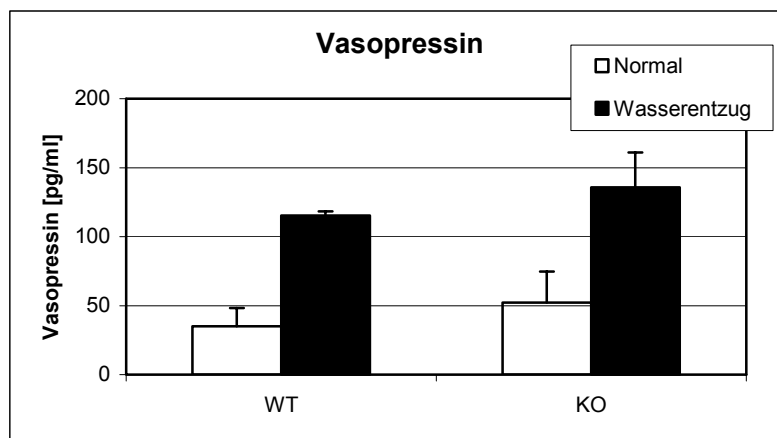
Der in Abbildung 28 dargestellte Western Blot belegte die Expression von SorLA in der Nebenniere von Wildtyp-Tieren (+/+). Im Material SorLA-defizienter Tiere (-/-) wurde kein Protein nachgewiesen. Im Vergleich dazu: Nierenmaterial aus *sorLA*<sup>-/-</sup>- und *sorLA*<sup>+/+</sup>-Mäusen, wie auch Membranextrakt, gewonnen aus Gehirnmateriale der Wildtyp-Maus, welcher als Positivkontrolle (PK) verwendet wurde.

Ergebnis dieses Versuchs war der Nachweis der SorLA-Expression in der Nebenniere der Wildtyp-Maus.

### 3.2.4.5 Vasopressin

Ein weiterer Regulator des Salz- und Wasserhaushalts ist das Vasopressin. Es wird im Zwischenhirn (Hypothalamus) gebildet, in der Hirnanhangsdrüse (Hypophyse) gespeichert und bei Bedarf in den Blutkreislauf abgegeben. Vasopressin oder auch anti-diuretisches Hormon (ADH) bewirkt zum einen eine verstärkte Natrium- und Chloridrückresorption über den NKCC2 im TAL der Henle-Schleife, zum anderen eine vermehrte Wasserrückresorption im Sammelrohr über die Aktivierung des Wasserkanals AQP2.

In diesem Versuch wurde der Vasopressingehalt im Urin der Mäuse unter Normalbedingung und nach 24 h Wasserentzug bestimmt. Die Probennahme erfolgte mit Hilfe metabolischer Käfige.



**Diagramm 11** Vasopressinkonzentration im Urin der Kontrolltiere (WT) und SorLA-defizienter Tiere (KO) bei Normalhaltung und nach 24 h Wasserentzug. Die Vasopressinkonzentration der Kontrolltiere stieg von anfangs 35,1 pg/ml ( $\pm$  13,0) auf 115,3 pg/ml ( $\pm$  2,9) nach Wasserentzug. Die Werte SorLA-defizienter Tiere

lagen wie folgt: 52,1 pg/ml ( $\pm 22,5$ ) für Normalhaltung und 135,7 pg/ml ( $\pm 25,4$ ) nach Wasserentzug. Die angegebenen Werte entsprechen Mittelwerten ( $\pm$  Standardabweichung).

