

## 4 DISKUSSION

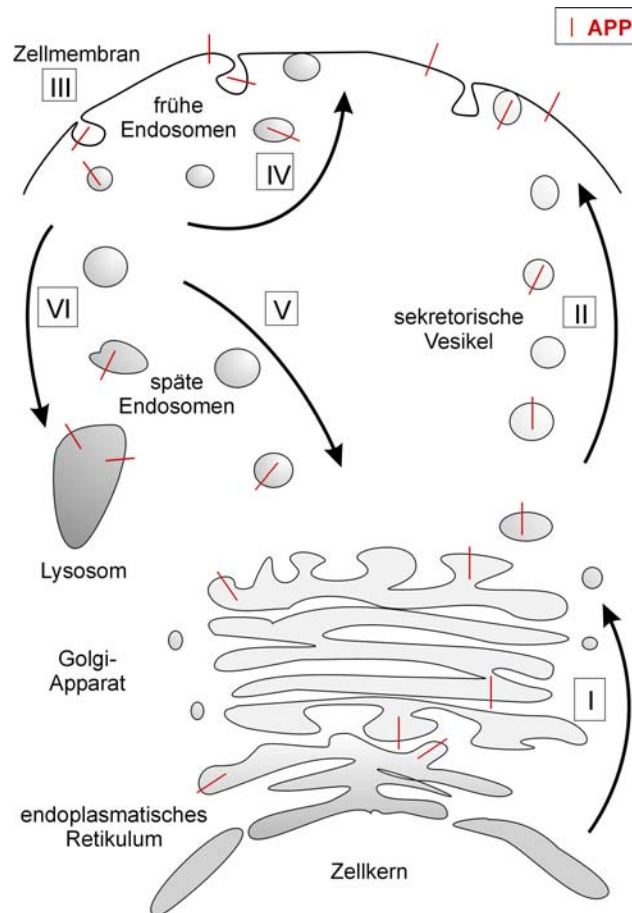
### 4.1 Die Rolle von SorLA in der Alzheimer-Krankheit

Im Rahmen dieser Dissertationsschrift wurde die Funktion eines Sorting-Rezeptors (SorLA) hinsichtlich der Interaktion mit dem Alzheimer-Protein (APP) charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, daß SorLA mit APP *in vitro* und *in vivo* interagiert und daß beide Proteine in Golgi- und endosomalen Kompartimenten kolokalisieren. Es wurde beobachtet, daß die Expression von SorLA im Zellkulturmodell zu veränderter Lokalisation bzw. zu geringerer Exposition von APP an der Plasmamembran führt. Darüber hinaus resultierte die Koexpression beider Proteine in verstärkter Anreicherung des reifen, also des posttranslational modifizierten APP. Schließlich wurde gezeigt, daß SorLA die Prozessierung von APP beeinflusst. In Gegenwart von SorLA war die Proteolyse von APP sowohl durch die  $\alpha$ -, als auch durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase vermindert. Sowohl in Zellkulturstudien als auch im Mausmodell führte die Abwesenheit von SorLA zu vermehrter Bildung von sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$  und  $\beta$ -Amyloid.

APP ist von ganz wesentlicher Bedeutung bei Morbus Alzheimer. Diese Krankheit ist charakterisiert durch intrazelluläre Ablagerungen des Proteins Tau und durch extrazelluläre des  $\beta$ -Amyloid-Peptids (ein Spaltprodukt des APP) im Gehirn der Patienten. Diese Ablagerungen wirken neurotoxisch und führen zum Absterben der umliegenden Neuronen bis hin zu partiellen Ausfällen der betroffenen Gehirnregionen. Symptomatisch macht sich das bemerkbar durch motorische und mentale Störungen der betroffenen Patienten.

Entsprechend der Amyloid-Hypothese ist APP für die Entwicklung der Alzheimer-Krankheit von zentraler Bedeutung, da das  $\beta$ -Amyloid-Peptid nach enzymatischer Spaltung von APP durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase freigesetzt wird. Dies wird auch bezeichnet als der amyloidogene Weg. Dem gegenüber steht der nicht-amyloidogene Weg, gekennzeichnet durch die Spaltung von APP durch die  $\alpha$ -Sekretase. Ausschlaggebend für das Schicksal von APP ist die Lokalisation des Proteins in Zellorganellen, die hohe Aktivität der jeweiligen Sekretasen aufweisen.

Anhand der Abbildung 29 soll kurz auf die einzelnen „Stationen“ der APP-Reifung und – Prozessierung eingegangen werden.



**Abbildung 29 Modell des intrazellulären Transports von APP.** APP gelangt nach posttranslationaler Modifikation im endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat (I) über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche (II). APP-Moleküle, welche die Plasmamembran erreicht haben und hier nicht prozessiert werden, unterliegen der Endozytose (III) und werden anschließend entweder in Lysosomen abgebaut (VI), über den Recyclingweg wieder an die Zelloberfläche transportiert (IV) oder über retrograde Transportwege zurück in den Golgi-Apparat transportiert (V). Nicht-amyloidogene Prozessierung findet hauptsächlich an der Zelloberfläche statt, wo die  $\alpha$ -Sekretase schneidet. Amyloidogene Prozessierung involviert den Transport durch endozytotische Vesikel, wo APP auf die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase trifft (modifiziert aus Vetrivel und Thinakaran, 2006).

APP wird nach posttranslationalen Modifikationen (N-Glykosylierung im ER, O-Glykosylierung im Golgi-Apparat; I) über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche transportiert (II). Hier wird APP durch die  $\alpha$ -Sekretase prozessiert, infolge dessen sAPP $\alpha$  und

CTF $\alpha$  freigesetzt werden. Unprozessiertes APP wird nach Internalisierung in Endosomen transportiert (III). Ein Teil des endozytierten APP wird recycelt und gelangt so wieder an die Zelloberfläche (IV). APP, das nicht recycelt wurde, gelangt über Endosomen entweder in den Golgi-Apparat (V) oder wird zum Proteinabbau in Lysosomen transportiert (VI). Hohe  $\beta$ -Sekretaseaktivität, die APP zu sAPP $\beta$  und CTF $\beta$  spaltet, liegt in sauren Kompartimenten vor, also vorrangig in Endosomen und im *trans*-Golgi-Netzwerk. Die  $\gamma$ -Sekretase hingegen ist im *trans*-Golgi-Netzwerk, späten Endosomen und zum geringen Teil auch im ER aktiv. Sie führt zur Spaltung des CTF $\beta$  in  $\beta$ -Amyloid und CTF $\gamma$  (Vetrivel und Thinakaran, 2006). Schließlich wird  $\beta$ -Amyloid aus der Zelle ausgeschieden und kann entweder bei verminderten Proteinabbauraten oder bei vermehrter Amyloid-Produktion extrazellulär aggregieren und so die Basis für  $\beta$ -Amyloid-Plaques bilden.

Im Zuge dieser Arbeit stellte sich die Frage, inwiefern SorLA, als Mitglied einer Sorting-Rezeptorgenfamilie, in die Transport- und Prozessierungskaskade von APP eingreift. Nachfolgend werden die gewonnenen Daten in Bezug auf die SorLA-APP-Bindung und die einzelnen Transport- und Prozessierungsschritte im Kontext mit der bisherigen Literatur diskutiert.

#### 4.1.1 SorLA-APP-Interaktion

Das extrazelluläre Segment von SorLA weist Strukturen auf, die auf Ligandenbindung schließen lassen (siehe Abbildung 2). Bisher bekannte Liganden, die an SorLA bzw. an die Vps10p-Domäne von SorLA binden, sind das Propeptid des Rezeptors, das Head Activator-Peptid (HA) und Neurotensin. Liganden, die an der CR-Domäne binden, sind Apolipoprotein E (ApoE), Lipoproteinlipase (LpL) und ein Chaperon der low-density lipoprotein (LDL) - Rezeptorgenfamilie, das Rezeptor-assoziierte Protein (RAP) (Jacobsen et al., 2001). Unter Verwendung der SPR-Analyse ließ sich die Bindung von APP am extrazellulären Teil von SorLA nachweisen und durch die Zugabe von RAP inhibieren (3.1.1). Dies ließ die Vermutung zu, daß SorLA über die CR-Domäne mit APP interagiert, da bereits 2001 Jacobsen et al. die Beobachtung machten, daß RAP Ligandenbindung der CR-Domäne inhibieren kann, da dies gleichfalls die Bindungsdomäne für RAP ist.

Eine erst kürzlich erschienene Publikation unserer Arbeitsgruppe (Andersen et al., 2006) charakterisierte den entsprechenden Interaktionsbereich des APP ebenfalls mit Hilfe der SPR-Analyse. Für diese Studien wurden sogenannte Rezeptorfragmente verwendet, die aus einzelnen bzw. aus Kombinationen der extrazellulären Domänen von APP bestanden. Die Ergebnisse der Studie bestätigten die hier aufgestellte Vermutung. SorLA und APP interagieren über die CR-Domäne (SorLA) und die Carbohyrate-Domäne bzw. zum geringen Teil auch über die GFL-Domäne (beide APP, siehe Abbildung 3).

Interessanterweise ist die CAPP-Domäne (Teil der Carbohyrate-Domäne) über viele Spezies (Mensch, Maus, Huhn, Frosch, Zebrafisch) konserviert und auch innerhalb der APP/APLP-Genfamilie weitestgehend erhalten geblieben (Dulubova et al., 2004). Dies spricht also für eine Domäne, die für die physiologische Funktion von APP von wesentlicher Bedeutung zu sein scheint.

Genau aber die APP-Domänen, die mit SorLA interagieren (Carbohyrate- und GFL-Domäne), wurden 2001 von Scheuermann et al. als relevante Bindungsstellen für die Dimer- und Tetramerisierung von APP beschrieben. Scheuermann et al. zeigten erstmals in SH-SY5Y-Zellen, daß APP neben dem Monomer als Dimer und Tetramer vorliegt. Das von ihnen postulierte Modell besagt, daß durch die Bindung zweier APP-Moleküle an der GFL-Domäne die Basis für ein APP-Dimer geschaffen wird. Eine weitere Vernetzung zweier Dimere über die Carbohyrate-Domänen führt zur Ausbildung von Tetrameren.

