

**Aus dem Institut für Physiologie
der Universität Tübingen
Abteilung Physiologie I
Abteilungsleiter: Professor Dr. F. Lang**

**Elektrophysiologische Untersuchungen an
Aminosäuretransporter
des Systems SN1**

**Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Ferrah Okur, geb. Mutlu
aus
Calw**

2005

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Oßwald

Ailem'e

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Bedeutung des Glutamins für den Organismus	6
1.2	SN1 und andere Aminosäuretransporter	10
1.3	Klonierung des Na⁺-gekoppelten Aminosäure-transportsystems N	11
1.4	Interzellulärer Glutaminzyklus in Leber und ZNS	12
1.5	Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches <i>Xenopus laevis</i> als Expressionssystem	15
1.6	Die Rolle der Proteinkinasen und der Ubiquitin Ligase Nedd4-2 in der Regulation des Aminosäuretransporters SN1	17
1.7	Zielsetzung der Arbeit	19

2. Methoden

2.1	Verwendete Lösungen und Substanzen	
2.1.1	ND 96	20
2.1.2	Variiertes Natrium	20
2.1.3	Oozytenaufbewahrungslösung	21
2.1.4	OR-2 (Oozyten-Ringer, kalziumfrei)	22
2.1.5	Kollagenase A	22
2.1.6	Weitere verwendete Substanzen	22
2.2	Oozytenpräparation	23
2.3	Injektion der cRNA	23
2.4	Elektrophysiologische Methoden	
2.4.1	"Current Clamp" – Modus	24
2.4.2	Zwei-Elektroden Voltage-Clamp (TEVC-Methode)	25
2.4.3	Spannungsprotokolle	27
2.5	Durchführung der Experimente	28
2.6	Uptake – Messungen	28
2.7	Auswertung und Statistik	29

3. Ergebnisse

3.1	Elektrogene Eigenschaften des glutamininduzierten Stroms I_{Gln}	30
3.2	Allgemeine Charakterisierung des SN1	
3.2.1	Substratabhängigkeit des Glutamineinstroms durch SN1 in die Zelle	
3.2.1.1	Glutaminabhängigkeit	31
3.2.1.2	Natriumabhängigkeit	34
3.2.2	pH-Abhängigkeit des SN1 induzierten Glutaminstroms	36
3.3	Regulation des SN1	
3.3.1	Einfluß der Ubiquitin Ligase Nedd4-2 und der Serum- und Glukokortikoid-induzierten Kinase ^{S422D} SGK1, SGK3 und der Proteinkinase ^{T308D,S473D} PKB auf SN1	39

4. Diskussion

4.1	Fehlerdiskussion	
4.1.1	Oozytenpräparation	43
4.1.2	Geräte, Lösungen und Chemikalien	44
4.2	Die Verwendung elektrophysiologischer Techniken und der „Tracer-Flux“-Methode zur Untersuchung des SN1	45
4.3	Allgemeine Charakterisierung des SN1	
4.3.1	Transporteigenschaften und –mechanismus von SN1	46
4.3.2	Bedeutung und Mechanismus der Regulation von SN1 durch Proteinkinasen und Ubiquitin Ligase Nedd4-2	50
4.4	Schlussfolgerung aus der Arbeit	54

5. Zusammenfassung	56
---------------------------	----

6. Literaturverzeichnis	58
--------------------------------	----

7. Danksagung	74
----------------------	----

8. Lebenslauf	75
----------------------	----

1. Einleitung

1.1. Bedeutung des Glutamins für den Organismus

Für die Instandhaltung und Förderung von Zellfunktionen steht hauptsächlich Glukose als primärer Nährstoff im Vordergrund. Auch die 5-carbon-Aminosäuren, Glutamin und Glutamat, gewinnen immer mehr eine ähnliche Bedeutung für die Aufrechterhaltung normaler Stoffwechselfvorgänge wie Glukose (2,39,59,108,110,117).

Während die Plasmakonzentration von Glutamat (30 – 70 µmol/l) sehr niedrig ist, weist Glutamin die mit 600 – 800 µmol höchste Konzentration aller Aminosäuren im Plasma auf. Die Gesamtkonzentration aller Aminosäuren im Blutplasma beträgt 2,4 – 4 mmol/l (14,24,127). Abbildung 1 zeigt die strukturelle Ähnlichkeit des Glutamins mit Glutamat. Bei pH 7,4 trägt die Carboxylgruppe des Glutamins eine negative Ladung, wobei die Aminogruppe im protonierten Zustand vorliegt. Dieser Ladungsausgleich klassifiziert Glutamin zu den neutralen Aminosäuren. Glutamat hat anstelle der Amidgruppe eine Carboxylgruppe, was der Aminosäure eine negative Ladung verleiht. Dies erklärt, dass der Transport beider Aminosäuren über die Zellmembran über unterschiedliche Transportsysteme erfolgen muss.

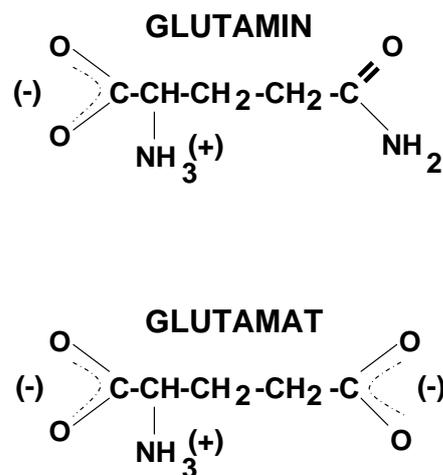


Abb. 1.
Chemische
Strukturformel
der Aminosäuren
Glutamin und
Glutamat

Glutamin ist das Säureamid der Glutaminsäure (Glutamat). Es wird aus Glutamat und freiem NH_3 oder durch Transaminierung gebildet. Der Plasmaglutaminpool hat eine hohe Umsatzrate und spielt eine wesentliche Rolle beim Transport von Kohlen- und Stickstoffgerüsten zwischen den einzelnen Organen, d.h. von Gehirn und Muskulatur zu Nieren, Leber und Mukosa des Gastrointestinaltraktes (44,146). Glutamin ist Bestandteil der Nukleotide und somit für die Reduplikation und Proteinsynthese der Zellen von grundlegender Bedeutung (98,108,125). Über eine Transaminierungsreaktion werden aus Glutamin Aminosucker synthetisiert, die bei der Biosynthese von Mukopolysacchariden, Proteoglykanen, Glykoproteinen und Glykolipiden eine wichtige Rolle spielen. Glutamin ist ein essentielles Substrat des Schlüsselenzyms Fructose-6-Phosphat Amidotransferase in der Hexosaminsynthese (98,107,117,120,122). Hexosamine sind vitale Komponenten epithelialer Oberflächen. Der Glutamin-Stoffwechsel ist ferner wichtig für die Säure-Base-Regulation in der Niere (75,85). 60 % des Ammoniaks stammen aus dem Glutamin (davon etwa 2/3 aus dem Amid und 1/3 aus dem Aminostickstoff). Vor allem die Zellen des proximalen Tubulus bevorzugen Glutamin als Glukoneogenesesubstrat. Der dabei frei werdende Ammoniak wird zur Pufferung von Protonen verwendet. Bei Azidose wird die Phosphoenolcarboxykinase aktiviert, so dass einerseits die Glukoneogenese stimuliert wird und andererseits vermehrt NH_3 zur Pufferung der H^+ -Ionen bereitsteht (98,127,160). Glutamin besitzt regulatorische Eigenschaften nicht nur in der Synthese von Proteinen, Lipiden, Hormonen und Glykogen (24,64,87,100,139,140,152), sondern auch in der Genexpression, in den verschiedenen Transportprozessen des Organismus und in der Zellhydratation (13,71,72,96,120,140). Die muskelaufbauende Wirkung von Glutamin beruht in erster Linie auf einer Steigerung des Zellvolumens der einzelnen Muskelzellen (101,120). Dabei kommt es zu einer anabolen Stoffwechsellage mit Aktivierung der Protein- und Glykogensynthese (39). Die weitaus wichtigste Funktion des Glutamins spiegelt sich im Glutaminzyklus des Zentralnervensystems wider. Glutamin, das aus den Gliazellen stammt, wird in glutamaterge Axone bzw. in GABAerge Nervenendigungen aufgenommen und dort schließlich durch

Glutaminase in Glutamat und Ammoniak gespalten (Hydrolyse). Glutamat gehört zu den erregenden (exzitatorischen) Aminosäuretransmittern und gilt als Vorläufer der γ -Aminobuttersäure (GABA). In GABAergen Nervenendigungen wird Glutamat zu GABA decarboxyliert. Aus dem wichtigsten erregenden entsteht in einem einzigen Schritt der wichtigste hemmende Transmitter GABA. Glutamat und GABA werden von den Gliazellen wieder aufgenommen, in Glutamin umgewandelt und dem Zyklus wieder zur Verfügung gestellt (Abb.4). Ihrer Funktion entsprechend kommt Glutamin-Synthetase hauptsächlich in der Glia vor, Glutaminase vorwiegend in Nervenzellen (54,137). Im Übrigen wird GABA in den Gliazellen durch GABA-Transaminase zu Succinatsemialdehyd abgebaut, dessen Kohlenstoffkette nach Oxidation zu Bernsteinsäure in den Zitratzyklus eintritt. In Gliazellen kann sich, wie erwähnt, Bildung von Glutamin anschließen, aus dem dann wieder GABA entstehen kann. Glutamat ist nicht nur ein chemisches Signal, sondern auch Ausgangsstoff für andere Aminosäuren und gehört mit Aspartat zu den Hauptbausteinen der Gehirnproteine. Es ist Ausgangsstoff für die Biosynthese von Prolin, die Vorstufe von Hydroxyprolin ist, einer wichtigen Aminosäure in Kollagen und Elastin. Glutamat ist ebenso Bestandteil von Folsäure, dem Kofaktor in vielen enzymatischen Prozessen, und Glutathion, dem wohl wichtigsten biologischen Antioxidant (57,110). Über α -Ketoglutarsäure ist Glutamat mit dem Citratzyklus verknüpft. Zwei weitere Aminosäuren, die eine zentrale Rolle im Citratzyklus einnehmen, sind Alanin und Aspartat, die wie Glutamat über Transaminasereaktionen die Zwischenprodukte des Citratzyklus Pyruvat und Oxalacetat liefern. Über den Citratzyklus nimmt Glutamin an der oxidativen Energiegewinnung der Zelle teil (123,159). Auch die Produktion von NADPH über das zytoplasmatische Malat-Enzym wird von Zwischenprodukten des Citratzyklus gesteuert. Das gebildete $\text{NADPH}+\text{H}^+$ ist ein entscheidender Cofaktor in der Lipid- und Steroidhormonbiosynthese. Bezugnehmend auf die Anzahl der Reaktionen, in die Glutamin involviert ist, kann man aus der Abbildung 2 entnehmen, dass Glutamin von den drei am Citratzyklus beteiligten Aminosäuren die vielseitigste Rolle spielt.

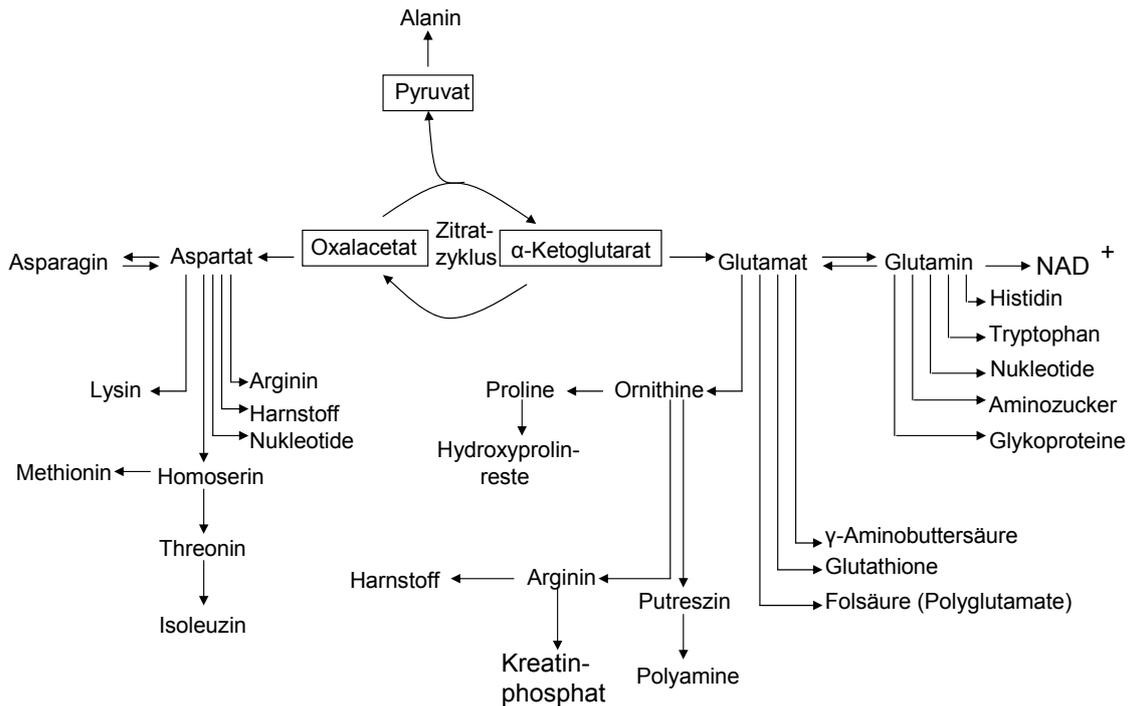


Abb. 2: Glutamin und Glutamat im Citratzyklus.