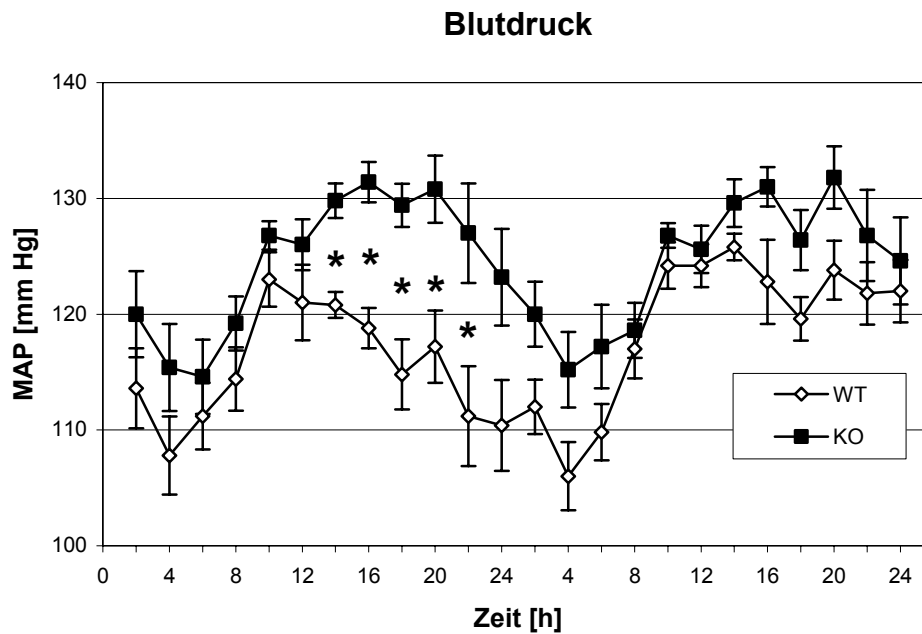
Das Diagramm 11 zeigt deutlich, daß beide Versuchstiergruppen ähnlich auf den Wasserentzug reagierten. Die Vasopressinkonzentration der unbehandelten Kontrolltiere lag bei 35,1 pg/ml (SD  $\pm 13,0$ ) und stieg nach Wasserentzug auf 115,3 pg/ml (SD  $\pm 2,9$ ). Die Werte der SorLA-defizienten Tiere lagen bei 52,1 pg/ml (SD  $\pm 22,5$ ) bei Normalhaltung und bei 135,7 pg/ml (SD  $\pm 25,4$ ) nach Wasserrestriktion. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant.

Dieser Versuch zeigte, daß die Ausschüttung von Vasopressin durch das Fehlen von *sorLA* in SorLA-defizienten Tieren nicht beeinträchtigt war.

### 3.2.5 Blutdruckmessungen

Der bisher beobachtete Nierenphänotyp der SorLA-defizienten Maus wies Unterschiede in der Funktion verschiedener Hormone und Proteine auf, die eine Blutdruck-regulierende Wirkung haben. So ist z. Bsp. die Aldosteronausschüttung involviert in die Natriumhomöostase und damit indirekt auch beteiligt an der Regulation des Wasserhaushaltes, welcher wiederum über das Plasmavolumen den Blutdruck beeinflusst. Aber auch ein permanenter Verlust an Ionen, eventuell verbunden mit der Fehlfunktion von Ionentransportern, kann den Blutdruck beeinflussen. Die bisher erzielten Ergebnisse bestärkten die Frage nach Unterschieden im Blutdruck zwischen SorLA-defizienten und Wildtyp-Mäusen.

Zur Bestimmung des Blutdrucks der Versuchstiere wurde das Telemetrie-System angewandt. Daten des systolischen und diastolischen Blutdrucks sowie die Herzrate wurden über einen den Tieren implantierten Sender ermittelt und an eine externe Empfangsstation gesendet. Dabei wurden die Daten unter Normalbedingung, Wasserrestriktion und Salzstreß aufgezeichnet.