Die Existenz von Homo- und Heterodimeren aus APP und weiteren Mitgliedern der Genfamilie, dem APLP1 und APLP2, beobachteten Soba et al. (2005) im Zellkultur- und Mausmodell. Sie konnten eine laterale Dimerisierung (zwischen zwei benachbarten Molekülen) vorwiegend in intrazellulären Kompartimenten zeigen, Kontakte zwischen angrenzenden Zellen wurden durch *trans*-zelluläre Interaktionen (zwischen sich gegenüberliegenden Proteinen) ausgebildet. Ausgehend von der neuronalen Verteilung einerseits von APP und APLP2 an der Präsynapse (Yamazaki T. et al., 1995; Lyckmann et al., 1998) und in Zellwachstumskegeln (Berher et al., 1999) und andererseits der Lokalisation von APLP1 im postsynaptischen Teil des Neurons, könnte die *trans*-zelluläre Interaktion dieser Moleküle wesentlich in die Regulation der Ausbildung von synaptischen Zellkontakten (Synaptogenese) involviert sein. Untermauert wird diese mögliche physiologische Rolle der

APP/APLP-Genfamilie durch Untersuchungen an Mäusen, die defizient waren für APP und APLP2 (Wang et al., 2005). Hier wurden Defekte der Synaptogenese beobachtet.

Eine Interaktion von SorLA mit APP schließt möglicherweise aus, daß APP dimerisiert. Zum einen, weil für die SorLA-APP-Interaktion genau die Bindungsstellen essentiell sind, die für die Dimerisierung von Bedeutung sind. Zum anderen, weil für die SorLA-APP-Bindung ein stöchiometrischer Komplex von 1:1 mittels analytischer Ultrazentrifuge nachgewiesen wurde (3.1.2). Dieser besagt, daß ein SorLA-Molekül mit nur einem APP-Molekül eine Bindung eingeht. Das würde bedeuten, daß durch die Interaktion von APP mit SorLA eventuell weniger APP-Moleküle zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zur Verfügung stehen und dies eine verminderte Zelladhäsion bzw. Synaptogenese zur Folge hätte.

Hier bedarf es weiterführender Versuche, die das Adhäsionsverhalten SorLA-positiver Zellen untersuchen, um diese Hypothese zu prüfen.

#### **4.1.2 Einfluß von SorLA auf den APP-Transport**

Ausgehend von einer direkten SorLA-APP-Interaktion galt mein Interesse der Frage, wo bzw. bei welchem Transport- und Prozessierungsschritt diese stattfindet und welchen Einfluß sie auf das Schicksal von APP hat.

##### ***Schritt I: APP-Glykosylierung im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat***

In Zellkulturstudien wurde beobachtet, daß die Koexpression von APP und SorLA zu höheren Mengen an posttranslational modifiziertem, also glykosyliertem APP führt, bei gleichzeitig unveränderter Menge des nicht-glykosylierten APP (3.1.4.3). Ausgehend davon, daß die Reifung von APP sowohl im ER (N-Glykosylierung) als auch im Golgi-Apparat (Sulfatierung und O-Glykosylierung) stattfindet (Weidemann et al., 1989; Knops et al., 1993; Suzuki et al., 1994) und basierend auf den Ergebnissen der Kolokalisationsstudie von APP und SorLA im Golgi (3.1.3.2, 3.1.3.3, 3.1.4.2), ließe sich der beobachtete Effekt damit erklären, daß APP nach Reifung im ER und Golgi-Apparat im letzteren durch SorLA gebunden und vor Weiterprozessierung zurückgehalten wird. Diese Vermutung wird gestützt durch eine c-terminale Aminosäuresequenz von SorLA, die zur Golgi-Retention des Rezeptors führt.

Mutationen dieser Sequenz im Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR), einem Rezeptor, der lysosomale Enzyme aus dem TGN in prälysosomale Endosomen transportiert, führte zu fehlerhafter Lokalisation und verstärkter Exposition von M6PR an der Zelloberfläche (Bonifacino und Traub, 2003).

Das würde bedeuten: eine APP-Bindung durch SorLA im Golgi-Apparat hätte zur Folge, daß weniger APP-Moleküle an die Zelloberfläche wandern und dementsprechend auch nicht für nachfolgende Prozessierungskaskaden zur Verfügung stünden.

Somit hat zwar SorLA keinen Einfluß auf die APP-Reifung, bewirkt aber bei Koexpression beider Proteine eine scheinbare Erhöhung der glykosylierten APP-Menge, einfach durch Reduzierung der APP-Prozessierung und damit des Proteinabbaus. Dieses Modell wurde bestätigt durch die Analyse der APP-Stoffwechselprodukte in SorLA-positiven und –negativen Zellen (3.1.4.4). Hier wurde beobachtet, daß durch die Koexpression mit SorLA die APP-Prozessierung reduziert war, gemessen anhand der Menge des sezernierten sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$  und  $\beta$ -Amyloids. Parallel dazu war bei der Analyse des SorLA-defizienten Mausmodells zu beobachten, daß die Abwesenheit des Rezeptors *in vivo* zu verstärkter Prozessierung von APP führte, nachgewiesen durch vermehrte Bildung des sAPP $\alpha$  und  $\beta$ -Amyloids (3.1.5.4).

Dieses Modell der verminderten APP-Proteolyse durch Retention im Golgi-Apparat läßt sich nachahmen durch die Behandlung von Zellen mit Brefeldin-A, einem Stoffwechselprodukt des Pilzes *Eupenicillium brefeldianum*. Brefeldin-A löst scheinbar den Golgi-Apparat auf. Dies geschieht durch Fusion des Golgis mit dem endoplasmatischen Retikulum und der Fusion des Trans-Golgi-Netzwerks mit dem endosomalen System (Pelham, 1991). Abnormale Glykosylierung des APP, aber eben auch verminderte Produktion und Sekretion der APP-Fragmente (sAPP,  $\beta$ -Amyloid und p3) wurden in Brefeldin-A-behandelten Zellen bzw. im Zellmedium beobachtet (Caporaso et al., 1992; Haass et al., 1993).

Der Effekt der Befeldin-A-Behandlung ist allerdings nicht ganz vergleichbar mit dem der SorLA-positiven Zellen. In SorLA-positiven Zellen wurde zwar auch eine Abnahme der APP-Prozessierungsprodukte (sAPP $\alpha/\beta$ ,  $\beta$ -Amyloid) verzeichnet, darüberhinaus aber eine Zunahme des reifen APP beobachtet. In dem oben genannten Beispiel liegt jedoch eine abnormale Glykosylierung bzw. eine nicht-vollständige Glykosylierung des APP vor. Dieser

Unterschied ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß SorLA keinen Einfluß auf die im ER und Golgi-Apparat stattfindenden Reifungsprozesse hat, sondern lediglich den Transport des glykosylierten, gereiften APP aus dem Golgi-Apparat unterbindet. Wohingegen die Brefeldin-A-induzierte Resorption des Golgi-Apparats in das ER wahrscheinlich eine Beeinträchtigung der Funktionen dieser Kompartimente zur Folge hat, was sich in abweichender Proteinreifung äußert.

### ***Schritt II: SorLA- und APP-Interaktion auf dem sekretorischen Weg***

Der APP-Reifung im ER und Golgi folgt der Transport über den sekretorischen Weg hin zur Zellmembran. Bereits in sekretorischen Vesikeln, aber hauptsächlich an der Zelloberfläche, erfolgt die enzymatische Spaltung durch die  $\alpha$ -Sekretase. Würde eine Interaktion von SorLA und APP im sekretorischen Transportweg stattfinden und dadurch zur Folge haben, daß verstärkt APP an die Zelloberfläche transportiert würde, hätte das Auswirkung auf die Zelloberflächen-Exposition von APP und die damit einhergehende verstärkte Prozessierung. Da SorLA-APP-Kolokalisation mehrheitlich in Golgi-Kompartimenten nachgewiesen wurde und darüber hinaus keine stärkere Membranexposition von APP beobachtet wurde (Abbildung 9, Abbildung 13, Abbildung 14), kann ausgeschlossen werden, daß SorLA den sekretorischen APP-Transport dahingehend beeinflusst, daß dieser verstärkt wird.

Das Modell des induzierten, also verstärkten sekretorischen Transports der Golgi-Vesikel an die Zelloberfläche läßt sich zum Teil bei Phorbolster-behandelten Zellen beobachten. Phorbolster aktivieren die Proteinkinase-C (PKC), welche wiederum die Formierung sekretorischer Vesikel aus dem *trans*-Golgi-Netzwerk verstärkt und somit zu einem gesteigerten Transport von APP an die Zellmembran führt. Daraus folgt eine vermehrte  $\alpha$ -Sekretasen-Prozessierung von APP an der Plasmamembran, einhergehend mit gesteigerter Freisetzung von sAPP $\alpha$  ins Zellmedium (Caporaso et al., 1992; Xu et al., 1995 und 1996). Jedoch nicht gänzlich geklärt ist die Wirkung der Phorbolster auf den Transport und die Prozessierung von APP. Arbeiten unter anderem von Caporaso et al. (1992), Buxbaum et al. (1993), Gabuzda et al. (1993) beobachteten neben gesteigerter sAPP $\alpha$ -Bildung auch niedrigere  $\beta$ -Amyloidkonzentrationen in den behandelten Zellen.

Savage et al. (1998) hingegen, injizierten Phorbolster in Mäuse und untersuchten die Abbauraten von APP und seinen Stoffwechselprodukten. Sie beobachteten unveränderte

sAPP $\alpha$ -Mengen bei gleichzeitig niedrigeren Konzentrationen von sAPP $\beta$  und  $\beta$ -Amyloid. Erklärungsversuche diesbezüglich bleiben widersprüchlich. Vermutlich wirkt PKC auf verschiedene Weise. Zum einen verstärkt sie die Vesikelformierung und deren Transport aus dem TGN zur Zellmembran. Zum anderen beeinflusst PKC die Prozessierung von APP. Das geschieht jedoch nicht direkt, sondern wirkt durch Phosphorylierung anderer Substrate indirekt auf die APP-Prozessierung und begünstigt so den nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg auf Kosten des amyloidogenen Weges (Gabuzda et al., 1993).