Nennenswert ist, dass durch Glutaminsubstitution bei Patienten mit Knochenmarkstransplantation (36,105,162) und bei Frühgeborenen eine verminderte Infektionsrate im Krankenhaus erreicht wird (107,132). Bei Frühgeborenen mit sehr geringem Geburtsgewicht konnte sogar die Notwendigkeit maschineller Beatmung herabgesetzt werden (107). Da Glutathion HIV-Protein und -RNA in infizierten Monozyten supprimiert (83), ist man der Ansicht, dass sein Vorläufer, Glutamin, ähnliche virale Aktivitäten supprimieren kann (107,126). Glutamin und Arginin sind Promotoren hypophysärer Wachstumsfaktoren und könnten auf diese Weise der katabolen Stoffwechsellage bei HIV-Patienten entgegenwirken (158). Neuere Studien zeigen den neuroprotektiven Effekt Glutamins in der Entwicklung der HIV-Demenz (65,126). Während der Kardioplegie in der Herzchirurgie beobachtete man erniedrigte Glutamin- und Glutamatkonzentrationen im Myokard. Vorläufige Studien zeigen, dass der Zusatz von Glutamin in die Perfusionslösung verbesserte hämodynamische Funktion mit sich bringt (107).

1.2. SN1 und andere Aminosäuretransporter

Mit Hilfe der Arbeitsgruppe um Christensen wurde aufgrund bestimmter Merkmale für Aminosäuretransporter (35) die Bezeichnung „System“ eingeführt. System N wurde erstmals 1980 in Leberzellen der Ratte beschrieben und ist spezifisch für die Substrate Glutamin, Asparagin und Histidin – alles Substrate, die in den Seitenketten Stickstoff (N) enthalten (86). Andere System N-ähnliche Aktivitäten wurden im Skelettmuskel (N^m) und in Neuronen (N^b) beschrieben (79,141).

System N, das nach Isolierung der cDNA 1999 als SN1 bezeichnet worden ist, ist verantwortlich für die Glutaminaufnahme in den Zellen verschiedener Gewebe (86). Da Glutamin das bevorzugte Transportmolekül für Stickstoff zur Leber und von der Leber ist (73), zeigen quantitative Immunoblots die höchste Konzentration von SN1 in der Leber. Gehirn (Astrozyten) und Niere haben etwa 40% und 27% der Konzentration in der Leber (18).

Funktionelle Analysen zeigen, dass SN1 an einem Protonenaustausch wie auch an einem Na^+ -Kotransport beteiligt ist und unter physiologischen Bedingungen Glutaminefflux wie auch –aufnahme vermittelt (18,29).

Der Glutamintransport über rSN1 oder hSN1 (siehe 1.3.) ist ein elektrogener Transportmechanismus, da zwei Na^+ -Ionen und die Aminosäure im Austausch gegen ein H^+ in die Zelle transportiert werden (53).

Allgemein kann man den Transport neutraler Aminosäuren aufteilen in ein Na^+ -unabhängiges System L und in die Na^+ -abhängigen Systeme A und ASC. System ASC wurde ursprünglich nach seinen bevorzugten Substraten Alanin, Serin und Cystein benannt und wurde aus dem Epithel des Darms und der Niere isoliert. Um es von dem später in den Blastozyten der Maus identifizierten „System ASC“ zu unterscheiden, wurde die Bezeichnung System B^0 bzw. ATB^0 eingeführt (48,81,97,135). Dieser Transporter ist Mitglied der exzitatorischen Aminosäuretransporter-Familie (EAAT) (14). System A ist im Unterschied zu den anderen Aminosäuretransportern in der Lage N-methylierte Aminosäure als Substrat zu tolerieren (34,118). Die Familie der Glykoprotein-assoziierten Aminosäuretransporter gpa-AT hat eine Funktion als Aminosäureaustauscher

(147). System y^+L wurde aus der Plasmamembran der Erythrozyten isoliert (46) und ist verantwortlich für die Na^+ -unabhängige Aufnahme kationischer Aminosäuren, benötigt aber Na^+ für den Transport zwitterionischer Aminosäuren wie Glutamin.

System L, ebenfalls ein Na^+ -unabhängiger Transporter, ist spezifisch für hydrophobe Seitenketten, und seine Isoformen für kleine zwitterionische Aminosäuren wie Alanin, Serin und Threonin. Die Rolle der System L-Transporter beim Glutamintransport wurde mehr als die anderen Na^+ -unabhängigen Carrier diskutiert (22,27,28,40,97,99,114,143,159). Zu den Na^+ -unabhängigen Transportern gehört auch das System $b^{0,+}$, das kationische und zwitterionische Aminosäuren transportiert (160).

1.3. Klonierung des Na^+ -gekoppelten Aminosäuretransportsystems N

Die System N mRNA wurde erstmals 1999 aus dem Gehirn der Ratte isoliert und als SN1 bezeichnet (rSN1) (29). Drei Monate später fand die Isolierung des System N Gens aus der cDNA-Bank der Mausniere statt und wurde als mNAT bezeichnet (66). Im August 2000 erfolgte die Isolierung und Charakterisierung der "human System N" Sequenz, hSN1 genannt, aus der cDNA-Bank der humanen Hepatoblastom-Zellreihe HepG2 (53). rSN1- und hSN1 bestehen jeweils aus 504 Aminosäuren und sind miteinander zu 90% identisch. mNAT hat eine Länge von 505 Aminosäuren und ist zu 89% identisch mit hSN1. Die SN1 Transporter aller Spezies haben eine Proteinmasse von etwa 56 kDa und 9-12 transmembranäre Regionen (29,53,66). Das hSN1 Protein hat putative Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C am C-Terminus der Sequenz. Das hSN1 Gen ist lokalisiert auf Chromosom 3 und enthält 16 Exons und 15 Introns, die etwa 16 kb-Paare der Nukleotidsequenz einnehmen (53). Zusammen mit System A gehört SN1 der Transportfamilie an, die den vesikulären γ -Aminobuttersäure (GABA) -Aminosäuretransporter (VGAT) miteinschließt und 28% der Aminosäuresequenz mit SN1 teilt (29,103).

Alle Experimente für diese Arbeit wurden an hSN1 durchgeführt.

1.4. Interzellulärer Glutaminzyklus in Leber und ZNS

Die wohl überraschendste Erkenntnis bei dem kürzlich isolierten SN1 ist, dass er imstande ist, sowohl Glutaminaufnahme in die Zelle als auch die Freisetzung Glutamins aus der Zelle zu vermitteln (15,119). Das ist bemerkenswert, da Na⁺-abhängige Transporter nur die Aufnahme des Substrats in die Zelle ermöglichen, entsprechend des elektrochemischen Gradienten für Natrium. Mehrere Studien belegen weiterhin, dass zusammengesetzte Triebkräfte die SN1-Katalyse (Richtung, in der Glutamin transportiert werden soll) bestimmen. Der Natriumgradient ist einer dieser verschiedenen Triebkräfte. Zudem ist der von SN1 vermittelte Glutamintransport äußerst abhängig vom Membranpotential (17). Zunehmende Depolarisierung der Membran (auf -20 mV bis -30 mV) bewirkt, dass auf eine Glutaminaufnahme umgestellt wird (53). Auch der transmembrane Glutaminkonzentrationsgradient wirkt sich auf die SN1-Katalyse aus. Bei extrazellulärer Konzentration >400 µmol wurde Glutaminaufnahme in die Zelle beobachtet und eine -abgabe bei extrazellulärer Konzentration von <400 µmol (29).

Es ist anzumerken, dass Änderungen dieser Triebkräfte, die den Glutaminfluss des SN1-Transporters bestimmen, innerhalb des physiologischen Bereichs auftreten, in dem sie Auswirkungen auf die Glutamin-Homöostase haben (14). Der Glutaminstoffwechsel in der Leber ist aufgeteilt in zwei Zonen und erfüllt unterschiedliche Aufgaben. Glutamin wird von den periportalen Hepatozyten (Abb.3) aufgenommen, welche in großen Mengen Bikarbonat verbrauchen, weswegen sie ein intrazellulär saures Milieu haben. Diese Hepatozyten besitzen eine relativ hohe Glutaminaseaktivität und das entstandene Ammoniak dient der Synthese von Carbamoyl-Phosphat (14,108).

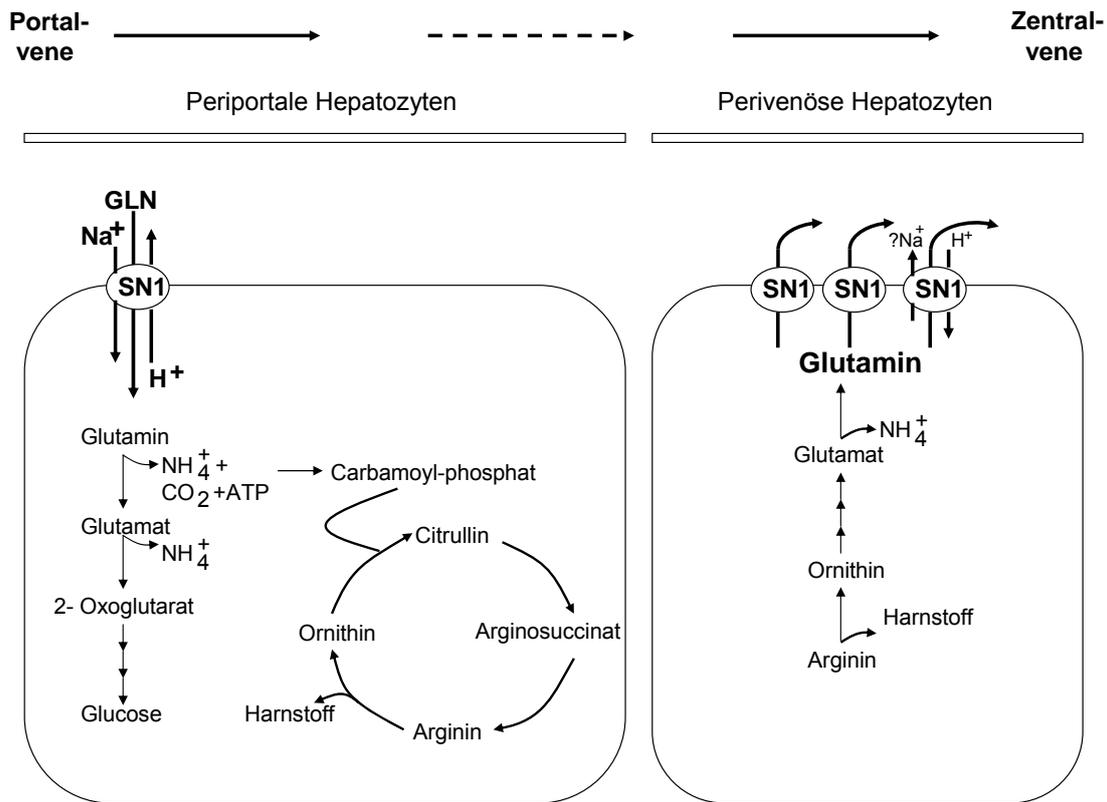


Abb.3: Rolle des Aminosäuretransporters SN1 im hepatischen interzellulären Glutaminzyklus

Die treibenden Kräfte für die Aufnahme von Glutamin in die periportalen Hepatozyten sind neben der hohen Glutaminkonzentration im Portalvenenblut auch der nach außen gerichtete Protonengradient (29,53).

Im Gegensatz zu den periportalen Hepatozyten enthält eine kleine Population von perivenösen Hepatozyten große Mengen Glutaminsynthetase mit hoher Anzahl von SN1-Transportern auf der Plasmamembran (45,51,66). Der Glutaminefflux aus diesen Zellen wird gefördert durch verminderten Glutamingehalt in der Zentralvene (da die periportalen Hepatozyten dem Portalvenenblut Glutamin entzogen haben), dem gering sauren Zytoplasma und schließlich durch die hohe zytoplasmatische Glutaminkonzentration in der Zelle, verursacht durch die Aktivität der Glutaminsynthase. Die Substrate für die Glutaminsynthese sind Glutamat und NH_4^+ . Glutamat kann aus der Umwandlung von Glukose in 2-Oxoglutarat und anschließend via Glutamatdehydrogenase entstehen. Neuere Studien zeigen zusätzlich, dass auch der Argininkatabolismus für die Glutaminsynthese Glutamat liefert (112).

Das Membranpotential beeinflusst ebenso den Glutamintransport, aber es ist noch unklar, in welchem Potentialbereich der Glutamintransport jeweils in den periportalen und perivenösen Hepatozyten erfolgt (14).