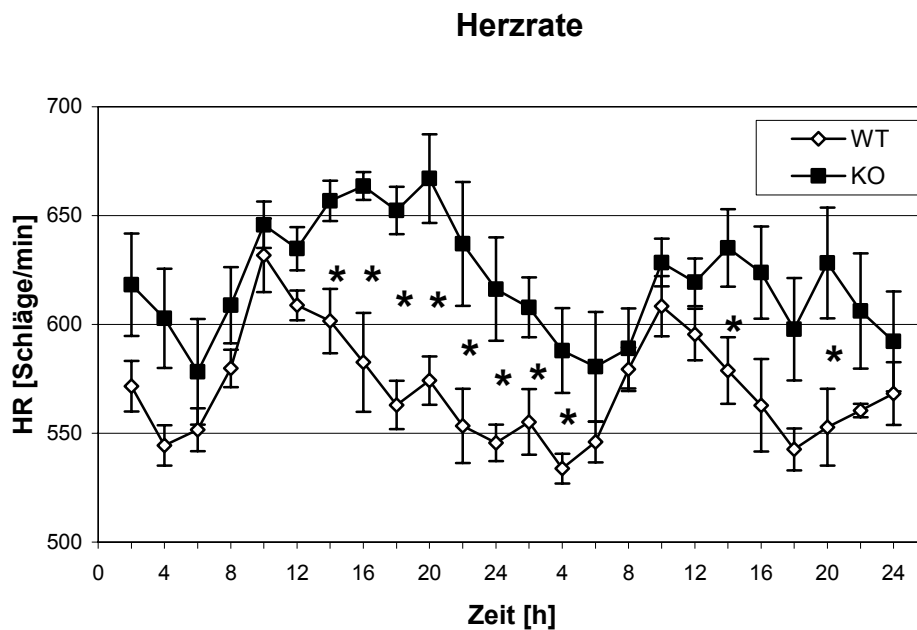


**Diagramm 12** Blutdruckmessung (MAP) der Wildtyp- (WT) und SorLA-defizienten (KO) Tiere bei Normalhaltung und bei Wasserrestriktion. Die Aufzeichnung des gemittelten Blutdrucks (MAP) aus systolischem und diastolischem Blutdruck der Wildtyp- und SorLA-defizienten Tiere zeigte deutliche Unterschiede in der aktiven Phase (Nacht) der unbehandelten Tiere. Die *sorLA*<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen einen signifikant höheren MAP (\*,  $p < 0,05$ , Student t-Test) auf als *sorLA*<sup>+/+</sup>-Mäuse. Unter Wasserentzug nahm der Blutdruck der Kontrolltiere in der Nacht deutlich zu, dies wurde nicht bei den Gen-defizienten Tieren beobachtet. Dargestellte Werte entsprechen Mittelwerten ( $\pm$  Standardfehler).

Im Diagramm 12 ist der Blutdruck über 2 x 24 Stunden aufgetragen. Dabei entspricht der linke Teil (0 – 24 h) dem mittleren arteriellen Blutdruck (mean arterial pressure – MAP) unbehandelter Tiere, der rechte Abschnitt (24 – 24 h) entspricht dem MAP gedursteter Tiere. Es war zu beobachten, daß der MAP für beide Versuchsgruppen im 12 Stunden Rhythmus, also im Tag-Nacht-Rhythmus variierte. In der Nacht, der aktiven Phase der Nager, war er höher als am Tag. Dies entsprach dem natürlichen Biorhythmus der Mäuse. SorLA-defiziente Tiere wiesen einen permanent höheren Blutdruck auf als die Kontrolltiere. In der Nachtphase bei Normalhaltung (hier bei 14, 16, 18, 20, 22 h) war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen signifikant ( $p < 0,05$ ).

Wurde den Tieren das Wasser entzogen, so erhöhte sich in den Kontrolltieren der Blutdruck. SorLA-defiziente Mäuse hingegen waren nicht in der Lage den Blutdruck den veränderten Bedingungen anzupassen und behielten weitestgehend den Basisblutdruck bei.

Ähnlich verhielt es sich bei der gemessenen Herzrate (HR), zu sehen im Diagramm 13. Hier schlug das Herz unbehalteter SorLA-defizienter Tiere nachts mit einer signifikant ( $p < 0,05$  für 14, 16, 18, 20, 22, 24 h) höheren Rate verglichen mit den Wildtypen.