### ***Schritt III: SorLA ist kein Endozytoserezeptor für APP und $\beta$ -Amyloid***

APP-Moleküle, welche die Zellmembran erreicht haben, werden hauptsächlich durch die  $\alpha$ -Sekretase prozessiert. Nur ein Bruchteil der Moleküle durchläuft die Proteolyse durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase. Voraussetzung für die  $\beta$ -/ $\gamma$ -Spaltung ist die Endozytose der nicht-prozessierten Moleküle. Kommt es zur Inhibierung oder Forcierung der Endozytose von APP, so spiegelt sich das wieder in der Menge der jeweiligen Stoffwechselend- und Zwischenprodukte.

Würde z. Bsp. SorLA die Internalisierung von APP begünstigen, würde sich das in stärkerer amyloidogener Prozessierung von APP niederschlagen. Dies wäre nachweisbar durch gesteigerte Mengen an sAPP $\beta$  und/oder  $\beta$ -Amyloid. Weder hohe sAPP $\beta$ -Mengen noch hohe  $\beta$ -Amyloid-Konzentrationen wurden im Medium SorLA-überexprimierender Zellen nachgewiesen. Hingegen wurden die Mengen an sAPP $\beta$  als auch an  $\beta$ -Amyloid im Zellmedium SorLA-positiver Zellen in geringeren Konzentrationen nachgewiesen als im Medium SorLA-negativer Zellen (3.1.4.4). Parallel dazu wurden im SorLA-defizienten Mausmodell größere Mengen des  $\beta$ -Amyloidpeptids gemessen (3.1.5.4).

Damit unterscheidet sich die Funktion von SorLA grundsätzlich von der des verwandten LDL receptor-related protein (LRP). LRP ist in einer Reihe von APP-Prozessierungsschritten involviert. Neben der Endozytose des zellmembranständigen APP und des sAPP, ist die Freisetzung von sAPP und  $\beta$ -Amyloid LRP-abhängig (Knauer et al., 1996; Kounnas et al., 1995; Ulery et al., 2000; Pietrzik et al., 2002 und 2004). Dabei bindet LRP nicht direkt an APP, sondern interagiert über das Adaptorprotein Fe65 mit dem Alzheimer-Protein (Trommsdorff et al., 1998). Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen LRP und SorLA liegen zwar



vor (CR-cluster, EGF-homology domain, Transmembrandomäne, Internalisierungssequenz im c-terminalen Bereich), auch Gemeinsamkeiten bezüglich der Liganden wurden beobachtet (Lipoproteinlipase, RAP, ApoE, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Komplex) (Jacobsen et al., 2001; Gliemann et al., 2004; Chappell et al., 1992; Beisiegel et al., 1989; Nykjaer et al., 1992; Kounnas et al., 1992). Eine physiologische Endozytose-Funktion von SorLA ließ sich jedoch bisher nicht nachweisen. Jacobsen et al. (2001) hatten zwar beobachtet, daß SorLA durchaus in der Lage ist, Liganden (hier radioaktiv-markiertes SorLA-Propeptid) im Zellkulturmodell zu binden und zu endozytieren, in nachfolgenden Arbeiten wurde die Internalisierung weiterer Liganden jedoch nicht beobachtet. So hatten z. Bsp. Gliemann et al. (2004) trotz spezifischer Bindung des „urokinase-like plasminogen activator“ (uPA)-Inhibitor-Komplex und „platelet-derived growth factor-BB“ (PDGF-BB) an SorLA keine Rezeptor-abhängige Endozytose dieser beobachtet. Ein ähnliches Resultat erzielten Spoelgen et al. (2006) bei der Untersuchung der APP-Endozytose in Abhängigkeit von SorLA. Hier wurde in CHO-Zellen kein Unterschied für die Internalisierung des Biotin-markierten APP zwischen SorLA-positiven und -negativen Zellen beobachtet. Auch die Lokalisation des SorLA-Rezeptors spricht eher für eine vernachlässigbare Rolle bei der Endozytose von Liganden, da nur ein Bruchteil (~ 10 %) der Gesamtmenge der SorLA-Moleküle an der Zelloberfläche vorliegt. Der weitaus größere Teil (~ 90 %) liegt in Endosomen und im TGN vor. Dies hatten Jacobsen et al. (2001) mittels Markierung der Zelloberflächenproteine in Zellkulturstudien nachgewiesen.

LRP hingegen liegt hauptsächlich in endosomalen Kompartimenten und an der Zellmembran vor, hier nachgewiesen in Leberzellen der Ratte (Lund et al., 1989).

Eine ganz wesentliche Rolle bei der Endozytose von APP spielt dessen c-terminale Internalisierungssequenz, „YENPTY“, welche die Abfolge der Aminosäuren Tyrosin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Prolin, Threonin und Tyrosin beschreibt. YENPTY ist in einer Reihe von Endozytoserezeptoren vertreten. Beispiel hierfür sind der Transferrin- und LDL-Rezeptor (Chen et al., 1990; Collawn et al. 1990). YENPTY ist essentiell bei der Internalisierung über Clathrin-coated pits. Mutationen in diesem Bereich beeinträchtigen die Endozytose und haben im Fall von APP geringere endosomale-lysosomale APP-Prozessierung zur Folge. Dies wirkt sich ebenfalls auf die Bildung von  $\beta$ -Amyloid aus. Arbeiten von Koo und Squazzo (1994) sowie von Perez et al. (1999) beobachteten geringere

$\beta$ -Amyloid-Konzentrationen im Medium von Zellen, die eine APP<sub>YENPTY</sub>-Mutante exprimierten.

Aber auch die Expression einer dominant-negativen Mutante des Dynamins, welche Dynamin-vermittelte Prozesse wie die Clathrin-abhängige Endozytose oder die Separation endozytotischer Vesikel von der Zellmembran inhibiert (Damke et al., 1994; Henley et al., 1998), hatte Auswirkung auf die APP-Prozessierung. Sie führte z. Bsp. in HEK-Zellen zu verstärkter Zellmembranexposition des APP, darüberhinaus zu vermehrter Bildung von sAPP $\alpha$  und verminderter Bildung von  $\beta$ -Amyloid als Folge der negativ-beeinträchtigten Endozytose und der längeren Verweilzeit von APP an der Plasmamembran (Carey et al., 2005).

In Alzheimer-Patientenmaterial wurde wiederum verstärkte Endozytose nachgewiesen. Cataldo et al. (1997) untersuchten Neuronen von Patienten, die an der sporadischen Form der Alzheimer-Krankheit erkrankten und beobachteten stark vergrößerte frühe Endosomen mit hoher Rab5 (rat sarcoma/ras-like protein in brain)-Expressionrate. Frühe Endosomen sind, nach Einstülpung der Plasmamembran, die ersten Kompartimente des endozytotischen Stoffwechselweges und geben durch ihre Größe und das Rab5-Expressionsniveau Auskunft über die Endozytoserate (Gorvel et al., 1991; de Hoop et al., 1994).

Diese Beispiele zeigen, daß verstärkte Endozytose einhergeht mit vermehrter  $\beta$ -Amyloid-Bildung bzw. mit einem größeren Risiko die Alzheimer-Krankheit zu entwickeln. Analog dazu hat Endozytose-Inhibition protektiven Charakter.

Hingegen zeigen Daten von Chyung und Selkoe (2003), daß die Beeinträchtigung der Endozytose in HeLa-Zellen (humane Zervix-Zelllinie) durch eine dominant-negative Dynamin-Mutante neben verstärkter APP-Exposition an der Zelloberfläche und sAPP $\alpha$ -Bildung auch zu vermehrter  $\beta$ -Amyloid-Bildung führen kann. Hier vermutet man  $\gamma$ -Sekretasenkomplexe auch an der Zellmembran von HeLa-Zellen, die bei längerer Verweilzeit von APP an der Zelloberfläche zu verstärkter amyloidogener Prozessierung führen.

Daten von Yao et al. (2003) wiesen wiederum verminderte Protein- und mRNA-Konzentrationen für Dynamin im Gehirn von Alzheimer-Patienten nach. Hier greift wahrscheinlich ein Mechanismus, der auch von Kelly et al. (2005) beobachtet wurde. Sie konnten belegen, daß  $\beta$ -Amyloid für die Degeneration von Dynamin1 verantwortlich ist.

Primärzellkulturen aus murinen hippocampalen Neuronen wiesen nach Inkubation mit  $\beta$ -Amyloid deutlich geringere Dynamin-Konzentrationen als Kontrollkulturen auf. Kelly et al. postulieren, daß dieser Prozess noch vor Auftreten neuronaler Abbauprozesse und Synapsendegeneration stattfindet.

Arbeiten wie diese zeigen, daß die molekularen Mechanismen, die der Alzheimer-Krankheit zugrunde liegen, komplex sind und daß Ergebnisse bei Verwendung unterschiedlicher Zellsysteme und Methoden stark variieren und zum Teil widersprüchlich sein können.

Ebenfalls ausgeschlossen werden kann eine Endozytose-Funktion von SorLA für  $\beta$ -Amyloid. Dies beruht auf den Ergebnissen der SPR-Analyse. Hier wurde keine Bindung zwischen dem Rezeptor und dem  $\beta$ -Amyloidpeptid nachgewiesen (3.1.1). Das strukturell ähnliche LRP hingegen, neben der APP-Endozytose auch verantwortlich für die Internalisierung und den Abbau von  $\beta$ -Amyloid, bindet und endozytiert einen Serumproteasen-Inhibitor, das  $\alpha_2$ -Makroglobulin. Dieses wiederum komplexiert mit  $\beta$ -Amyloid und gewährleistet so die LRP-abhängige Endozytose.  $\alpha_2$ -Makroglobulin ist ebenfalls Bestandteil der  $\beta$ -Amyloid-Plaques im Gehirn der Alzheimer-Patienten (Van Gool et al, 1993; Narita et al., 1997).