Der Glutaminstoffwechsel in der Leber spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Ammoniakspiegels im venösen Blut (108). Die Produkte der Synthese und Hydrolyse von Glutamin sind Zwischenprodukte im Harnstoffzyklus. Auf diese Weise entfernt die Leber erst Ammoniak und bildet Glutamin, das durchläuft den hepatischen interzellulären Zyklus und erreicht das Organ wieder. Die Schlüsselenzyme für die Bildung von Harnstoff sind in hoher Konzentration in den periportalen und proximal perivenösen Hepatozyten enthalten, wobei die Glutaminsynthase nur distal der perivenösen Hepatozyten vorkommt (63,70,82).

Im Zentralnervensystem ist Glutamat der wichtigste Transmitter an exzitatorischen Synapsen, während inhibitorische Signale von der γ -Aminobuttersäure ausgehen (52,116). Die Existenz eines Glutamin/Glutamat-Zyklus ist schon zuvor beschrieben worden (Abb.4) (9).

Nach Freisetzung von Glutamat aus den präsynaptischen Neuronen in den synaptischen Spalt wird dieses über den exzitatorischen Aminosäuretransporter (EAAT1) in die Astrozyten aufgenommen und via Glutaminsynthetase (GS) in Glutamin umgewandelt, das wieder an die präsynaptischen glutamatergen Neuronen abgegeben wird (29). Dort wird Glutamin in Glutamat umgewandelt, um den Zyklus zu schließen. Da diese Umwandlung ATP verbraucht, ist dieser Zyklus energieabhängig. Im Kortex scheint dieser Zyklus 80% der Energie, die mit Hilfe der Glukoseoxidation erreicht wird, zu verbrauchen (121,130). Neben SN1 exprimieren die Astrozyten ASCT2 (ATB⁰). Die glutamatergen Neurone exprimieren beide Isoformen des Systems A (ATA1 und ATA2). Treibende Kraft für den Glutaminefflux aus den Astrozyten ist neben dem Anstieg der intrazellulären Glutaminkonzentration auch der Anstieg des pH-Wertes, da die synaptische Aktivität eine interne Alkalinisierung des nahegelegenen Astrozyten verursacht, zum einen durch die Aktivierung des Na⁺-/HCO₃⁻-Kotransporters (getriggert durch K⁺-induzierte Depolarisierung) (23) und zum anderen durch die metabotropischen Glutamatrezeptoren (7).

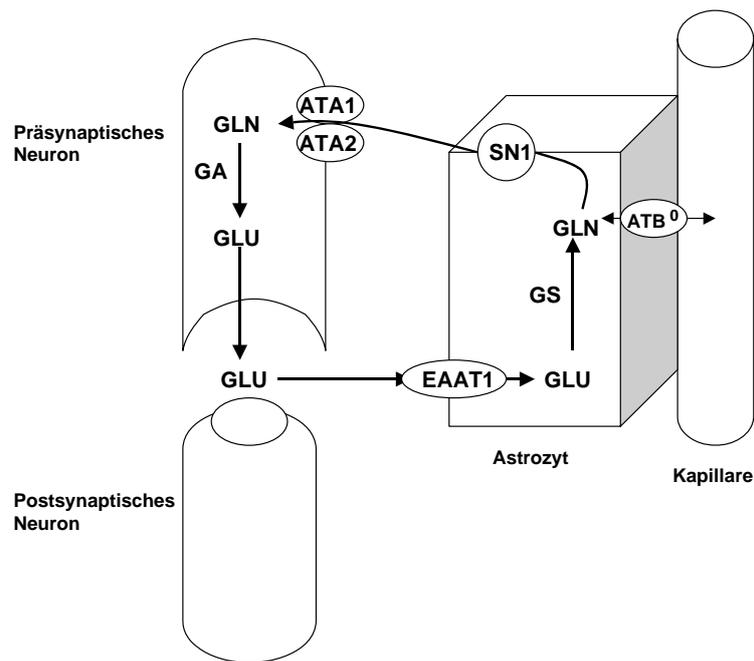


Abb.4: Interzellulärer Glutaminzyklus im ZNS: Schematisches Modell über die Rolle der Na⁺-abhängigen Aminosäuretransporter im Gehirn.

1.5. Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* als Expressionssystem

Seit John Gurdon 1971 in Cambridge die ersten Experimente machte, dienen die Oozyten südafrikanischer Krallenfrösche (*Xenopus laevis*, Daudin 1802) in steigendem Maße dem molekularbiologischen Studium der Expression und Charakterisierung von exogenen Proteinen nach Injektion von *messenger* RNA (heterologe Genexpression, Expressionsklonierung). Dies ermöglichte in den letzten Jahren Expressionsklonierungen (141) und elektrophysiologische Studien an verschiedenen Transportern und Ionenkanälen (26,41,67,68,131,134,136,142,145).

Die Oozyten sind von vier Membranschichten umgeben. Durch eine Behandlung mit Kollagenase werden die äußeren drei Schichten entfernt, es verbleibt die innere bindegewebige Vitellinmembran (4,41). Die Oozyten bestehen aus zwei unterschiedlichen Hemisphären, einer animalen und einer

vegetativen. Die animale Hälfte ist durch die Einlagerung von Melaninpigment dunkel gefärbt und enthält den größten Anteil an Mikrovilli, des endoplasmatischen Retikulums und des Zytoskelettes. Die animale Membran weist eine höhere Dichte an calciumabhängigen Chloridkanälen und Calciumkanälen auf als die vegetative Hälfte. Diese hell gefärbte Hälfte enthält mehr RNA und ist der Eintrittsort des Spermiums (41).

Die gemessenen Werte für die intrazellulären Ionenkonzentrationen sind sehr unterschiedlich: Na^+ zwischen 2 und 18 mM, K^+ liegt bei 110 – 130 mM, Cl^- beträgt 40 – 50 mM und Ca^{2+} 0,1 – 0,4 μM (41).

Xenopus Oozyten besitzen eine ganze Reihe technischer Vorteile. Der sehr große Zelldurchmesser von ca. 1.3 mm erleichtert die Handhabung und erlaubt die relativ problemlose mRNA–Injektion sowie das spätere gleichzeitige Messen mit mehreren intrazellulären Glaselektroden (41,145).

Ein Nachteil der Oozyten als Expressionssystem besteht in ihrer Verschiedenheit zu den Zellen menschlicher Gewebe. Proteine durchlaufen nach der Translation der injizierten mRNA noch verschiedene intrazelluläre Schritte (Processing), in deren Verlauf das Protein glykosyliert oder phosphoryliert werden kann. Es ist nicht selbstverständlich, dass ein Protein in der Oozyte dieselben Processing-Schritte durchläuft wie im menschlichen Gewebe. Dies kann die Funktionsfähigkeit des Proteins entscheidend beeinflussen. Für eine Anzahl von Membrantransportproteinen, wie z.B. Neurotransmitterrezeptoren und spannungsgesteuerten Ionenkanälen konnte in den letzten Jahren aber gezeigt werden, dass diese ihre natürlichen Eigenschaften nicht verlieren (41). Auch für die Aminosäuretransporterproteine konnte durch Antigenpezifität, Vergleich des Proteingewichtes und funktionelle Charakterisierung gezeigt werden, dass sie weitgehend mit dem natürlich vorkommenden Aminosäuretransporter übereinstimmen (17,118,144).

Ein weiteres potentiell Problem besteht darin, dass Oozyten eventuell nicht über alle intrazellulären *second-messenger*-Systeme des jeweils interessierenden menschlichen Gewebes verfügen. Die Regulation eines Proteins muss deshalb nicht mit der Regulation in seinem menschlichen

Gewebe übereinstimmen (41). Auf die Bedeutung dieses Problems soll später in der Diskussion nochmals eingegangen werden.

1.6. Die Rolle der Proteinkinasen und der Ubiquitin Ligase Nedd4-2 in der Regulation des Aminosäuretransporters SN1

In vielzelligen Organismen müssen Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose streng reguliert werden, um einen funktionsfähigen Organismus aufrechtzuerhalten. Diese Aufgabe wird von Wachstumsfaktoren übernommen, die nach Rezeptorbindung an der Zelloberfläche spezifische Signalkaskaden auslösen. Um einen geordneten Ablauf dieser Reaktionen zu gewährleisten, existiert eine enorme Vielfalt von Enzymen. Von besonderer Bedeutung sind die Enzyme, die durch Phosphorylierung zu Änderungen der katalytischen Eigenschaften anderer Enzyme, Transportproteine etc. führen, so dass Regulationsmechanismen sehr genau an die Bedürfnisse der Zelle angepasst werden. Diese zusätzlich benötigten Enzyme sind Proteinkinasen.

Die **S**erum- und **G**lukokortikoidabhängige **K**inase (SGK) ist 1993 aus Tumorzellen der Ratte isoliert worden und wird durch Serum und Glukokortikoide induziert (156). Zur Klonierung der *humanen* Isoform, die hSGK, führten 1997 Untersuchungen zu unmittelbar durch Zellvolumenänderungen regulierten Genen an der humanen Hepatomzelllinie HepG2, die eine hohe Sequenzhomologie zu der an Ratten beschriebenen SGK (rSGK) aufweist (150,151). Es gelang die chromosomale Lokalisation auf dem langen Arm des Chromosoms 6 in Position 6q23 zu bestimmen.

Aufgrund der strukturellen Homologie ist hSGK eine Serin/Threonin-Proteinkinase, deren Sequenz im katalytischen Zentrum zu 54% identisch mit der Serin/Threoninkinase PKB ist (PKB ist ebenso bekannt als AKT). PKB mit einem Molekulargewicht von 57 kDa ist für eine Vielzahl von Zellen Schlüsselenzym für Zellproliferation und Antiapoptose (37,41,49). Sie wird ubiquitär exprimiert und reguliert den Glukosehaushalt und die Proteinsynthese der Zelle. Vor allem nimmt PKB eine wichtige Rolle im Stoffwechsel insulin-

regulierter Glukosetransporter GLUT 4 und anderen insulin-regulierten Signaltransduktionswegen ein (124).

Die zwei Isoformen der SGK1, SGK2 und SGK3, zeigen 80% Sequenzhomologie untereinander und zu der ursprünglich identifizierten SGK (jetzt SGK1). SGK3 ist ebenso bekannt als "cytokine-independent survival kinase" (CISK). SGK3 wurde während einer genetischen Durchsichtung mit dem Ziel Faktoren zu ermitteln beschrieben, die mit "interleukin-3 (IL-3)-dependent survival" in hämatopoetischen Zellen in Zusammenhang stehen. SGK1 und SGK3 werden in verschiedenen humanen Geweben wie Pankreas, Leber, Herz, Lunge, Skelettmuskel, Plazenta, Niere und Gehirn exprimiert (55,150). Die Transkription der SGK1 wird durch Serum, Glukokortikoide, Aldosteron, hohe extrazelluläre Osmolarität, "transforming growth factor" (TGF- β), und follikelstimulierendes Hormon (FSH) gesteigert (152). Wie PKB wird SGK1 über eine Signalkaskade via Phosphatidylinositol (PI) 3-Kinase und 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (PDK1) aktiviert, indem SGK1 an der Position 422 phosphoryliert wird, PKB an den Positionen 308 und 473 (89,95). Der Ersatz jener Aminosäuren durch Aspartat führt zu den jeweiligen aktiven Kinasen ^{S422D}SGK1 (88) und ^{T308D,S473D}PKB (5). *In vivo* wird Phosphorylierung und Aktivierung von SGK1 durch Insulin und "insulin-like growth factor" IGF-1 erreicht. Auf gleichem Weg werden die später entdeckten Isoformen der SGK, die SGK2 und SGK3, aktiviert (89,95). Über den genannten Signalweg stimuliert "insulin-like growth factor" IGF-1, Insulin und Serum die drei Kinasen. Darüber hinaus werden sie durch oxidativen Streß aktiviert.

Unter den bekannten Regulatoren von Membrankanalproteinen ist Nedd4-2 (neuronal precursor cell-expressed, developmentally down-regulated gene 4 isoform) erstmals 1992 in neuronalen Zellen identifiziert worden (91). Nedd4-2 enthält eine kalziumabhängige Ligandenbindungsdomäne (C2/CalB), vier Protein-Protein-Interaktionsdomänen (WW-Domänen) und eine Ubiquitin-Protein-Ligase-Domäne (HECT) (8, 69,115).

Ubiquitin, ein kleines Protein (8,5 kd), das in allen eukaryotischen Zellen vorhanden ist, spielt eine wichtige Rolle bei der Markierung von Proteinen für deren Degradation. Bei Proteinen, die zum Abbau bestimmt sind, wird das

carboxyterminale Glycin des Ubiquitins kovalent mit der ϵ -Aminogruppe von Lysinresten verbunden.