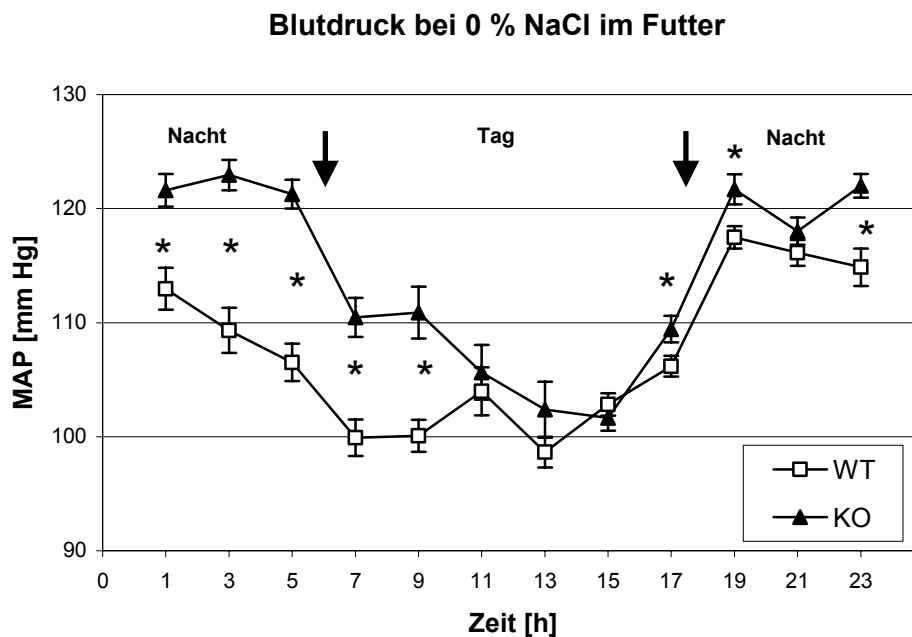
**Diagramm 13 Herzrate (HR) der Kontrolltiere (WT) und SorLA-defizienter Tiere (KO) bei Normalbedingung und Wasserentzug.** Die dargestellte Herzrate zeigte deutliche Unterschiede in der Nachtphase zwischen  $sorLA^{+/+}$ - und  $sorLA^{-/-}$ -Tieren. Das Herz Gen-defizienter Mäuse schlug nachts mit einer signifikant (\*,  $p < 0,05$ , Student t-Test) höheren Frequenz als das der Wildtyp-Mäuse. Wasserentzug bewirkte bei  $sorLA^{+/+}$ -Tieren eine leichte Senkung der Herzrate, die in den  $sorLA^{-/-}$ -Tieren stärker zu beobachten war, hier besonders in der Nachtphase. Dargestellte Werte entsprechen Mittelwerten ( $\pm$  Standardfehler).

Unter Wasserentzugsbedingung war die Herzrate der  $sorLA^{-/-}$ -Tiere noch immer erhöht gegenüber den  $sorLA^{+/+}$ -Tieren, zum Teil signifikant (\*,  $p < 0,05$  für 2, 4, 14, 20 h). Wasserentzug hatte in den Wildtypen eine leichte Senkung der Schlagfrequenz zur Folge. In



SorLA-defizienten Tieren sank die Schlagfrequenz stärker ab, ebenfalls vorrangig in der aktiven Phase (nachts). Es ließ sich im Rahmen dieses Versuchs nicht feststellen, ob die Unterschiede in der Herzrate zwischen den Versuchstiergruppen wesentlich durch den Blutdruck gesteuert wurden und somit nur indirekt durch die *sorLA*-Defizienz hervorgerufen waren, oder ob die Gen-Defizienz direkt Herzraten-regulierende Faktoren beeinflusste.

Als weitere Streßbedingungen wurde der Blutdruck bei Nidrigsalzdiät gemessen. Das entsprach einem Futter mit ca. 0 % NaCl, vergleichbares Standardfutter enthielt 0,25 % NaCl. Das Ergebnis der MAP Messung bei 0 % NaCl ist dargestellt im Diagramm 14.



**Diagramm 14** Blutdruck der Kontrolltiere (WT) und SorLA-defiziente (KO) Tiere bei salzarmer Diät (0 % NaCl). Der Blutdruck der SorLA-defizienten Tiere war mit Ausnahme der Meßwerte 11, 13, 15 und 21 h signifikant (\*,  $p < 0,05$ , Student t-Test) höher als der der Kontrolltiere. Insgesamt war für beide Tiergruppen der Blutdruck bei Salzmenge niedriger als bei Standardfutter. Die angegebenen Werte entsprechen Mittelwerten ( $\pm$  Standardfehler).

Die verminderte Zufuhr von Natrium und Chlorid im Futter führte zur Absenkung des Blutdrucks. Dies wurde für beide untersuchten Tiergruppen beobachtet (Diagramm 14). Dabei

unterschieden sich die MAP signifikant ( $p < 0,05$ ) mit Ausnahme der Meßwerte bei 11, 13, 15 und 21 Stunden. Ähnlich dem MAP unter Standardfutter wurde stets ein höherer Blutdruck für *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tiere gemessen.

Ergebnis der Blutdruck- und Herzratenuntersuchungen ist die Beobachtung, daß SorLA-defiziente Mäuse einen permanent höheren Blutdruck und eine höhere Herzrate aufwiesen. Wasserentzug bewirkte in SorLA-defizienten Tieren, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, keinen Blutdruckanstieg. Im Gegensatz dazu waren sie in der Lage, den Blutdruck bei verminderter Salzzufuhr anzupassen und, ähnlich den Kontrolltieren, zu senken.