#### ***Schritt IV: SorLA als Mediator des Recyclingweges***

Wenig ist bisher über die Relevanz des Recyclingweges für die APP-Prozessierung bekannt. Eventuell kann mit Hilfe permanent zirkulierender APP-Moleküle, neben der Regulation auf mRNA-Ebene, eine zusätzliche Möglichkeit geboten werden, die ein schnelleres Anpassen der zur Verfügung stehenden APP-Menge an den Bedarf gestattet. Yamazaki T. et al. (1996) beschrieben erstmals den Recyclingtransport des zellmembranständigen APP in CHO-Zellen. Sie konnten schon binnen 5-10 min nach APP-Internalisierung die Moleküle wieder an der Zelloberfläche detektieren. Ob SorLA am Recycling von APP mitwirkt, ist schwierig zu beurteilen. Auszuschließen wäre es nicht, da sowohl der Rezeptor als auch APP an der Zelloberfläche und in frühen endosomalen Vesikeln nachgewiesen wurden (Abbildung 11, Abbildung 19) und Yamazaki T. et al. postulierten, daß APP-Recycling über Endosomen erfolgt. Jedoch wurde die weitaus größere Menge der SorLA-Moleküle in perinukleären

Kompartimenten beobachtet, was eine Funktion im Recycling-Transport von eher geringer Bedeutung darstellt.

Aufschluß darüber würden weitere Untersuchungen der Proteine nach dem Protokoll von Yamazaki T. et al. (1996) geben, welches den Transport von „frisch“ endozytiertem APP und SorLA durch vorherige Markierung beider ermöglicht.

#### ***Schritt V: SorLA als Vermittler des retrograden APP-Stoffwechselweges***

SorLA könnte den Transport des reinternalisierten APP aus frühen Endosomen zurück in den Golgi-Apparat forcieren. Diese Vermutung basiert zum einen auf der hier nachgewiesenen Kolo-kalisation von SorLA und APP in frühen endosomalen Vesikeln und Golgi-Kompartimenten, zum anderen auf der Beobachtung, daß SorLA Proteine der „Golgi-associated, gamma-ear containing, ARF-binding protein“ (GGA)-Genfamilie (GGA1, GGA2) am c-terminalen Bereich bindet (Jacobsen et al., 2002). Mitglieder der GGA-Genfamilie sind vorrangig involviert in den gerichteten Transport sekretorischer Vesikel aus dem Golgi-Apparat in Endosomen oder Lysosomen, auch bezeichnet als anterograde Transport (Ghosh et al., 2004). Erste Vermutungen bezüglich der Beteiligung der GGA-Proteine am retrograden Transport, also dem Transport der Endosomen zum Golgi-Apparat, konnten He et al. (2005) und Wahle et al. (2005) beobachten. Wahle et al. untersuchten den GGA-abhängigen Transport der  $\beta$ -Sekretase (BACE1) in HEK-Zellen und zeigten, daß GGA1 verantwortlich ist für den retrograden Transport von reinteranalisierte phosphorylierte BACE1 aus endosomalen Kompartimenten in TGN-Vesikel. Dieser Prozeß war phosphorylierungsabhängig, das heißt, nicht-phosphorylierte BACE1 der Endosomen wurde nicht in Golgi-Vesikel, sondern zurück an die Zellmembran recycelt.

Es wäre also möglich, daß SorLA über Adaptorproteine wie GGA1 und/oder GGA2 für den retrograden Transport von APP zuständig ist. Dies könnte in Neuronen relevant sein bei der Wiederbereitstellung der APP-Moleküle nach anterograden Transportprozessen. 2001 beschrieben Kamal et al. APP als neuronales Transportprotein. Das Protein ist einerseits verbunden mit dem Motorprotein Kinesin, andererseits mit Transportvesikeln und sorgt so für den gerichteten Transport dieser Vesikel aus dem Zellkörper entlang der Nervenfasern hin zur Präsynapse. Denkbar wäre ein SorLA-abhängiger retrograder Transport der nicht-

prozessierten APP-Moleküle aus der präsynaptischen Nervenendigung zurück zum Zellkörper, welcher somit die Wiederbereitstellung des Rezeptors gewährleisten würde.

### ***Schritt VI: Lysosomaler Transport von APP***

Eine Rolle von SorLA am lysosomalen Transportweg von APP ist nicht näher untersucht worden. Ausgehend davon, daß c-terminale Sortierungssignale, welche auf lysosomalen Transport hinweisen („YXXØ“: Y - Tyrosin, X – irgendeine Aminosäure, Ø - Methionin oder Leucin; bzw. „DEXXXLLI“: D – Asparaginsäure, E – Glutaminsäure, L – Leucin, I – Isoleucin; Bonifacino und Traub, 2003), nicht innerhalb des intrazellulären Bereichs des Rezeptors vorliegen, ist die Wahrscheinlichkeit für eine Rolle von SorLA bei diesem gerichteten APP-Transport gering.

Hingegen wurde von Small et al. (2005) eine interessante These bezüglich des APP-Transports und der Funktion von SorLA aufgestellt. Sie untersuchten Gehirnmateriale (entorhinaler Bereich) von Alzheimerpatienten und gesunden Menschen mittels differentieller Genexpressionsanalyse und erhielten unter anderem für ein Protein des Retromer-Komplexes, das „vacuolar protein sorting 35 protein“ (Vps35p), signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Der Retromer-Komplex, erstmals beschrieben im Hefeorganismus (Paravicini et al., 1992; Seaman et al., 1997; Nothwehr et al., 1997), ist eine Gruppe von Proteinen, die für den retrograden Transport des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors (M6PR) aus prälysosomalen Vesikeln zurück zum TGN verantwortlich ist. Er baut sich im Säugerorganismus aus Vps35p, Vps29p, Vps26p, Vps17p und „sorting-nexin 1/2“ (SNX1/2), dem Säugerhomolog des Hefeproteins Vps5p, auf. M6PR selbst (das Säugerhomolog zum Hefeprotein Vps10p), ist zuständig für den gerichteten Transport lysosomaler Hydrolasen aus dem TGN hin zu prälysosomalen Endosomen.

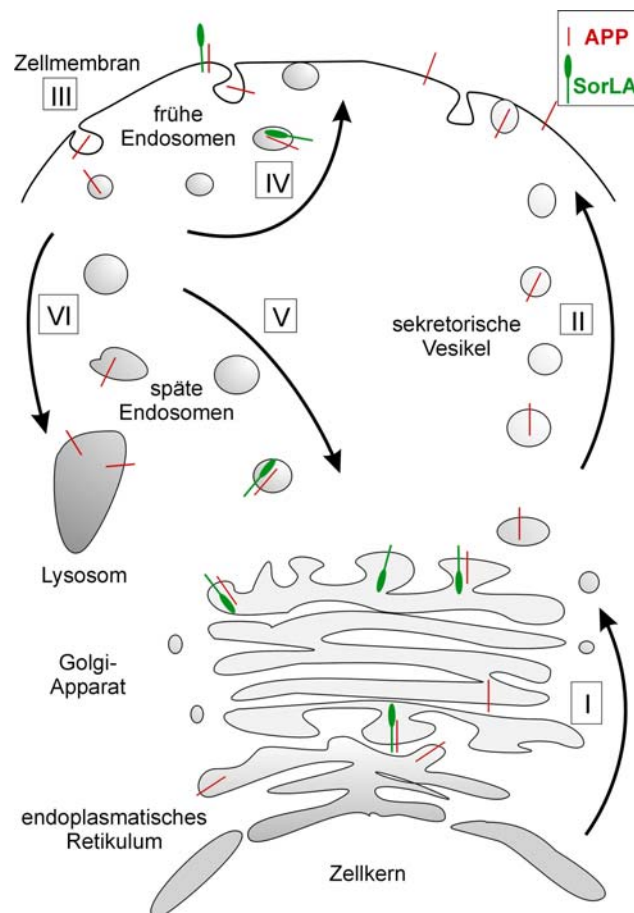
Basierend zum einen auf den Daten von Seaman et al. (2004), die durch die Expression einer Vps26p-Mutante in HeLa-Zellen eine fehlerhafte Lokalisation von Sortilin beobachteten (einem weiteren Protein der Vps10p-Genfamilie, der auch SorLA angehört) und zum anderen auf den Daten von Motoi et al. (1999), die sehr hohe SorLA-Expressionsraten in der entorhinalen Gehirnregion nachwiesen, postulieren Small et al., daß die Retromer-

Fehlfunktion in diesen Patienten einen fehlerhaften Transport von SorLA zur Folge hatte. Das wirkte sich wiederum auf den APP-Transport aus und führte dazu, daß APP vermehrt in Endosomen fehlgeleitet und dadurch verstärkt durch die  $\beta$ -Sekretase prozessiert wurde. Dies würde schließlich zu höheren  $\beta$ -Amyloidkonzentrationen in den Patienten führen.

Daten bezüglich der Interaktion von SorLA mit Proteinen des Retromer-Komplexes liegen bisher nicht vor. Weiterführende Untersuchungen diesbezüglich sind daher von großem Interesse.

#### 4.1.3 Schlußfolgerung

Die Ergebnisse der hier vorliegenden APP-Prozessierungsstudien zusammen mit der bisherigen Literatur legen den Schluß nahe, daß der Einfluß von SorLA auf die APP-Prozessierung bzw. auf den APP-Transport im wesentlichen durch 2 Aspekte gestützt wird.



**Abbildung 30** Schematische Darstellung der SorLA-APP-Interaktion in der Zelle. Die Interaktion von SorLA und APP findet zum einen nach posttranslationaler Modifikation (I) im Golgi-Apparat statt und hat zur

Folge, daß weniger APP-Moleküle den Golgi-Apparat über den sekretorischen Weg (II) verlassen. Darüber hinaus kann SorLA an der Zellmembran auf APP treffen und eventuell in Recycling-Prozesse (IV) involviert sein oder aber den retrograden Transport von APP zum Trans-Golgi-Netzwerk unterstützen (V). Eher unwahrscheinlich ist eine Beteiligung von SorLA beim Transport des Alzheimer-Proteins hin zu Lysosomen (VI) (modifiziert aus Vetrivel und Thinakaran, 2006).