Nedd4-2 wird in einer großen Anzahl von verschiedenen Zellen exprimiert, vor allem in der Leber (8). Zuvor ist gezeigt worden, dass Nedd4-2 den spannungsgesteuerten Natriumkanal im Skelettmuskel (1) und den renalen epithelialen Natriumkanal ENaC reguliert (84). Nach Bindung der ENaC-Untereinheit durch die WW-Domäne wird durch die Ubiquitin-Protease-Domäne die α - oder γ -Untereinheit des ENaC ubiquitinyliert und dadurch dem proteosomalen Abbau zugeführt.

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die substratinduzierten Ströme des in *Xenopus* Oozyten exprimierten SN1 zu charakterisieren.

Das zweite Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluß der Ubiquitin Ligase Nedd4-2 und der serum- und glukokortikoidabhängigen Kinasen ^{S422D}SGK1 und SGK3 und der Proteinkinase B (^{T308D,S473D}PKB) auf den Glutamintransporter SN1 aufzuklären.

Um dies zu untersuchen, wurde die cRNA für den SN1-Transporter in *Xenopus* Oozyten mit oder ohne cRNA injiziert, die für Nedd4-2 und/oder ^{S422D}SGK1, SGK3 und ^{T308D,S473D}PKB kodiert bzw. kodieren.

2. Methoden

2.1. Verwendete Lösungen und Substanzen

ND96 war die Grundlösung für alle Versuche und als kalziumfreie Variante für die Präparation der Oozyten. Für bestimmte Versuche wurde sie variiert.

2.1.1. ND 96

Substanz	Konzentration
NaCl	96mM
KCl	2mM
CaCl ₂	1,8mM
MgCl ₂	1mM
HEPES	5mM
pH	7,4

Tabelle 1: Zusammensetzung ND96 – Lösung

HEPES ist Hydroxymethyl-aminomethan-N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonat (pKs 7,4) und dient als Puffer.

2.1.2. Variiertes Natrium

Für die Versuche zur Untersuchung der Natriumabhängigkeit des Glutamintransports wurde die Kontrolllösung ND 96 verändert. Dabei wurde Natriumchlorid durch äquimolare Mengen N-Methyl-D-Glucamine-Chlorid ersetzt (138). Alle anderen Lösungsbestandteile blieben gleich.

Methoden

Lösung	Natriumchlorid	N-Methyl-D-Glutamine-Chlorid
ND 100	100 mM	0 mM
ND 70	70 mM	30 mM
ND 50	50 mM	50 mM
ND 30	30 mM	70 mM
ND 10	10 mM	90 mM
ND 0	0 mM	100 mM

Tabelle 2: Varrierte ND96

2.1.3. Oozytenaufbewahrungslösung

Substanz	Konzentration
NaCl	96 mM
KCl	2 mM
CaCl ₂	1,8 mM
MgCl ₂	1 mM
HEPES	5 mM
Natriumpyruvat	2,5 mM
Theophyllin	0,5 mM
Gentamycin	50 µg/l
pH	7,4

Tabelle 3 : Zusammensetzung der Oozytenaufbewahrungslösung

Theophyllin inhibiert über eine Verringerung der Proteinsynthese und Veränderungen der Zellmembran die weitere Reifung der Oozyten (109), während Gentamycin Infektionen, und damit Zellalterationen verhindert.

2.1.4. OR-2 (Oozyten-Ringer, kalziumfrei)

Substanz	Konzentration
NaCl	82,5 mM
KCl	2 mM
MgCl ₂	1 mM
HEPES	5 mM
pH	7,4

Tabelle 4: Zusammensetzung der OR-2-Lösung

OR-2 wurde für die Kollagenasebehandlung der Oozyten verwendet und ist kalziumfrei, da dies die Wirkung der Kollagenase verbessert.

Kollagenase spaltet Peptidbindungen in den Tripelhelixbereichen des Kollagens.

Um die Zell/Zell-Adhäsion zu zerstören, müssen den "Tight Junctions" das für ihre Unversehrtheit erforderliche extrazelluläre Ca²⁺ entzogen werden.

2.1.5. Kollagenase A

Die Kollagenase (Fa. Roche, Mannheim) wurde eingefroren gelagert, um einen Aktivitätsverlust zu verhindern. Benutzt wurde 1 mg/ml OR-2.

2.1.6. Weitere verwendete Substanzen

Die verwendete Aminosäure Glutamin (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde den Lösungen in den angegebenen Konzentrationen zugegeben.

Glutamin wurde als Stammlösung angesetzt und in ND 96 auf die jeweilige Konzentration verdünnt. Alle Lösungen wurden mit NaOH oder HCl auf den verwendeten pH-Wert titriert. Für die Versuche mit variiertem Natriumgehalt wurde KOH anstatt NaOH verwendet. Die Osmolarität der Versuchslösungen wurde mit einem Osmometer kontrolliert.

2.2. Oozytenpräparation

Zur Oozytenentnahme wurden weibliche Frösche der Art *Xenopus laevis* (Südafrikanischer Krallenfrosch) für ungefähr 20 Minuten in 0,1%iger Aminobenzoesäurelösung (Fa. Sigma-Aldrich) anästhesiert, auf ein Eisbett gelegt und der Bauch mit Ethylalkohol desinfiziert, um semisterile Bedingungen herzustellen. Durch einen 0,5 bis 1 cm langen Schnitt quer am Bauch oberhalb der Inguinalfalte wurden die Oozyten in ihren bindegewebigen Ovarialsäckchen entnommen und gleich in OR-2 gegeben. Die Wunde wurde wieder mit resorbierbarem Nähmaterial (Ethicon) durch getrenntes Zunähen der Muskulatur und Haut verschlossen. Die Oozyten wurden mehrfach mit OR-2 Lösung gespült, mit Pinzetten in kleinere Einheiten unterteilt bis die Flüssigkeit klar war. Danach wurden Theka- und Follikelschicht durch ca. 1-2 stündige Inkubation in 1 %iger Kollagenase A (in OR-2 Lösung) unter ständiger Bewegung im Schüttler bei ca. 20°C gelöst.

Die Defollikulisierung wurde unter der Stereolupe kontrolliert, um die Kollagenasewirkung rechtzeitig beenden zu können, so dass nur die äußeren Bindegewebeschichten der Oozyten entfernt wurden. Der Kollagenverdau wurde durch mehrmaliges Spülen der Oozyten mit ND96 abgebrochen.

Die Oozyten wurden dann unter der Stereolupe betrachtet und nur Oozyten verwendet, die reif genug waren (Stadium 5 und 6 nach Dumont, 50) und deren Färbung und Membran intakt erschien.

Die aussortierten Oozyten wurden, in mittlerer Petrischale und Aufbewahrungslösung, bei 16-18 °C im Kühlschrank gelagert. Unmittelbar vor der Injektion wurden die Oozyten erneut sortiert.

2.3. Injektion der cRNA

Die cDNA für den Glutamintransporter SN1 wurde ursprünglich von Robert H. Edwards kloniert (29) und von Stefan Bröer in den Vektor pGem-He-Juel für die Oozytenexpression umklont. Das Nedd4-2 Konstrukt wurde uns von Olivier

Straub und die Kinasen ^{S422D}SGK1, SGK3 und ^{T308D,S473D}PKB von Philip Cohen zur Verfügung gestellt (5,88).

Sämtliche Vorgänge der cRNA–Injektion und die Herstellung der Injektionskapillaren müssen semisteril durchgeführt werden, um eine Kontamination mit RNAsen zu vermeiden.

Zur Injektion der Oozyten wurden Borosilikatglaskapillaren (Fa. Harry Fein, World Precision Instruments WPI, Berlin) mit einem Außendurchmesser von 1,2 mm verwendet, bei denen nach dem Ziehen einer sehr langen Spitze der vorderste Teil dieser Spitze unter dem Mikroskop abgebrochen wurde. Die Glaskapillaren wurden mit Paraffinöl (zur Abdichtung und Vermeidung von Luftblasen) gefüllt und die cRNA mit Hilfe eines Mikroinjektors aufgezogen. Unter dem Mikroskop wurden in die Oozyten für die funktionelle Charakterisierung jeweils 50 nl oder bei Koexpressionsexperimenten mit jeweils 25 nl cRNA injiziert (entsprechen 1ng cRNA für SN1 und für Proteinkinasen bzw. 0,5g cRNA für Nedd4-2).

Die Oozyten mussten jeden zweiten Tag nach den bereits erwähnten Kriterien aussortiert werden. Nach 3 – 4 Tagen waren die Glutamintransporter genügend exprimiert und konnten vom dritten bis siebten Tag nach Injektion zu Versuchen verwendet werden.

2.4. Elektrophysiologische Methoden

2.4.1. “Current Clamp” – Modus

Bei der Potentialmessung, d.h. im “Current Clamp” – Modus, wird durch eine intrazelluläre Mikroelektrode das Membranpotential der Zelle gegen eine Referenzelektrode im Bad abgeleitet (Abb.5) (104).

Die Ag-AgCl² Referenzelektrode war über eine Brücke aus 3 % Agar und 3 M KCl-Lösung mit dem Bad verbunden (6). Die Glasmikroelektroden (Borosilikatglaskapillaren, Außendurchmesser 1,5 mm; Typ GC150TF-15, Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, GB) waren ebenfalls mit 3 M KCl-

Lösung gefüllt und über einen chlorierten Silberdraht mit dem Millivoltmeter verbunden. Alle verwendeten Mikroelektroden hatten einen Gesamtwiderstand zwischen 0,3 und 5 M Ω . Als Millivoltmeter wurde derselbe Verstärker wie für die "Voltage-Clamp" Untersuchungen verwendet (GeneClamp 500B, Axon Instruments, Foster City, USA).

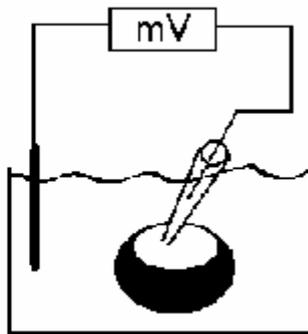


Abb.5: Schematische Darstellung der Messanordnung für die Potentialmessung

2.4.2. Zwei-Elektroden Voltage-Clamp (TEVC-Methode)

Mit der TEVC-Methode ist es möglich, das Membranpotential zu kontrollieren, d.h. das Membranpotential einer Zelle auf einen vorher ausgewählten Wert einzustellen („klemmen“). Gleichzeitig kann der Strom gemessen werden, der notwendigerweise appliziert werden muß, um die Zelle auf dem gewünschten Potential zu halten (12,56,74,78).

Hierzu sind zwei intrazelluläre Mikroelektroden nötig (Two Electrode- Voltage-Clamp, TEVC). Mit der ersten Elektrode E' wird das Membranpotential E gemessen, im Rückkoppelungsverstärker (GeneClamp Amplifier, Axon Instruments) hoch verstärkt und mit dem vorgegebenen Wert verglichen. Über eine zweite Elektrode I' wird die Differenz zwischen E und Sollwert als der zur Aufrechterhaltung von E nötige Strom I appliziert und gemessen (Abb.6) (4,47,77).

Der Strombetrag, der zur Aufrechterhaltung des gewählten Membranpotentials notwendig ist, verändert sich bei der Induktion eines vorher nicht bestehenden Ionenstromes oder aber bei der Blockade eines vorbestehenden Ionenstromes. Die Betragsänderung kann als Strom abgelesen werden. Berühmt machten diese Methode Hodgkin, Huxley und Katz (1949, 1952) mit ihren Experimenten an Tintenfischaxonen (80).

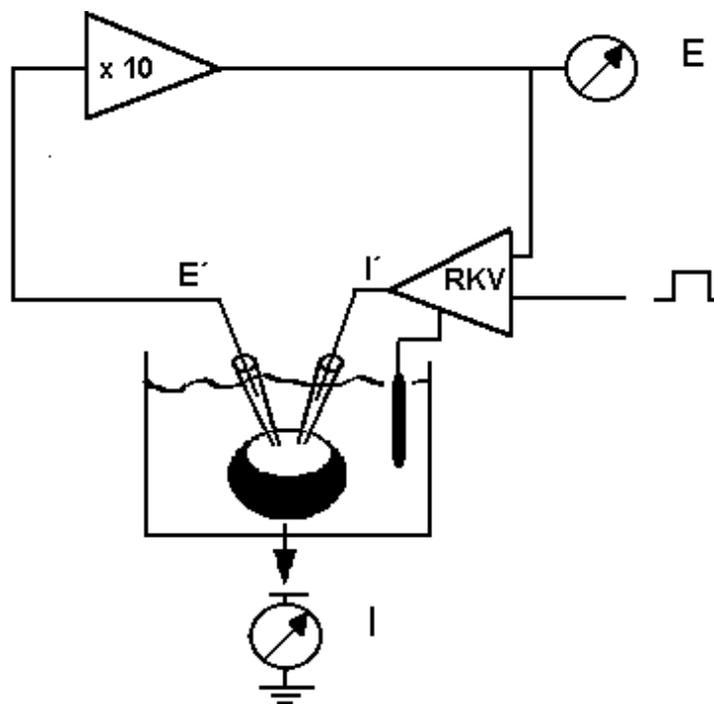


Abb.6: Schematische Darstellung der Messanordnung für Zwei-Elektroden Voltage-Clamp. Hierbei sind: I der gemessene Strom und I' die Elektrode, über die der Strom zur Aufrechterhaltung der vorgegebenen Spannung appliziert wird. E' ist die Elektrode, die das Membranpotential E misst. RKV ist der Rückkopplungsverstärker, der Spannung misst und den Haltestrom appliziert (77).