1. SorLA fungiert als Golgi-Anker für APP und „entläßt“ weitaus weniger APP-Moleküle aus dem Golgi-Apparat über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche (Abbildung 30, I). Dadurch wird die an der Zellmembran exponierte APP-Menge gesenkt, was verminderte APP-Prozessierung sowohl durch die  $\alpha$ -Sekretase als auch durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase zur Folge hat.

2. SorLA vermittelt über die Bindung an GGA-Proteinen den retrograden Transport von APP zum Golgi-Apparat (Abbildung 30, V). Dies ist von wesentlicher Bedeutung für die Wiederbereitstellung von APP-Molekülen im TGN.

#### 4.1.4 Ausblick

Eine gänzlich andere Möglichkeit des Einflusses von SorLA auf die APP-Prozessierung beobachteten Spoelgen et al. (2006). Ihnen war es gelungen, die Interaktion von SorLA mit der  $\beta$ -Sekretase (BACE) nachzuweisen. In der Koimmunpräzipitation aus N2a-Zellextrakt ließ sich SorLA über die BACE-Präzipitation bzw. BACE über die SorLA-Präzipitation detektieren. Desweiteren wurde mit Hilfe der „Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer“ (FRET)-Methode in den selben Zellen nachgewiesen, daß die Interaktion von BACE mit APP durch die Koexpression von SorLA gestört wurde. Spoelgen et al. postulieren, daß durch die Bindung von SorLA an BACE die Sekretasenaktivität gegenüber APP reduziert wird.

In eine andere, dennoch überaus interessante Richtung lenkten Böhm et al. (2006) den Blick. In ihrer erst kürzlich veröffentlichte Studie untersuchten sie die Proteolyse von SorLA durch den  $\gamma$ -Sekretasenkomplex. Anhand von Zellkulturstudien und mit Hilfe von kurzen SorLA-Rezeptor-Fragmenten wurde die enzymatische Spaltung von SorLA durch die  $\gamma$ -Sekretase nachgewiesen. Das Ergebnis dieser Studie ist überraschend. SorLA entließ nach Proteolyse durch die  $\gamma$ -Sekretase, ähnlich der APP-Prozessierung, eine SorLA-intrazelluläre Domäne

(SorICD, vergleichbar mit AICD) ins Zytoplasma und ein kleines Peptid (Sor $\beta$ -Peptid, vergleichbar mit  $\beta$ -Amyloid) in den extrazellulären Raum. SorICD konnte darüber hinaus in den Zellkern wandern. Da bisher keine Zielgene für SorICD bekannt sind, wurde ein Galaktosidase-basierender Luciferase-Assay verwendet. SorICD war in der Lage, diesen Assay zu aktivieren, was der Fähigkeit einer gezielten Gentranskriptionsaktivierung entspricht.

Nimmt man diese Daten zusammen mit den Beobachtungen von Hampe et al. (2000) und Hermeijer et al. (2006), die jeweils die enzymatische Spaltung von SorLA durch eine Metalloproteinase bzw. TACE/ADAM17 ( $\alpha$ -Sekretase) postulierten sowie mit den Daten von Spoelgen et al. (2006), welche die Interaktion von SorLA mit der  $\beta$ -Sekretase (BACE1) beobachteten, so werden Parallelen zwischen der Prozessierung von APP und der von SorLA deutlich.

Das könnte einerseits bedeuten, daß SorLA und APP mehr oder weniger in Konkurrenz (auf)treten und dadurch die Prozessierung des jeweils Anderen indirekt beeinflussen.

Weitaus überzeugender aber ist die Möglichkeit, daß SorLA zu einer bisher noch wenig bekannten Gruppe von Proteinen, der regulierten intramembran-proteolysierten (RIP) Proteine, zählt. RIP-Proteine sind Transmembranproteine, die charakterisiert sind durch eine bestimmte Kaskade von enzymatischen Spaltungen. Eine erste Proteolyse findet im extrazellulären Bereich dieser Proteine statt und erfolgt oft als Antwort auf Ligandenbindung. Dies führt meist zu Konformationsänderungen des Proteins und eröffnet so den Weg zu einer weiteren Spaltung, die innerhalb des Transmembransegments stattfindet. Folge dessen ist die Freisetzung des zytoplasmatischen Teils, der direkt in den Zellkern wandern und Gentranskription aktivieren kann. Bisher bekannte Proteine, die der RIP unterliegen, sind Notch, APP und ErbB4. Für alle diese Proteine liegt eine weitere Gemeinsamkeit vor, das entscheidende Enzym, welches im Transmembranbereich schneidet und zur Freisetzung des intrazellulären Teils führt, ist die  $\gamma$ -Sekretase (Ebinu und Yankner, 2002). Damit stellt sich eine ganz wesentliche Frage nach den Genen, die der SorLA-aktivierten Transkription unterliegen.



Ebenfalls von großem Interesse sind Untersuchungen der *sorLA*<sup>-/-</sup>-Maus bezüglich der Ausprägung Alzheimer-typischer Verhaltensauffälligkeiten. Inwiefern sind SorLA-defiziente Tiere mit den bisher verwendeten Mausmodellen, die entweder auf transgener humaner APP-Expression bzw. auf APP- oder Presenilin-Mutationen beruhen, vergleichbar? Aufschluß könnten Verhaltensstudien oder Lernversuche wie der Morris-Water-Maze-Test geben, der Aussagen über das räumliche Lernen zuläßt.

Darüber hinaus interessiert die Frage der Kompensation Alzheimer-bedingter Defekte durch Überexpression des SorLA-Proteins. Gelingt es die Alzheimer-Krankheit bzw. die Symptome durch die Überexpression von SorLA zu behandeln? Untersuchungen diesbezüglich würden an einem transgenen SorLA/APP-Mausmodell stattfinden. Dafür müßte eine Mauslinie erstellt werden, welche humanes APP und SorLA überexprimiert.

Eine weitere wichtige Frage wäre die nach den Ursachen fehlender SorLA-Expression in Patienten mit Morbus Alzheimer. Potentiell wäre denkbar, daß es Polymorphismen des SorLA-Gens gibt, welche eine geringere Rezeptorexpression bedingen. Diese würden den jeweiligen Träger, aufgrund der beschleunigten Prozessierung von APP, als Risikopatienten für die Alzheimer-Krankheit prädestinieren. Zukünftige Assoziationsstudien des SorLA-Gens in Patienten und Kontrollprobanden sollten hierüber Auskunft geben.

## 4.2 Die Funktion von SorLA in der Niere

Die in diesem Teil meiner Dissertationsschrift durchgeführten Untersuchungen sollen zur Aufklärung der physiologischen Funktion des SorLA-Rezeptors in der Niere beitragen. Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurden neben dem nierenspezifischen Expressionsprofil physiologische und endokrinologische Daten erfaßt, die an unbehandelten sowie anti-diuretisch gestreßten Tieren gemessen wurden. Anti-Diurese als Streßparameter wurde gewählt, da Wassermangel eine Reduktion des Plasmavolumens zur Folge hat und damit zur Aktivierung einer Reihe von Regelmechanismen in der Niere führt, die den Salz- und Wasserhaushalt betreffen.

Es konnte gezeigt werden, daß SorLA im Sammelrohr und distalen Segmenten der Niere exprimiert wird. Die Analyse des Expressionsniveaus verschiedener Ionentransporter dieser Bereiche bestätigte Unterschiede für den Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter-2 (NKCC2). Keine Unterschiede wurden für den Natrium-Chlorid-Kotransporter (NCC) und den Kalium-Kanal (ROMK – rat outer-medulla K<sup>+</sup> channel) beobachtet.

Die Menge des NKCC2 war nach antidiuretischem Streß in *sorLA*<sup>-/-</sup>-Mäusen geringer als in Kontrolltieren. Darüberhinaus kolokalisierte NKCC2 in der Immunfluoreszenz mit SorLA in gleichen zellulären Strukturen.

Die Analysen des Urins ergaben ein tendentiell geringeres Volumen der Gen-defizienten Tiere. Diese Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant.

Desweiteren wiesen SorLA-defiziente Tiere unter Normalbedingung einen Defekt der Salz-Rückresorption auf, dies betraf Chlorid, Kalium und Kalzium. Nach antidiuretischem Streß war die für Natrium, Chlorid und Kalzium gemessene Konzentration des Urins in *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tieren höher als die der Vergleichsgruppe.

Die Blutanalyse unbehandelter *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tiere wies auf eine Hypokaliämie hin, nach Wasserentzug lag eine Hypernatriämie vor. Darüberhinaus wurden die Hormone des Renin-Angiotensin-Systems gemessen. Die Konzentrationen von Angiotensinogen, Renin und Angiotensin-I waren in *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tieren tendentiell niedriger, unterlagen aber, wie auch Vasopressin, nach antidiuretischem Streß der normalen Regulation.

Desweiteren wiesen SorLA-defiziente Tiere Defekte der Aldosteronregulation auf. Die Untersuchung der Aldosteronkonzentration erbrachte eine signifikant höhere Konzentration in SorLA-defizienten Tieren gegenüber den Kontrollen. Hier fand keine Aldosteronregulation statt, weder nach Wasserrestriktion, noch nach Desmopressingabe. Daraufhin wurde die Nebenniere, als Ort der Aldosteronbildung und -ausschüttung, auf eine mögliche SorLA-Expression hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Nebenniere positiv für das SorLA-Protein ist.

Die Ergebnisse der Blutdruckanalyse ergaben eine Hypertonie in den Gen-defizienten Tieren, die sowohl unter antidiuretischem Streß als auch nach Salzmangeldiät nicht reguliert wurde und von einer hohen Schlagfrequenz begleitet war.

Der hier beschriebene Phänotyp betrifft das wichtigste Ausscheidungsorgan der metabolischen Endprodukte, welches auch gleichzeitig den Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Säure-Base-Haushalt des Körpers regelt. Über die Ausscheidung von Wasser und Salzen kontrolliert die Niere Volumen und Elektrolytzusammensetzung des gesamten Extrazellulärraums. Sie reguliert den Blutdruck einerseits direkt über das Plasmavolumen und andererseits indirekt über die Bildung und Aktivierung von Hormonen (Renin, Kinine, Prostaglandine). Darüberhinaus steuert die Niere die Mineralisierung des Knochens über die Kalzium- und Phosphatkonzentration sowie über die Bildung von Calcitriol, der aktiven Form des Vitamin D. Durch die Ausscheidung und Resorption von  $H^+$ ,  $HCO_3^-$  und  $NH_4^+$  greift sie wesentlich in die Regulation des Säure-Base-Haushalts ein.

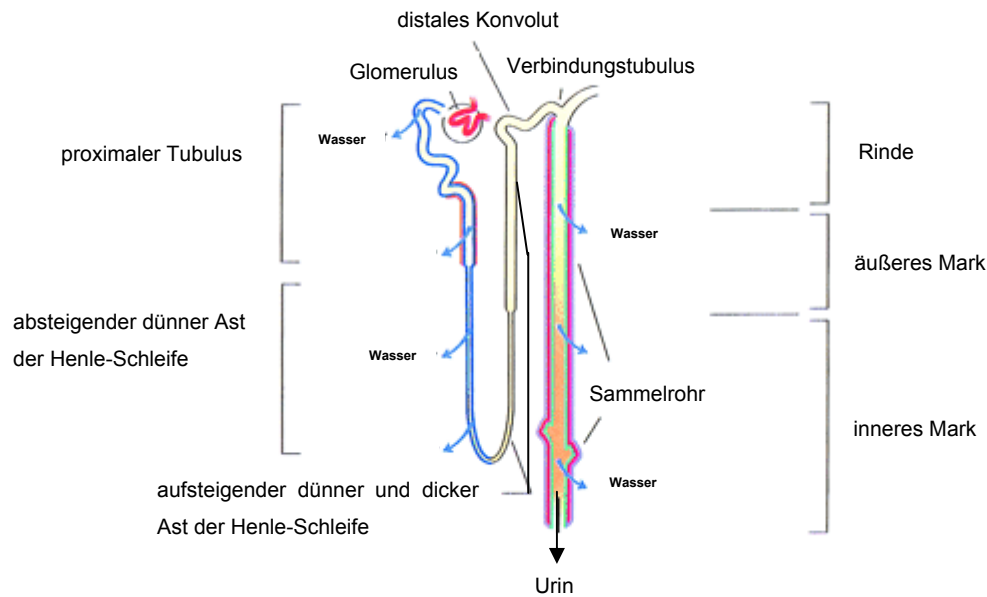
Im Rahmen dieser Arbeit galt es, die physiologische Funktion von SorLA in der Niere zu charakterisieren. Dies geschah ausschließlich durch phänotypische Analysen der SorLA-defizienten Maus im Vergleich zur Wildtypmaus. Nachfolgend werden die gewonnenen Daten im Zusammenhang mit der Literatur diskutiert.

### 4.2.1 SorLA-Expressionsprofil in der Niere

Unterschiedliche Daten wurden bisher über die Expression von SorLA in der Niere publiziert. Mörwald et al. (1997) und Hermans-Borgmeyer et al. (1998) wiesen mittels Northern Blot-Technik das *sorLA*-Transkript in der humanen und der Mausniere nach. Ergebnisse des Jahres 1996 konnten jedoch die SorLA-mRNA weder in der Kaninchenniere (Yamazaki H. et al., 1996) noch in der humanen Niere (Jacobsen et al., 1996) nachweisen. Eine Arbeit von Riedel et al. aus dem Jahre 2002 bestätigte letztendlich die Gen- und Proteinexpression in der Mausniere mittels *in situ*-Hybridisierung, Western Blot-Analyse und Immunhistologie.

Es ist schwierig zu beurteilen, worauf die Unterschiede in den mRNA-Expressionsanalysen z. Bsp. zwischen den Daten von Jacobsen et al. (1996) und Mörwald et al. (1997) zurückzuführen sind. Neben möglichen Abweichungen innerhalb der Protokolle sollte erwähnt werden, daß beide Gruppen zwar mit humanen „Multi Tissue Northern-Blots“ (MTN-Blots) von Clontech arbeiteten, jedoch waren die verwendeten Blots nicht identisch. Hermans-Borgmeyer et al. (1998) verwendeten ebenfalls MTN-Blots von Clontech, die jedoch mRNA aus murinem Material enthielten. Yamazaki H. et al. (1996) hingegen analysierten mRNA, direkt gewonnen aus Kaninchengewebe. Eindeutiger wurde der Beweis von Riedel et al. (2002), die neben dem *sorLA*-Transkript, nachgewiesen mittels *in situ*-Hybridisierung, das Protein über die Western Blot-Analyse und anhand der Immunhistologie bestätigten. Starke *in situ*-Signale wurden im Nierenmark, mit abnehmender Intensität zur Nierenrinde hin, beobachtet. Die Immunhistologie wies den Rezeptor im Sammelrohr der Niere nach.

Die Daten von Riedel et al. (2002) unterstützen zum Teil die Beobachtungen der hier vorliegenden Arbeit. SorLA-Expression ließ sich mittels Immunhistologie in distalen Segmenten und im Sammelrohr nachweisen (3.2.1). Anhand der Abbildung 31 läßt sich nachvollziehen, welche Nierensegmente dem Mark bzw. der Rinde zugeordnet werden.



**Abbildung 31 Schematische Darstellung des Nierenaufbaus.** Dargestellt ist der strukturelle Aufbau der Niere. Beginnend vom Glomerulus durchläuft der Primärharn den proximalen Tubulus, den dünnen absteigenden, den dünnen aufsteigenden und dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife. Daran schließt sich das distale Konvolut und der Verbindungstubulus an. Dieser mündet schließlich in das Sammelrohr, das den Urin zur Blase führt. Zur Nierenrinde zählt der Glomerulus, der proximale Tubulus, der dicke aufsteigende Ast der Henle-Schleife, das distale Konvolut und der Verbindungstubulus. Absteigender und aufsteigender dünner, sowie ein Teil des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife zählen zum Nierenmark. Das Sammelrohr durchzieht sowohl die Rinde, als auch das Mark (verändert aus Nielsen et al., 2002).

Glomerulus, proximaler Tubulus, dicker aufsteigender Ast der Henle Schleife, das distale Konvolut und der Verbindungstubulus zählen zur Nierenrinde. Dünnere absteigende und dünner aufsteigende Ast der Henle-Schleife, sowie ein Teil des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife zählen zum Nierenmark. Das Sammelrohr hingegen durchzieht sowohl die Rinde, als auch das Mark der Niere.

Anhand der Morphologie (Bürstensaumdicke) der Segmente wurden SorLA-positive Segmente den distalen Bereichen (Henle-Schleife, distales Konvolut, Verbindungstubulus) und dem Sammelrohr zugeordnet. Darüberhinaus bestätigt die Kolokalisationsstudie von SorLA und NKCC2 (Abbildung 27), einem Iontentransporter, welcher ausschließlich im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife exprimiert wird, daß SorLA in diesem Nierensegment vorliegt.

Daraufhin wurden Ionenporter der SorLA-positiven Segmente auf ihre Expression hin untersucht. Unterschiede in der Proteinmenge wurden für den NKCC2, jedoch nicht für NCC und ROMK beobachtet.

#### **4.2.2 Defekte der NKCC2-Aktivierung in SorLA-defizienten Mäusen**

Basierend auf den Ergebnissen der NKCC2-Studie (Abbildung 24, Abbildung 26, Abbildung 27) und der Funktion von SorLA bei der Sortierung des Alzheimer-Proteins, gehe ich davon aus, daß SorLA in die Sortierung des Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporters 2 involviert sein könnte. NKCC2, auch bekannt als „bumetanide-sensitive channel“ (BSC1), ist ein Ionenporter, der ausschließlich an der apikalen Membran der Zellen des dicken aufsteigenden Astes oder auch „thick ascending limb“ (TAL) der Henle-Schleife exprimiert wird.

NKCC2 ist ein Transmembranprotein, welches zur Genfamilie der elektroneutralen Kation-Kotransporter oder auch „solute carrier family“ (SLC12) zählt und durch 12 Transmembrandomänen sowie durch die intrazellulär vorliegenden amino- und carboxyterminalen Bereichen charakterisiert ist. Es existieren 3 Spleißvarianten (A, B, F), die sich in ihrer Verteilung innerhalb des TAL (Igarashi et al., 1995), der Sequenz der Transmembrandomäne 2 (entspricht zum Teil der Spleißkassette) (Payne et al., 1994) und damit in der Affinität bezüglich der zu transportierenden Ionen unterscheiden (Gimenez et al., 2002; Plata et al., 2002).

NKCC2 wird aktiviert durch chronische Salzaufnahme (Ecelbarger et al., 1996), durch Wasserentzug oder direkte Vasopressininjektion (Kim et al., 1999), durch metabolische Azidose (Attmane-Elakeb et al., 1998) oder Glukokortikoide (Attmane-Elakeb et al., 2000). Die primäre Rolle des Transporters ist die Natrium/Chlorid-Aufnahme. Er kommt für ca. 30 % der Natrium-Chlorid-Resorption der Niere auf.

##### **4.2.2.1 NKCC2-Aktivierung beruht auf Translokation des Transporters**

Daten von Gimenez et al. (2003) und Ortiz (2006) belegten, daß NKCC2 unter basalen Bedingungen nur zu einem geringen Teil in der Plasmamembran vorliegt. Quantifizierungen ergaben, daß unter Normalbedingung nur ca. 2 - 3 % der gesamten NKCC2-Proteinmenge in

der Membran von Ratten-TAL vorlagen und nach Aktivierung durch dibutyryl-cyclic adenosine monophosphat (db-cAMP) die Menge um 126 % zunahm (Ortiz, 2006).

Bereits zuvor hatten Arbeiten von Morel et al. (1982) und De Rouffignac et al. (1991) gezeigt, daß Hormone wie Parathyroid und Vasopressin die cAMP-Menge im Ratten-TAL erhöhen können. Gimenez et al. (2003 und 2005) hingegen beobachteten die Translokation der NKCC2-Moleküle an die Plasmamembran nach Vasopressin-induzierter Phosphorylierung des Transporters. Wiederum Studien von Rinehart et al. (2005) bestätigten, daß unter anderem die Serin-Threonin-Kinase (WNK3 – with no lysine K) essentiell ist für die Translokation von NKCC2. Die Koexpression von WNK3 und NKCC2 in Froscheiern führte zu verstärkter Phosphorylierung von NKCC2.