Die Messanordnung war durch einen Faraday'schen Käfig gegen äußere elektrische Störungen geschützt (111). Alle Daten wurden mit 10 Hz gefiltert und mit einer Aufnahmerate von 100 Datenpunkten pro Minute auf einem Macintosh-Computer aufgezeichnet.

2.4.3 Spannungsprotokolle

Spannungsrampen:

Dabei werden die Oozyten ausgehend vom Haltepotential (- 60mV) unmittelbar auf - 150 mV hyperpolarisiert und anschließend innerhalb von 15 sec. mit konstanter Potentialänderung auf + 50 mV depolarisiert.

Spannungssprünge:

Die Oozyten durchlaufen in zeitlich konstanten Schritten (1 sec.) Spannungsstufen. Zur Bestimmung der Spannungsabhängigkeit des SN1-Transporters von - 150 mV bis + 50 mV. Die Filterfrequenz der Strommessung betrug 1 kHz.

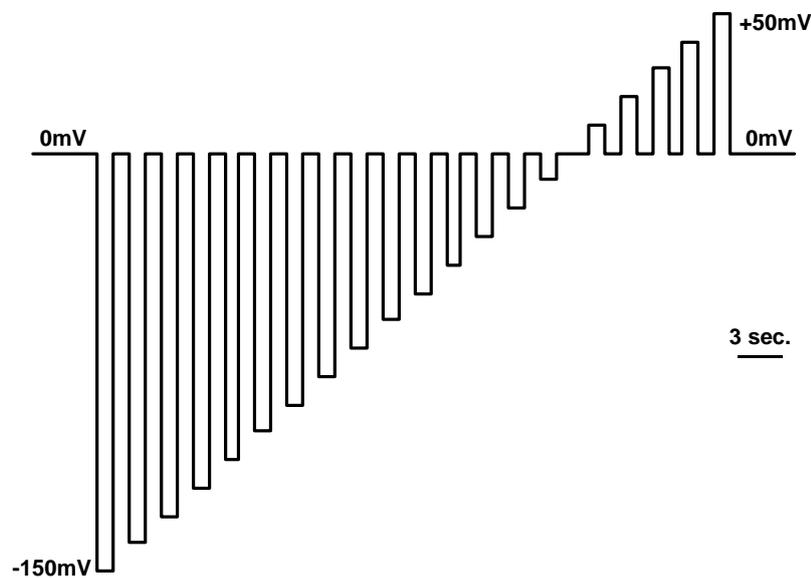


Abb.7: Darstellung des verwendeten Pulsprotokolls.

2.5. Durchführung der Experimente

Alle Experimente wurden 2 – 7 Tage nach cRNA-Injektion bei Raumtemperatur in einer mit Versuchslösung durchspülten Messkammer durchgeführt. Die Oozyte wurde im Lösungsbad ständig von Lösung umspült, wobei die Flussgeschwindigkeit 20 ml/min betrug und einen völligen Austausch innerhalb von 10 Sekunden ermöglichte.

Sämtliche Experimente wurden an verschiedenen Oozytenpräparationen unterschiedlicher Frösche an mehreren Tagen wiederholt. Dabei ergaben sich keine qualitativen Unterschiede, lediglich die Größe der maximalen Ströme variierte in Abhängigkeit des Zeitpunktes der cRNA-Injektion (d.h. der schon erfolgten Expression) und der jeweiligen Oozytenpräparation (25). Der maximale Aminosäurestrom wurde meistens am vierten und fünften Tag gemessen.

2.6. Uptake – Messungen

Nach der Injektion wurden Gruppen von je 7 - 10 Oozyten in 5 ml-Polypropylenröhrchen überführt und zweimal mit ND96 pH 7,4 gewaschen. Der Waschpuffer wurde abgesaugt und durch 100 µl Transportpuffer (ND96 zusammen mit 10 mM 5kBq [¹⁴C]-markiertes und nichtmarkierte Glutamin) ersetzt.

Der Transport wurde beendet, indem die Oozyten dreimal mit 4 ml eiskaltem ND96 gewaschen wurden. Die einzelnen Oozyten wurden in Zählröhrchen plaziert und in 200 µl 10%igem Natriumdodecylsulfat (SDS) gelöst. Nachdem 3 ml Zählflüssigkeit hinzugefügt wurde, wurde ihre Radioaktivität in einem Szintillationszähler gemessen (Wallac, Perkin Elmer, Wellesley, USA) (62).

2.7. Auswertung und Statistik

Alle Konzentrations-Wirkungskurven wurden mit der Hill-Gleichung berechnet.

Hill-Gleichung:

$$I = I_{\max} * C^n / C^n + K_m^n$$

wobei:

- I: Gemessener Strom
- I_{\max} : Maximaler Strom
- C: Substratkonzentration
- K_m : Substratkonzentration bei halbmaximaler Transportrate
- n: Hillkoeffizient, gibt die Anzahl der Substratbindungsstellen am Molekül bzw. am Transporter an. Dies gilt jedoch nur für den Fall einer starken kooperativen Bindung des Substrates. Für die Transportkinetiken muß deshalb angenommen werden, dass die nächst höhere natürliche Zahl zu n lediglich die minimale Zahl an möglichen Bindungsstellen angibt (128).

Alle Werte sind als arithmetisches Mittel \pm dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM: Standard Error of the Mean) angegeben. "n" gibt die Anzahl der voneinander unabhängigen Messungen an. Die Werte wurden mit dem ungepaarten t-Test nach Student auf Signifikanz geprüft, wobei als Signifikanzgrenze $p < 0,05$ angesehen wurde. Ströme mit dem Präfix "-" sind Einwärtsströme, mit "+" gekennzeichnete Ströme sind auswärtsgerichtet.

3. Ergebnisse

3.1. Elektrogene Eigenschaften des glutamininuzierten Stroms I_{Gln}

Die SN1 exprimierenden Oozyten hatten unter Kontrollbedingungen (ND96) ein durchschnittliches Membranpotential von $37,7 \pm 0,77$ mV ($n=40$). Im "Voltage-Clamp" Modus bei einem Haltepotential von -60 mV verursachte 10 mM Glutamin einen einwärts gerichteten Strom I_{Gln} von $-22,40 \pm 2,35$ nA ($n=34$). In mit Wasser injizierten Kontrolloozyten ergab 10 mM Glutamin keinen signifikanten Strom ($-0,67 \pm 0,11$ nA, $n=6$).

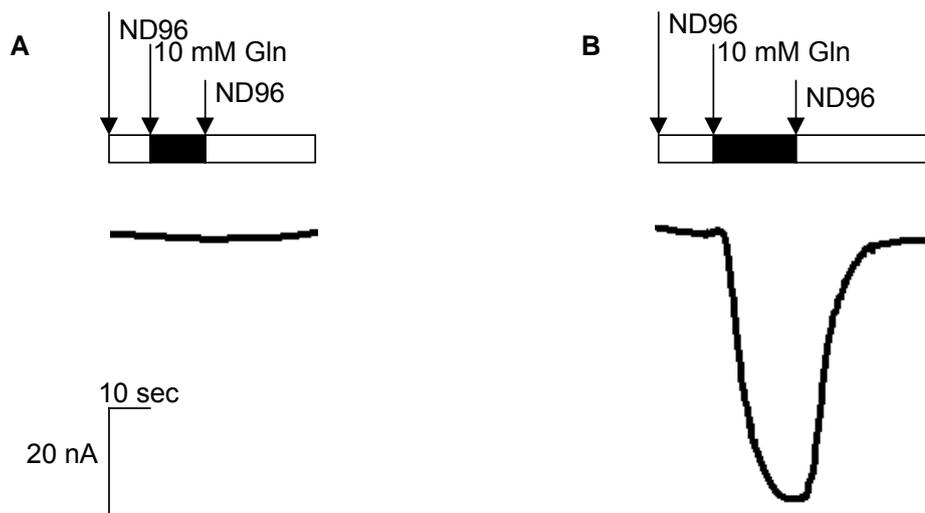


Abb.8: Originalaufzeichnung: Applikation von 10 mM Glutamin in (A) Kontrolloozyten und (B) SN1 exprimierenden Oozyten: Glutamin induzierter Einwärtsstrom im "Voltage-Clamp" Modus. Die Pfeile kennzeichnen den Beginn der Superfusion mit Glutamin bzw. mit ND96.

3.2. Allgemeine Charakterisierung des SN1

3.2.1 Substratabhängigkeit des Glutamineinstroms durch SN1 in die Zelle

3.2.1.1 Glutaminabhängigkeit

Der durch Glutamin induzierte Strom I_{Gln} war von der extrazellulären Glutaminkonzentration abhängig und sättigbar. Außerdem bestand eine Abhängigkeit von der extrazellulären Natriumkonzentration und der vorgegebenen Spannung.

Die Abhängigkeit des Glutamintransports wurde zunächst unter 100 mM Natrium in der Testlösung untersucht. Hierbei wurden Konzentrationen zwischen 0,1 und 30 mM Glutamin für jeweils 10 Sekunden bei einem Haltepotential von -60 mV (Abb.9) bzw. bei verschiedenen Haltepotentialen (Abb.10) verwendet.

Die Spannungsabhängigkeit des Glutamintransports zeigt, dass eine Hyperpolarisation den maximalen Strom V_{max} vergrößert, ohne die Substrataffinität zu beeinflussen. K_m - und V_{max} -Werte sind für die jeweiligen Haltepotentiale in Tabelle 5 aufgeführt.

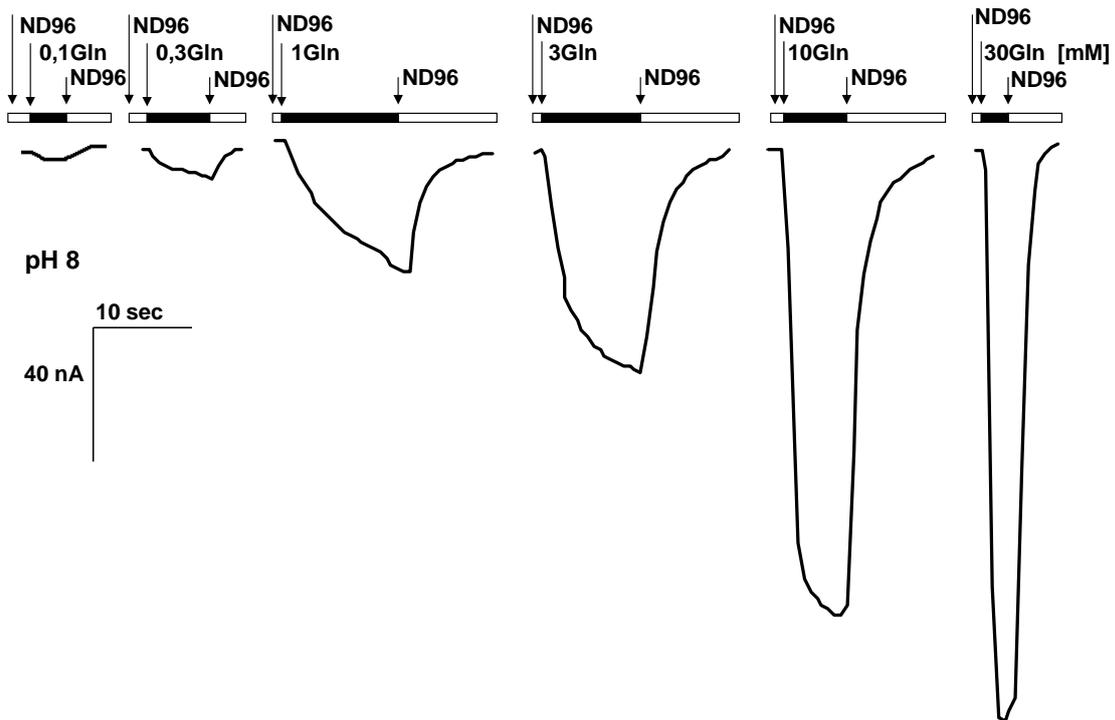


Abb.9: Originalaufzeichnungen: I_{Gln} bei pH8, -60mV und 100mM Na^+ , Glutaminkonzentrationen zwischen 0.1 mM und 30 mM . Die Pfeile kennzeichnen den Beginn der Superfusion mit Glutamin bzw. mit ND96.