Die ließ die Vermutung zu, daß Vasopressin über cAMP die Phosphorylierung von NKCC2 aktiviert und so zur Translokation und gesteigerten Membranexposition des Proteins führt (Mount, 2006).

### ***Ähnlichkeiten zwischen der AQP2- und NKCC2-Translokation***

Ein vermutlich sehr ähnliches Translokations-basierendes Modell der Transporteraktivierung existiert bereits für den Wasserkanal Aquaporin-2 (AQP2) (Noda und Sasaki, 2005). AQP2 wird im Sammelrohr exprimiert und liegt unter Normalbedingung ebenfalls nur zum geringen Teil an der Zellmembran vor. Erst die Aktivierung des Kanals durch Vasopressin führt zum Transport der AQP2-beladenen Vesikel aus dem Zytoplasma an die Zellmembran und bewirkt so eine Wasserpermeabilität des Sammelrohrs. Diese ist essentiell für die Aufkonzentrierung des Primärharns.

Dabei aktiviert die Bindung von Vasopressin am Vasopressin2-Rezeptor (V<sub>2</sub>R) die Adenylatcyclase, welche die cAMP-Konzentration erhöht. Die anschließende Proteinkinase-A (PKA)-Aktivierung hat zur Folge, daß AQP2 phosphoryliert und zur Plasmamembran transportiert wird.

Würde man dieses Modell auf NKCC2 anwenden, so wäre es denkbar, daß Vasopressin auch in TAL-Zellen die Adenylatzyklase aktiviert und so zu gesteigerten cAMP-Mengen führt. cAMP wiederum könnte über eine Proteinkinase die Phosphorylierung von NKCC2 bewirken und so, ähnlich dem AQP2-Modell, die Translokation des Transporters hervorrufen.

In Arbeiten von Gourad et al. (2002) und Ortiz (2006) ließen sich weitere Parallelen zwischen der AQP2- und NKCC2-Translokation beobachten.

So ließ sich z. Bsp. die Exozytose von AQP2 in CD8-Zellen mit Hilfe des Tetanus-Neurotoxins (TeNT) inhibieren (Gouraud et al., 2002). TeNT blockiert die Verschmelzung sekretorischer Vesikel mit der Membran durch Spaltung der Vesikel-assoziierten Membranproteine (VAMP). VAMP sind essentiell bei der Fusion intrazellulärer Vesikel mit der Plasmamembran. Somit wurde in TeNT-behandelten CD8-Zellen deutlich weniger AQP2 an der Zelloberfläche nachgewiesen als in unbehandelten.

Ortiz (2006) konnte analog in TAL-Zellen der Ratte, den cAMP-induzierten Transport von NKCC2 an die Zellmembran mittels TeNT inhibieren, gemessen anhand der Proteinmenge und der Chlorid-Aufnahme.

Es liegt daher die Vermutung nahe, daß der gerichtete, Vasopressin-induzierte Transport von NKCC2 aus intrazellulären Vesikeln an die Plasmamembran ähnlich dem des Wasserkanals erfolgt.

Neben der Exozytose spielt aber auch die Endozytose eine wichtige Rolle bei der Funktion von AQP2. Arbeiten von Brown und Orci (1983), Brown et al. (1988) und Sun et al. (2002) bestätigten die Clathrin-abhängige Endozytose als Teil des permanenten Recyclingprozesses dieses Wasserkanals. AQP2 zirkuliert nach Aktivierung ständig zwischen den intrazellulären Speichern und der Zellmembran. Wurde die Clathrin-abhängige Endozytose im Zellkulturmodell durch die Expression einer dominant-negativen Mutante des Dynamin inhibiert, akkumulierte AQP2 an der Zelloberfläche.

Arbeiten zur Endozytose und zum Recycling des NKCC2 liegen bisher nicht vor. Durchaus denkbar scheint aber die Notwendigkeit des Recyclings von NKCC2 für dessen physiologische Funktion.



#### 4.2.2.2 Eine mögliche Rolle von SorLA beim Recycling des NKCC2

Die Koexpression von SorLA und NKCC2 in gleichen Kompartimenten der TAL-Zellen von Wildtypen und die geringere NKCC2-Menge in gedursteten *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tieren, lassen die Vermutung zu, daß SorLA in die Sortierung von NKCC2 eingreifen könnte.

Vorstellbar wäre die Beteiligung von SorLA am Recyclingprozeß des Transporters. Unterliegt NKCC2, ähnlich dem AQP2, einer permanenten Zirkulation zwischen Plasmamembran und subapikalen Speichervesikeln, so könnte SorLA dafür verantwortlich sein, daß NKCC2 nach der Internalisierung in frühe Endosomen und von da aus wieder zurück zur Zellmembran transportiert wird. Unterstützt wird diese Hypothese von Riedel et al. (2002). Sie konnten nachweisen, daß SorLA im Sammelrohr der Maus zum einen in Vesikeln lokalisierte, die positiv waren für den Golgi-Marker  $\gamma$ -Adaptin, zum anderen in Vesikeln vorlag, die positiv waren für einen Marker intrazellulärer Transportvesikel, den Transferrin-Rezeptor. Der Transferrin-Rezeptor, zuständig für die Aufnahme von Eisen in die Zellen, zirkuliert zwischen der Zellmembran und Endosomen.

Ein Defizit im Recycling (nicht der Internalisierung) des NKCC2 würde sich dahingehend äußern, daß der Transporter in geringeren Mengen an der Plasmamembran vorzufinden ist. Denkbar wäre ein Defekt dieser Art in SorLA-defizienten Mäusen. Die fehlende Expression von SorLA beeinträchtigt hier möglicherweise die Wiederbereitstellung des Transporters an der Zelloberfläche und forciert so dessen Transport in Protein-abbauende Kompartimente (Lysosomen). Dies hätte zur Folge, daß *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tiere geringere NKCC2-Mengen aufweisen.

Da der Ionentransporter aber unter basalen Bedingungen nur zu ca. 3 % an der Plasmamembran vorliegt (Ortiz, 2006) und erst nach Aktivierung vermehrt an die Membran wandert, würde der „NKCC2-Phänotyp“ in SorLA-defizienten Tieren erst unter Streßbedingung, also nach NKCC2-Aktivierung, deutlich werden. Das bestätigte sich in den Daten der Western Blot-Analyse und der immunhistologischen Untersuchung (Abbildung 24, Abbildung 26) und spiegelte sich darüberhinaus in der Salzausscheidung der Niere wieder. SorLA-defiziente Tiere wiesen deutlich niedrigere Mengen an NKCC2 auf und schieden weitaus mehr Natrium und Chlorid aus als die Kontrolltiere (Tabelle 5). Dies ist zurückzuführen auf die verminderte NKCC2-Exposition an der luminalen Membran der TAL-Zellen.

Ein Defekt der Vasopressin-Ausschüttung, als Aktivator der NKCC2-Translokation, kann hingegen ausgeschlossen werden, da sich die gemessenen Konzentrationen zwischen Kontroll- und Gen-defizienten Tieren, sowohl vor, also auch nach Aktivierung, nicht unterscheiden (Diagramm 11).

Zusätzlich sei erwähnt, daß Riedel et al. (2002) in murinen Sammelrohren Kollokalisierung zwischen AQP2 und SorLA beobachteten. Dies könnte bedeuten, daß SorLA auch an Transportprozessen von AQP2 beteiligt ist. Mäuse, denen für 48 Stunden das Wasser entzogen wurde, wiesen in der Immunhistologie jedoch keine veränderte Lokalisation für SorLA auf (Riedel et al., 2002). Allerdings wurde hierbei nicht der Beweis für eine veränderte AQP2-Lokalisation bzw. verstärkte AQP2-Konzentrierung an der Zellmembran erbracht.

Untersuchungen an *sorLA*<sup>+/+</sup>- und *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tieren wiesen hingegen eine Tendenz zu geringeren Wasserausscheidungen in Gen-defizienten Mäusen hin. Auch wenn die Unterschiede nicht signifikant waren (Tabelle 3), wäre es möglich, daß SorLA im Zusammenhang mit der AQP2-Funktion oder dem Transport steht.

Patienten, die Mutationen im Gen für NKCC2 (*nkcc2*) aufweisen, auch bezeichnet als Bartter-Syndrom, entwickeln unter anderem Polyurie (Wasserverlust als Folge des Salzverlustes), Hypokaliämie und metabolische Alkalose. Darüberhinaus liegen oft hohe Reninwerte vor, als Folge der Volumendepletion, und hohe Aldosteronkonzentrationen, als Konsequenz der Aktivierung des RAS und der daraus folgenden Aldosteronaktivierung über Angiotensin II (Naesens et al., 2004). Es ist also durchaus möglich, daß die fehlende Expression von SorLA in *sorLA*<sup>-/-</sup>-Tieren über Defekte der NKCC2-Regulation für einen Teil der an den Tieren beobachteten Symptome verantwortlich ist und so eine milde Form des Bartter-Syndroms verursacht.

### 4.2.3 Hyperaldosteronismus in SorLA-defizienten Mäusen

Weitere phänotypische Merkmale, wie die hohe Aldosteronkonzentration im Serum SorLA-defizienter Mäuse (Diagramm 9), die Hypokaliämie (Tabelle 1) und die Hypertonie (Diagramm 12), sprechen für eine Erkrankung mit vermehrter Bildung bzw. Ausschüttung des

Aldosterons, auch bezeichnet als Hyperaldosteronismus. Man unterscheidet den primären Hyperaldosteronismus, als adrenalen, vom sekundären Hyperaldosteronismus, dem extraadrenalen Defekt.