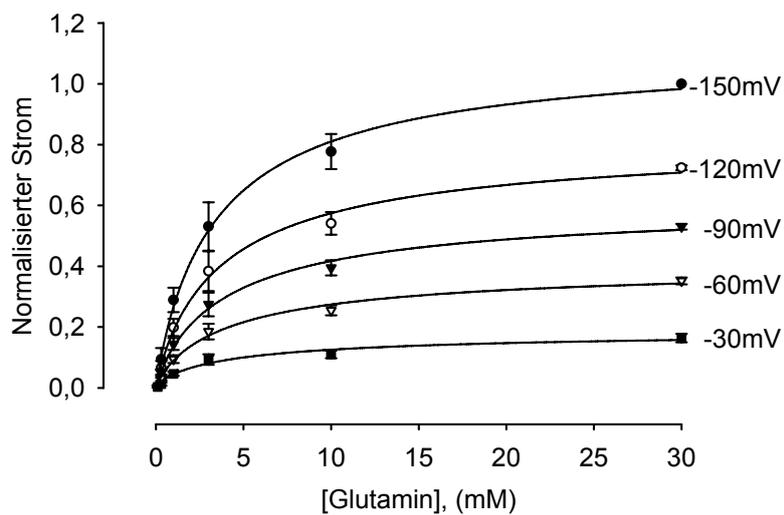


Abb.10: Substratabhängigkeit der durch Glutamin (0.1mM bis 30mM Gln) induzierten Ströme bei verschiedenen Haltepotentialen (-30mV bis -150mV , pH8, 100mM Na^+). Alle Werte wurden auf den Mittelwert bei -150mV und 30mM Glutamin bezogen.

Ergebnisse

Haltepotential	K_m [mM]	V_{max}
-150	$5,96 \pm 3,90$	$1,15 \pm 0,14$
-120	$7,05 \pm 2,88$	$0,86 \pm 0,08$
-90	$6,10 \pm 2,22$	$0,62 \pm 0,05$
-60	$6,28 \pm 2,05$	$0,43 \pm 0,03$
-30	$8,03 \pm 2,46$	$0,19 \pm 0,02$

Tabelle 5: K_m - und V_{max} -Werte für Glutamin bei verschiedenen Haltepotentialen (-30mV bis -150mV, pH8, 100mM Natrium).

Nach der Spannungsabhängigkeit und der Abhängigkeit von der Substratkonzentration folgte die Untersuchung der Reaktion des Glutaminstroms auf die extrazelluläre Protonenkonzentration (Abb.11). Die Affinität für Glutamin ist nicht abhängig von der extrazellulären Protonenkonzentration. Tabelle 6 zeigt die K_m - und V_{max} -Werte für die einzelnen pH-Werte.

pH	K_m [mM]	V_{max}
8	$6,03 \pm 1,01$	$1,18 \pm 0,20$
7	$5,63 \pm 0,77$	$0,85 \pm 0,48$
6	$4,21 \pm 2,25$	$0,07 \pm 0,02$

Tabelle 6: K_m - und V_{max} -Werte für das Substrat Glutamin in Abhängigkeit von der extrazellulären Protonenkonzentration (Haltepotential -60mV, 100mM Na^+).

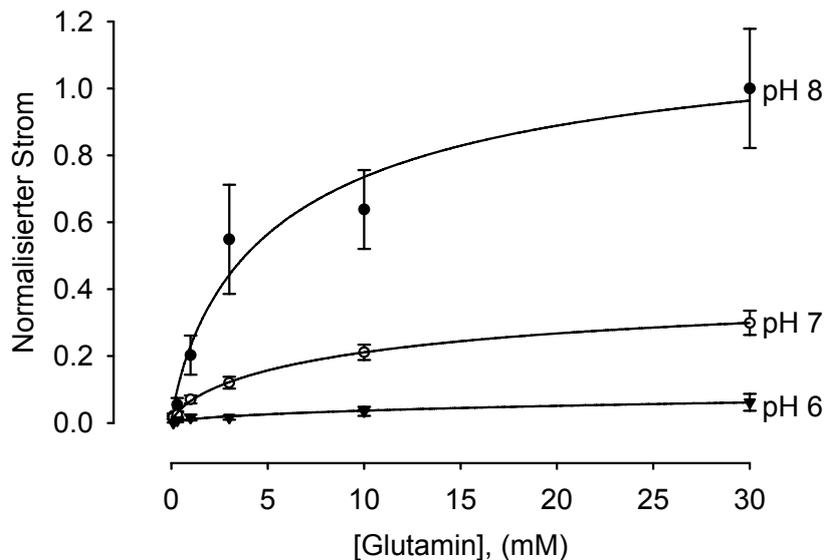


Abb.11: Glutamin-Konzentrations-Wirkungskurve bei pH8, pH7 und pH6. Alle Werte wurden auf den maximalen Strom bei pH8 und 30mM Glutamin bezogen.

3.2.1.2 Natriumabhängigkeit

Der glutamininduzierte Strom I_{Gln} ist abhängig von der extrazellulären Natriumkonzentration: Der Glutaminstrom ist eine Funktion extrazellulärer Na^+ -Konzentration. Im Folgenden wurde deshalb der Einfluß der Na^+ -Ionenkonzentration im Bereich zwischen 0 mM und 100 mM genauer untersucht (Abb.12, Tab.7).

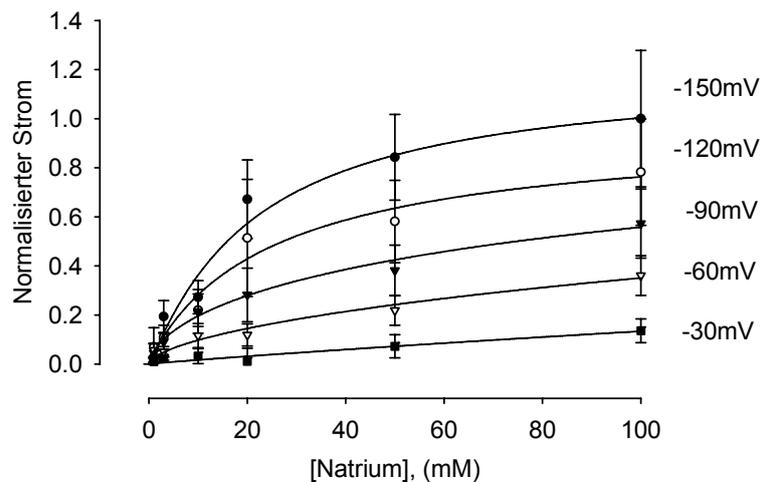


Abb.12: Substratabhängigkeit des durch Natrium induzierten Ladungstrfers. (0 bis 100mM Natrium, 10mM Glutamin, pH8) bei verschiedenen Haltepotentialen (-150, -120, -90, -60, -30mV). Alle Werte wurden auf den maximalen Strom bei 100mM Natrium und -150mV bezogen.

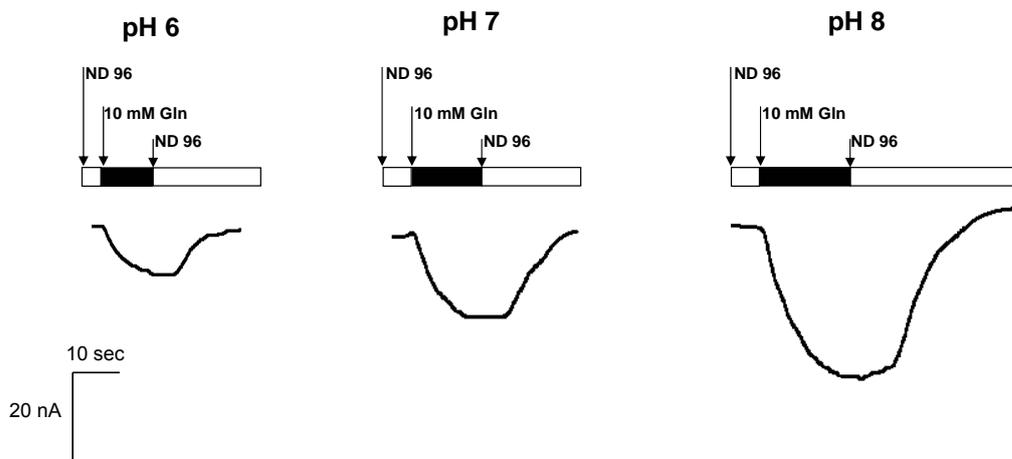


Abb.13: Originalaufzeichnung: Glutamininduzierter Einwärtsstrom im "Voltage-Clamp" Modus. (100mM Na^+ , 10mM Gln, pH6, pH7 und pH8). Die Pfeile kennzeichnen den Beginn der Superfusion mit Glutamin bzw. mit ND96.

Außerdem zeigt Abbildung 12 noch die Natriumabhängigkeit der glutamininduzierten Ströme I_{Gln} bei verschiedenen Membranhaltspotentialen von -30mV bis -150mV . Die Spannungsabhängigkeit des durch Natrium hervorgerufenen Ladungstransfers zeigt auch hier, dass Hyperpolarisation nur den maximalen Strom V_{max} vergrößert, ohne die Affinität für das Substrat Natrium zu beeinflussen (Tab.7).

Haltepotential	K_m [mM]	V_{max}
-150	$38,10 \pm 12,41$	$1,64 \pm 0,55$
-120	$57,84 \pm 24,58$	$1,55 \pm 0,42$
-90	$49,27 \pm 32,80$	$1,26 \pm 0,34$
-60	$62,29 \pm 20,98$	$0,51 \pm 0,30$
-30	$48,70 \pm 28,60$	$0,19 \pm 0,08$

Tabelle 7: K_m - und V_{max} -Werte für Natrium bei verschiedenen Haltepotentialen (pH8, -30mV bis -150mV , und 10mM Glutamin)

Zuletzt wurde die Natriumkinetik bei pH8, pH7 und pH6 mit SN1 ermittelt, um die Konkurrenz von Protonen mit Natrium zu untersuchen. Die Affinität für Natrium nimmt mit zunehmender Protonenkonzentration ab. In Tabelle 8 sind die einzelnen Werte aufgeführt. In Abbildungen 13 und 14 ist deutlich zu erkennen, dass bei pH7 mit 100mM Na^+ die glutamininduzierten Ströme I_{Gln} bzw. die Steigung der Kurve höher ist als bei pH6.

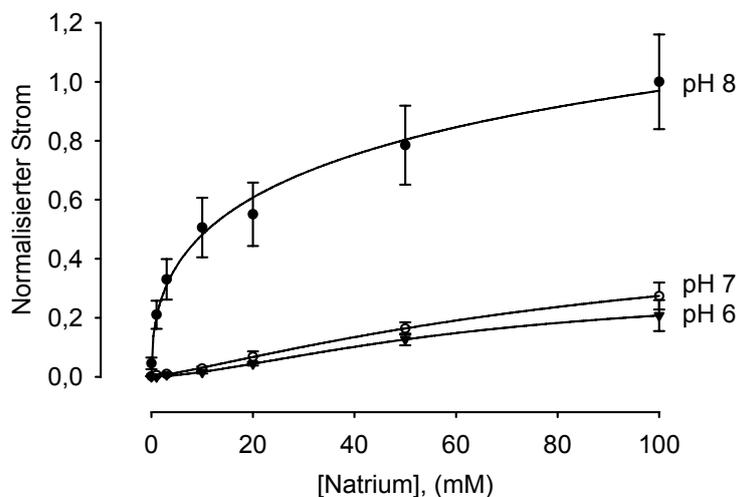


Abb.14: SN1: Natrium-Konzentrations-Wirkungskurve (0 bis 100mM Na^+ , 10mM Gln) bei pH8, pH7 und pH6. Alle Werte wurden auf den maximalen Strom bei pH8 und 100mM Na^+ bezogen.

pH –Wert	K_m [mM]	V_{max}
8	$58,29 \pm 20,28$	$1,52 \pm 0,25$
7	$86,06 \pm 29,44$	$0,69 \pm 1,31$
6	$126,67 \pm 61,57$	$0,52 \pm 0,26$

Tabelle 8: K_m - und V_{max} -Werte für Natrium in Abhängigkeit von der extrazellulären Protonenkonzentration (Haltepotential -60mV , 10mM Gln).

3.2.2. pH-Abhängigkeit des SN1 induzierten Glutaminstroms

Wie bereits erwähnt, zeigen auch Abbildungen 11, 14 und Tabelle 5, dass der Strom äußerst von der extrazellulären Protonenkonzentration abhängig ist. SN1 ist bei pH 6 beinahe inaktiv und wird durch extrazelluläre Alkalinisierung um das 2-3fache im Vergleich zur Kontrolle (pH7) stimuliert (Abb.16).

Die Modulation des Stroms als Funktion des extrazellulären pH ist hauptsächlich der Alteration des maximalen Stromes zuzuschreiben und nicht der Änderung der Affinität für das Substrat Glutamin (K_m).

Der Abfall des maximalen Stromes bei pH 6 resultiert wahrscheinlich aus der Unfähigkeit, den maximalen Strom mit experimentell möglichen Na^+ -Konzentrationen zu erreichen. Das spiegelt sich in der dramatischen Zunahme des K_m -Werts für das Substrat Natrium bei pH 6 wider (Tab. 8).

Im Folgenden wurde die Reaktion der H^+ -Ionenkonzentration unter verschiedenen Haltepotentialen zwischen -150mV und $+50\text{mV}$ genauer untersucht.

Wie in Abbildung 15 dargestellt, ist der durch Glutamin induzierte Strom I_{Gln} eine Funktion der extrazellulären Protonenkonzentration. Der I_{Gln} verschwindet bei einem pH-Wert von 6. Ein alkalisches Milieu stimuliert die Transportrate durch SN1.

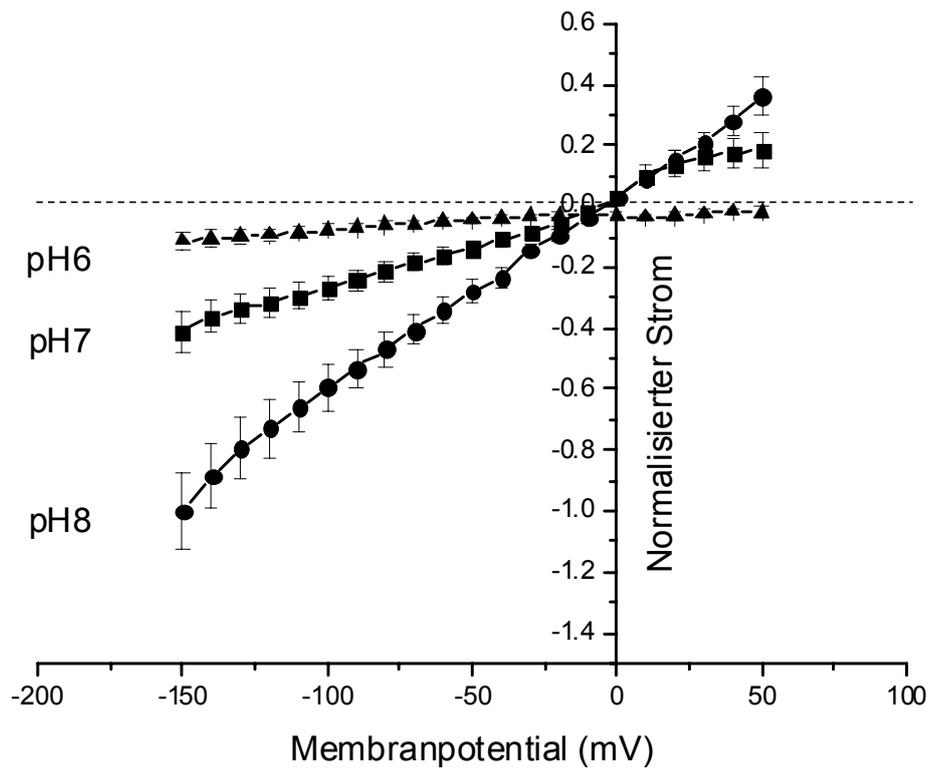


Abb.15: I_{Gln} als Funktion des Membranpotentials bei verschiedenen Protonenkonzentrationen (10mM Gln, 100mM Na^+). Alle Werte wurden auf den maximalen Strom bei $-150mV$ und pH8 bezogen.

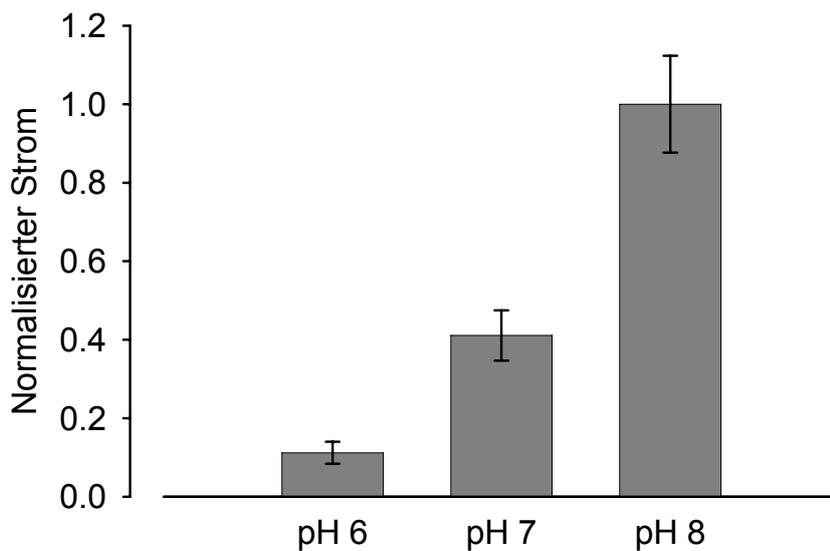


Abb.16: Normalisierte Einwärtsströme (Haltepotential $-150 mV$).

Die Variation der extrazellulären Protonenkonzentration hatte gezeigt, dass substratinduzierte Ströme von in Oozyten exprimiertem SN1 auch von Protonen getragen werden (30). Die glutamininduzierten Ströme I_{Gln} kehren bei einem Haltepotential von -6 mV um, ohne dass sie an eine Substrattranslokation gebunden sind.

3.3. Regulation des SN1

3.3.1 Einfluss der Ubiquitin Ligase Nedd4-2 und der Serum- und Glukokortikoid-induzierten Kinase ^{S422D}SGK1, SGK3 und der Proteinkinase ^{T308D,S473D}PKB auf SN1

Die Koexpression von ^{S422D}SGK1 erhöht signifikant die durch Glutamin induzierten Ströme auf $153,80 \pm 20,32\%$ der mit Wasser injizierten Kontrollzellen (n=25).

Eine sogar stärkere Aktivierung des durch SN1 vermittelten Transports wird bei Koexpression der SGK3 ($218,97 \pm 35,13\%$) und der konstitutiv aktiven Proteinkinase B ($328,32 \pm 49,42\%$, Abb.17) beobachtet.

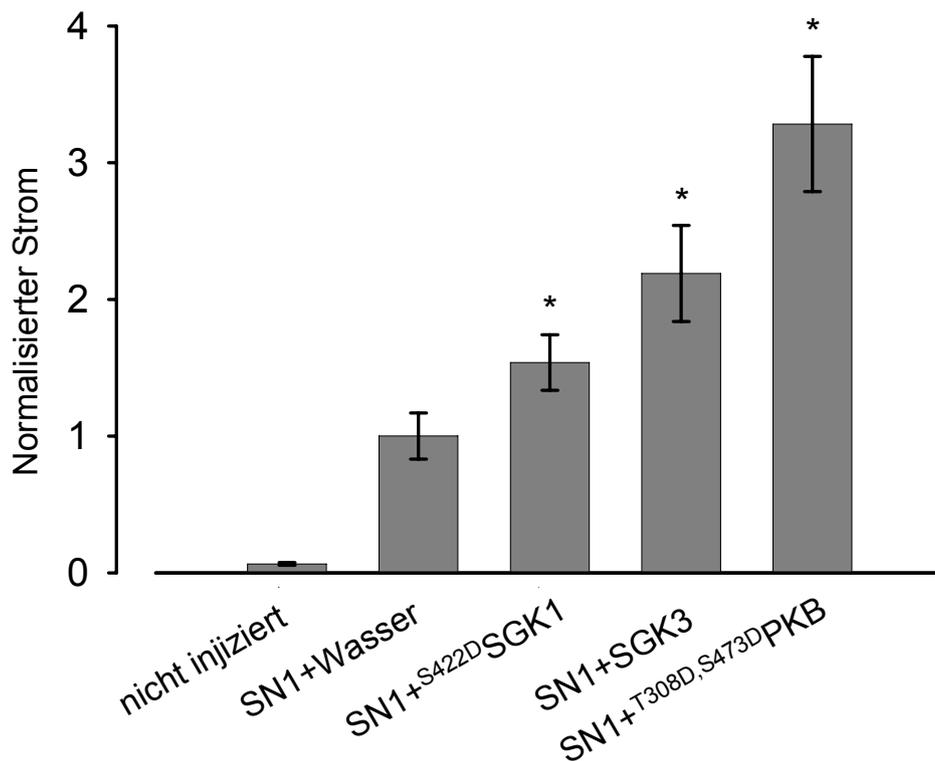


Abb.17: Regulation des SN1 durch die Proteinkinasen ^{S422D}SGK1, SGK3 und ^{T308D,S473D}PKB.

Die Koexpression der Ubiquitin Ligase Nedd4-2 bewirkt umgekehrt eine Abnahme der glutamininduzierten Ströme I_{Gln} . Nedd4-2 senkt I_{Gln} auf $23,06 \pm 4,74\%$ gegenüber den Kontrollzellen ($n=21$, Abb.18).

Die zusätzliche Injektion der cRNA der konstitutiv aktiven S^{422D} SGK1 zu Nedd4-2 und SN1 hebt den Effekt der Ubiquitin Ligase komplett auf. S^{422D} SGK1 inaktiviert die Ubiquitin Ligase Nedd4-2 und erreicht dabei $69,73 \pm 23,12\%$ des Stroms, den mit Wasser injizierten Oozyten zeigen.

Die Kinasen SGK3 und $T^{308D,S473D}$ PKB sind ebenfalls fähig den inhibitorischen Effekt von Nedd4-2 aufzuheben ($173,73 \pm 35,98\%$ und $184,66 \pm 38,63\%$ gegenüber den mit Wasser injizierten Oozyten, Abb.18).

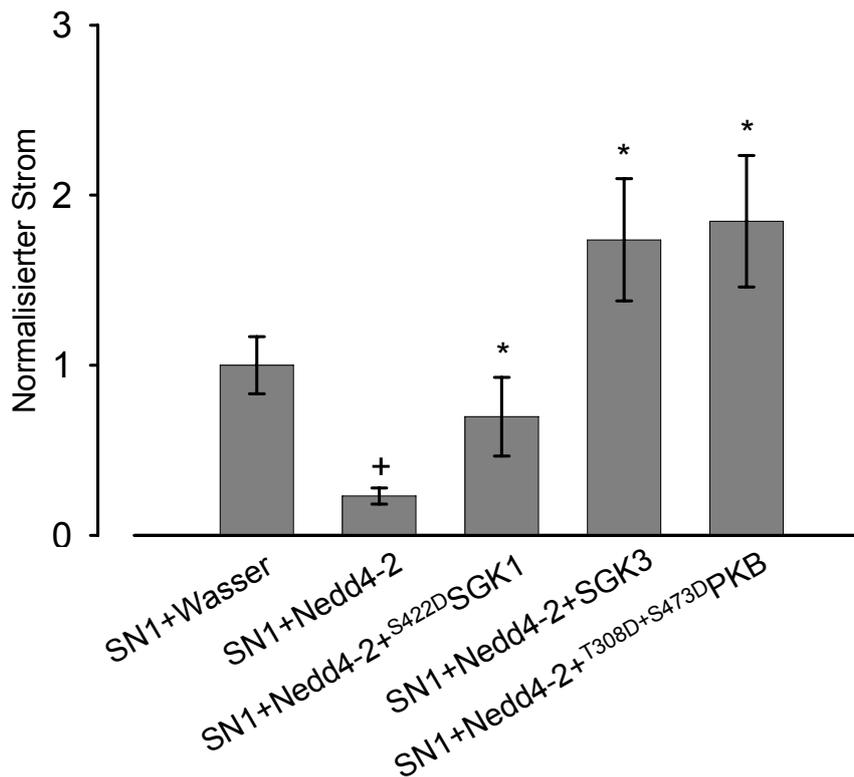


Abb.18: Nedd4-2-Regulation des SN1 mit und ohne Koexpression der Proteinkinasen S^{422D} SGK1, SGK3 und $T^{308D,S473D}$ PKB.

Um auszuschließen, dass ein Anstieg der glutamininduzierten Ströme I_{Gln} durch die Aktivität von intrinsischen pH-sensitiven Ionenkanälen verursacht wird (da Protonen in entgegengesetzter Richtung durch SN1 transportiert werden), führten wir Experimente durch, bei denen die Glutaminaufnahme über ^{14}C -Markierung des Substrats charakterisiert worden ist (Abb.19) (62). Mit markiertem Substrat in den Versuchslösungen, erhielten wir qualitativ ähnliche Ergebnisse wie in elektrophysiologischen Experimenten. Die Glutaminaufnahme war in SN1 injizierten Oozyten 10-fach höher im Vergleich zu nichtinjizierten Oozyten ($367,88 \pm 18,29$ pmol/10min/Oozyte verglichen mit $38,99 \pm 6,41$ pmol/10 min/Oozyte) (Abb.19).