### ***Primärer Hyperaldosteronismus (PH) oder Conn-Syndrom***

#### *Ursachen*

Ursachen des PH sind in allen Fällen krankhafte Veränderungen der Nebenniere, die zur vermehrten Ausschüttung von Aldosteron führen. In etwa 60 – 80 % der Fälle sind Nebennierenadenome (gutartige Geschwülste der Nebennierenrinde) die Ursache, in 20 – 40 % ist eine Hyperplasie der Nebennierenrinde (NNR), also eine Gewebeergrößerung, der Grund. NNR-Hyperplasie tritt fast immer ohne ersichtlichen Grund auf. In sehr seltenen Fällen (1 – 3 %) führt ein NNR-Karzinom (bösartige Geschwulst) zu der Erkrankung.

#### *Symptome*

Ein ganz wesentliches Merkmal des PH ist neben der erhöhten Serumaldosteronkonzentration die Hypertonie. Darüberhinaus liegt eine Hypokaliämie und in etwa einem Drittel der Fälle eine Hybernatriämie vor. Ein weiteres Kennzeichen, das den primären vom sekundären Hyperaldosteronismus unterscheidet, ist eine normale bis niedrige Plasma-Renin-Konzentration als Folge der hohen Aldosteronausschüttung. Ein hoher Aldosteron-Renin-Quotient dient oft als erstes diagnostisches Mittel. Aber auch eine übermäßige Harnproduktion und –ausscheidung sind Begleiterscheinungen des PH.

### ***Sekundärer Hyperaldosteronismus (SH)***

#### *Ursachen*

Die sekundäre Form dieser Erkrankung ist verursacht durch Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), die durch extraadrenale Faktoren, meist Erkrankungen der Niere, hervorgerufen wird. Der SH kann sowohl mit, als auch ohne Hypertonie auftreten. Ist die Hypertonie Begleiterscheinung, so liegen häufig chronische Nierenerkrankungen, Nierenarterienstenosen oder in seltenen Fällen reninproduzierende Tumore vor. Bei der Krankheitsform ohne Hypertonie können Herzinsuffizienz,

Leberzirrhose oder hohe Salzverluste, durch z. Bsp. Schwitzen, Erbrechen, Durchfall oder durch das Bartter-Syndrom, ursächlich sein.

### *Symptome*

Ebenfalls ein klassisches Merkmal des SH ist die Hypertonie, begleitet von Hypokaliämie. Im Gegensatz zum PH liegt aber immer eine Stimulation des RAS vor, was sich in hohen Plasminrenin-Konzentrationen widerspiegelt.

Ausgehend von den oben beschriebenen Merkmalen des Hyperaldosteronismus und den Unterschieden zwischen dem primären und sekundären, vermute ich bei SorLA-defizienten Mäusen eine Erkrankung in der Form des primären Hyperaldosteronismus. Ausschlaggebend hierfür sind 2 Aspekte. Zum einen liegt in den *sorLA*<sup>-/-</sup>-Mäusen keine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems vor, was sich durch hohe Reninkonzentrationen zeigen würde. Die Gen-defizienten Tiere weisen tendentiell einen eher niedrigen Reninspiegel auf, was ein eindeutiges Kriterium für den primären Hyperaldosteronismus ist.

Desweiteren konnte gezeigt werden, daß SorLA in der Nebenniere von Wildtypmäusen exprimiert wird. Das eröffnet zumindest die Möglichkeit, daß der Hyperaldosteronismus adrenale Ursachen hat und direkt mit der fehlenden SorLA-Expression in der Nebenniere zusammenhängt.

Hier gilt es, die näheren Ursachen des Überangebots an Aldosteron zu klären.

### ***Ist SorLA bei der Regulation der Aldosteronsynthese involviert?***

Möglich wäre eine Störung der Regulation der Aldosteronsynthese, die dazu führt, daß in gesteigertem Maße Aldosteron gebildet und ausgeschüttet wird.

Regulatorische Elemente der Aldosteronsynthese sind Angiotensin II, die extrazelluläre Kaliumkonzentration in der Nebenniere und das adrenokortikotrope Hormon (ACTH) (Connel und Davies, 2005). Sie aktivieren die Aldosteronsynthesetranskription durch hohe AngII- und Kaliumkonzentrationen. Die der 11 $\beta$ -Hydroxylase durch hohe ACTH-Werte. Beide Enzyme, die Aldosteronsynthase und die 11 $\beta$ -Hydroxylase, regulieren die Konvertierung von 11-Deoxycorticosteron (DOC) zu Aldosteron.

Es wäre zu klären, ob *sorLA*<sup>-/-</sup>-Mäuse bereits zu hohe Aldosteronsynthese- bzw. 11 $\beta$ -Hydroxylasekonzentrationen aufweisen und dadurch deutlich mehr DOC zu Aldosteron umsetzen. Alternativ könnte die Ursache der gesteigerten Aldosteronproduktion auf einer zu hohen Kalium-, AngII- oder ACTH-Konzentration in Gen-defizienten Tieren basieren. Untersuchungen diesbezüglich stehen noch aus.

#### ***Ist der Aldosteronabbau in SorLA-defizienten Tieren gestört?***

Auch eine geringere Abbaurate von Aldosteron hätte zur Folge, daß die Aldosteronkonzentration im Organismus erhöht ist. Der Abbau dieses Mineralkortikoids findet in der Leber statt. Hier wird Aldosteron zu Tetrahydroaldosteron reduziert und nach weiteren Schritten schließlich über den Darm ausgeschieden. Defekte des Aldosteronabbaus würden aber implizieren, daß die SorLA-Expression der Leber entscheidend ist und daß durch die fehlende Expression in diesem Organ Einfluß auf den Aldosteronabbau genommen wird. Yamazaki H. et al. (1996) und Mörwald et al. (1997) hatten zwar mittels Northern Blot-Technik die Expression in der Kaninchenleber und im Menschen respektive nachgewiesen, negativ blieb jedoch die Untersuchung der Geflügelleber (Mörwald et al., 1997) und der Mausleber (Hermans-Borgmeyer et al., 1998). Also auch hier bedarf es weiterführender Untersuchungen, die die Beteiligung von SorLA am hepatischen Aldosteronabbau bestätigen.

#### **4.2.4 Schlußfolgerung**

Meines Erachtens begründet sich der nierenspezifische Phänotyp SorLA-defizienter Mäuse auf der Überlagerung zweier unterschiedlicher Defekte.

Zum einen führt die fehlende Expression von SorLA in der Niere Gen-defizienter Tiere zur Beeinträchtigung der NKCC2-Funktion. Vermutlich ist SorLA involviert in Recycling- und Wiederbereitstellungsprozesse des Ionentransporters an der Zelloberfläche. Das hat zur Folge, daß SorLA-defiziente Tiere nach NKCC2-Aktivierung geringere Mengen dieses Proteins aufweisen. Das führt besonders bei Wassermangel zu Salzresorptionsstörungen und dementsprechend zu erhöhten Ausscheidungen von Ionen.

Zum anderen bewirkt die fehlende SorLA-Expression in der Nebenniere vermutlich eine verstärkte Aldosterausschüttung. Dies geht einher mit Hypokaliämie, Hypertonie und normal bis tendentiell niedrigen Reninwerten. Symptome wie diese beschreiben die primäre Form des Hyperaldosteronismus. Möglicherweise ist SorLA an der Regulation oder Ausschüttung von Aldosteron in der Nebenniere beteiligt.

#### 4.2.5 Ausblick

Die hier gewonnenen Daten sollen Ausgangspunkt weiterführender Untersuchungen sein. Die Analyse des Phänotyps SorLA-defizienter Mäuse hat zunächst die Richtung vorgegeben, in der anknüpfende Forschungsarbeit erfolgen wird.

Untersuchungen der NKCC2-Aktivierung auf Protein-regulatorischer Ebene setzen voraus, daß ein entsprechendes Zellkultursystem etabliert wird. Hier sollen primäre Nierenzellen SorLA-defizienter Tiere und die von Kontrolltieren ein Modell bieten, welches Analysen des Einflusses von SorLA auf die NKCC2-Aktivierung ermöglicht. Bisher sind Versuche unterschiedlicher Forschergruppen, das NKCC2-Protein in Säugerzellen zu exprimieren, erfolglos geblieben. NKCC2-Studien basierten bisher nur auf primärer Zellkultur oder auf Studien mit Eiern des Frosches *Xenopus laevis*, denen die NKCC2-mRNA injiziert wird. Diese weichen allerdings im Protein- und Kinasensystem von dem der Säugerzellen ab und weisen darüberhinaus keine, für TAL-Zellen typische, Polarisierung (apikal, basolateral) auf.

Eine weitere wichtige Frage wäre die nach der Beteiligung weiterer Kanäle bzw. Transporter. SorLA ist, im Gegensatz zum NKCC2, nicht ausschließlich im TAL exprimiert, sondern auch im distalen Tubulus und im Sammelrohr. Inwiefern SorLA in die Aktivierung bzw. Translokation weiterer Transportproteine involviert ist, ist Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

Im Rahmen der Nebennierenuntersuchungen stehen zunächst Studien der SorLA-Expression an. Von Interesse ist die genaue Lokalisation des Proteins innerhalb des Organs (Nebennierenrinde oder -mark).

Die Analyse weiterer Nebennierenhormone soll klären, ob SorLA eventuell in die Ausschüttung und Regulation anderer Hormone involviert ist. Die Nebennierenrinde produziert

neben dem Mineralkortikoid Aldosteron das Glukokortikoid Cortisol, welches unter anderem eine Funktion in der Glukoneogenese und der Immunsuppression ausübt. Darüberhinaus werden in der Rinde die Sexualhormone Androgen und Östrogen gebildet. Das Nebennierenmark hingegen ist der Ort, an dem die produzierten Hormone die Nebenniere verlassen und ins Blut abgegeben werden. Zusätzlich wird im Mark das Adrenalin und sein Gegenspieler, das Noradrenalin, ausgeschüttet.

Darüberhinaus soll eine differentielle Genexpressionsstudie Aufschluß darüber geben, welche Gene in der Niere bzw. Nebenniere differentiell exprimiert sind und ob sich das Expressionsniveau von *cyp11b1* (Aldosteronsynthase) und *cyp11b2* (11 $\beta$ -Hydroxylase) zwischen den Gruppen unterscheidet.