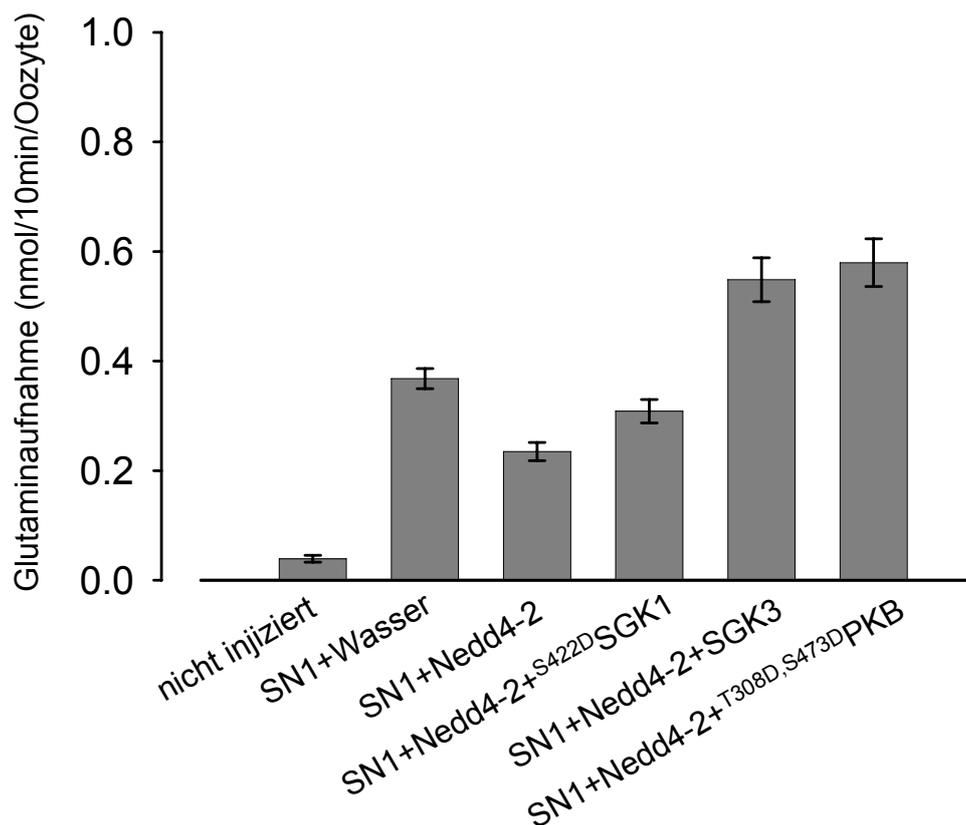


Abb.19: Fluxmessung: Nedd4-2-Regulation des SN1. Die Glutaminaufnahme wurde über ^{14}C -Markierung des Substrats ermittelt.

Die signifikante Abnahme des glutamininduzierten Stroms I_{Gln} durch die Koexpression von Nedd4-2 ($63,81 \pm 4,48\%$ relativ zur Kontrolle, $n=26-48$) wird auch hier durch die weitere Koexpression von entweder konstitutiv aktiver ^{S422D}SGK1 ($83,85 \pm 5,81\%$), SGK3 ($149,09 \pm 10,90\%$) oder konstitutiv aktiver ^{T308D,S473D}PKB ($157,48 \pm 11,85\%$) aufgehoben (Abb.19).

Die Experimente in der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass die Änderung der glutamininduzierten Ströme I_{Gln} in der Tat direkt durch die SN1-Transportaktivität verursacht wird und nicht indirekt durch die sekundäre Aktivierung von K^+ -Kanälen.

4. Diskussion

4.1. Fehlerdiskussion

4.1.1. Oozytenpräparation

Durch Translation der *in vitro* synthetisierten cRNA in Oozyten erfolgt eine Expression des jeweiligen Proteins in der injizierten Oozyte (41). Die Expression von endogenen Membranproteinen in *Xenopus* Oozyten ist im allgemeinen unbedeutend gering im Vergleich zur hohen Expression von exogenen Proteinen nach cRNA-Injektion (26).

Es gab deutliche Unterschiede der Oozyten, die sich in der Größe ihres Ausgangsmembranpotentials und des basalen Leckstromes ausdrückten. Die Qualität war abhängig vom präparierten Frosch, der Präparation selbst und dem Alter der Oozyten. In jedem Fall musste eine intakte Oozyte ein Ruhemembranpotential zwischen -30 und -70 mV haben (41).

Es wurden nur Serien verwendet, deren Oozyten unter Superfusion mit 10 mM Glutamin einen Einwärtsstrom von mehr als 8 nA zeigten.

Außerdem konnten durch Veränderungen der charakteristischen Färbung (bei intakten Zellen ist die helle vegetative Hälfte von der schwarzen animalischen Hälfte exakt abzugrenzen) und der Kugelform absterbende oder infizierte Oozyten, die nicht zur Versuchsdurchführung geeignet waren, ohne Schwierigkeiten erkannt und aussortiert werden.

Desweiteren ergaben sich Unterschiede aus der Injektion der cRNA. Die Konzentration der injizierten cRNA und deren Qualität (Verunreinigungen der RNA) konnten leicht schwanken. Dies hatte allerdings nur Einfluß auf die Expressionsrate, andere Veränderungen konnten nicht beobachtet werden. Auf das Verhalten der Zellen konnten sich weiterhin die Temperatur des Inkubators bei der Aufbewahrung, Schwankungen der Außentemperatur bei Versuchsdurchführung, Unterschiede zwischen verschiedenen Fröschen, verschiedenen Präparationen oder die Defollikulation auswirken.

Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden aufgrund der erwähnten Variationsmöglichkeiten ausreichend viele Versuche mit Oozyten von verschiedenen Fröschen durchgeführt.

Von zentraler Bedeutung ist, dass Regulationsprozesse, die zelluläre Systeme miteinbeziehen (z.B. intrazelluläre *second-messenger* Kaskaden) sehr vorsichtig interpretiert werden müssen und nicht ohne weiteres auf die *in vivo* Situation übertragen werden können. Außerdem kann die natürliche Umgebung des Transportproteins nur ungenügend in den Oozyten simuliert werden.

4.1.2. Geräte, Lösungen und Chemikalien

Die Messanordnung sollte weitgehend frei von mechanischen Schwingungen oder Erschütterungen sein, weshalb ein schwingungsarmer Tisch verwendet wurde. Desweiteren konnte eine plötzliche starke Beschleunigung der Flussrate eine Erschütterung verursachen, wobei sich die Messelektroden verschieben und das Einstichloch in der Zellmembran vergrößern konnten. Dadurch wurde die Abdichtung zwischen Pipette und Membran gestört, und das Membranpotential konnte nicht mehr aufrecht gehalten werden. Häufig erholte sich die Zelle nach spontanem Verschluss und Abdichten des Lochs, erreichte aber nicht das vorherige Membranpotential.

Elektromagnetische Schwingungen konnten zu einem Rauschen und damit einer Verschlechterung der Messgenauigkeit führen, dies wurde durch Abschirmung mit einem *Faraday*'schen Käfig weitgehend vermieden.

Durch Verstopfen oder Abbrechen der Elektrodenspitze konnte es zu einer Verfälschung der Messwerte kommen.

Vor und nach jeder Messung wurden deshalb Elektrodenoffset und Elektrodenwiderstand überprüft, um die erwähnten Fehlerquellen möglichst klein zu halten.

Um zu vermeiden, dass aus Vorversuchen im Zuleitungssystem hängengebliebene Chemikalien oder ihre Abbauprodukte während des laufenden Versuchs abgelöst werden konnten und zu Artefakten führten, wurde

das Zuleitungssystem nach Durchfluss der Versuchslösungen regelmäßig mit Alkohol und Wasser gespült, um so das Ausfallen von Lösungen zu verhindern.

4.2. Die Verwendung elektrophysiologischer Techniken und der “Tracer-Flux”-Methode zur Untersuchung des SN1

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Techniken zur Untersuchung des Glutamintransports durch in Oozyten exprimierten SN1 verwendet:

Elektrophysiologische Experimente SN1 injizierter Oozyten und Kontrolloozyten ermöglichen eine klare Trennung zwischen intrinsischen und exogenen Transportphänomenen, da das durch die cRNA-Injektion exprimierte elektrogene Protein in einer sehr hohen Konzentration vorhanden ist. Einflüsse, die den Glutamintransport direkt am Transportmolekül regulieren, können so genauer analysiert werden. Mit Hilfe der “Voltage-Clamp” Technik war es erstmals möglich zu zeigen, dass der Na^+ - und H^+ -abhängige Glutamintransport durch SN1 elektrogen ist (53).

Obwohl Transportstudien mit radiomarkierten Substraten (“Tracer uptakes”) (62) zeitaufwendiger sind als mit elektrophysiologischen Techniken sind “Tracer uptakes” unentbehrliche Methoden für die Untersuchung von Transportprozessen in Oozyten, v.a. von elektroneutralen Transportern. “Tracer uptakes” sind normalerweise empfindlicher als die Elektrophysiologie (148). Um einen exakten Vergleich zwischen den Tracer-Fluxexperimenten und den “Voltage-Clamp” Experimenten treffen zu können, wurden beide Experimente parallel an Oozyten derselben Serie durchgeführt.

Die Kinetiken, welche mit beiden Methoden ermittelt worden sind, sind übereinstimmend und die Ergebnisse reproduzierbar.

Die Charakterisierung des Glutamintransports in Oozyten mit Hilfe der “Voltage-Clamp” Methode hat den Vorteil, dass durch das kontrollierte Austauschen von Lösungsbestandteilen Abhängigkeiten, etwa die Glutaminabhängigkeit, sehr leicht und präzise zu studieren ist (47,148).

Nachteile der Methode sind: Die Ströme liefern nur bedingt qualitative Aussagen zur Substrat-Transportrate (20). Es können nur elektrogene Transportphänomene, wie z.B. SN1 oder Na⁺/K⁺-ATPase, charakterisiert werden und nicht elektroneutrale Transportphänomene, wie z.B. GLUT, URAT oder Aquaporine. Molekularbiologische Prozesse lassen sich mit der elektrophysiologischen Methode kaum untersuchen (20,41).

4.3. Allgemeine Charakterisierung des SN1

4.3.1. Transporteigenschaften und –mechanismus von SN1

Anfänglich sind widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf die Elektrogenität des SN1-vermittelten Glutamintransports berichtet worden. Es wurde angenommen, dass der natrium- und protonengekoppelte Glutamintransport durch SN1 Glutamin mit Natrium im Austausch von einem Proton kotransportiert (20,29) und folglich einen elektroneutralen Transport vermittelt. Anschließende Studien haben gezeigt, dass es sich um einen elektrogenen Transportmechanismus handelt, da in Oozyten exprimierter SN1 substratinduzierte Ströme hervorgerufen hatte (20,29,53). Bisher war es unklar, ob es sich dabei um endogene Ströme des Oozyten handelt, ausgelöst durch Änderungen des intrazellulären pH-Werts, oder ob es tatsächlich ein Transportmerkmal des SN1 ist (31,32). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass substratinduzierte Ströme I_{Gln} durch die Transportaktivität des SN1 selbst verursacht werden. Dafür sprechen die Flux-Experimente und die gleichzeitige Induktion der SN1-Ströme und des Glutaminfluxes bei Koexpression von Proteinkinasen.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass SN1 bei extrazellulärer Applikation von Glutamin das Zellmembranpotential depolarisiert, was für den Nettoeinstrom positiver Ladungen oder den -ausstrom negativer Ladungen spricht. Im "Voltage-Clamp"-Modus wurde ein Einwärtsstrom bei SN1-Aktivität beobachtet.

Ein Einwärtsstrom unter "Voltage-Clamp" Bedingungen deutet auf den Einstrom positiver Ladungen oder den Ausstrom negativer Ladungen hin. Der substratinduzierte Strom kehrt im *Xenopus* Oozyten bei etwa -6 mV um und wird zum Auswärtsstrom. Diese Tatsache bestätigt, dass glutamininduzierter Strom I_{Gln} nicht an eine Substrattranslokation gekoppelt ist. Weiterhin konnte in "Voltage-Clamp" Experimenten eine klare Natriumabhängigkeit des Stromes gezeigt werden mit einer wahrscheinlichen Natrium zu Proton Stöchiometrie von mindestens 2:1 (53).

Die Experimente lassen sich nur so interpretieren, dass ein Überschuss an positiven Ladungen durch den Kotransport von Natrium und Glutamin in die Zelle gelangt und so zu einem Einwärtsstrom bzw. zu einer Depolarisation führt. Die Natriumabhängigkeit des Glutamintransports konnte mehrfach für SN1 gezeigt werden (19,20,31,32,53). Der glutamininduzierte Strom I_{Gln} ist eine Funktion extrazellulärer Glutamin- und Natriumkonzentration. Das Transportsystem SN1 erfährt eine Stimulierung durch Erhöhung extrazellulären Substratangebots, wobei eine Sättigung des Transporters ab einer Konzentration von 30 mM Glutamin bzw. 100 mM Natrium erreicht wird. Die kinetischen Parameter sind weitgehend identisch mit denen, die bei den Uptake-Experimenten gewonnen wurden (20). In einer zuvor durchgeführten Analyse der Hill-Koeffizienten der Kinetik von Lithium wurde gezeigt, dass mindestens zwei Natriumionen mit Glutamin kotransportiert werden (53). Die Ergebnisse zur Stöchiometrie von Natriumionen und Protonen, die ein Verhältnis von mindestens zwei Natriumionen und zu einem Proton zeigen (53), können in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. In der bisherigen Literatur geht man von einem Natriumion aus, was die vermeintliche Elektroneutralität des Glutamintransporters SN1 erklären sollte (20,31,32). Der Hill-Koeffizient gibt die Kooperativität der Bindung der Moleküle an ein Enzym, oder in diesem Fall an ein Transportprotein an. Das Verhältnis von 2:1 ($\text{Na}^+:\text{H}^+$) besagt, dass mindestens zwei Natriumionen an das Transportprotein gebunden sind, wobei sie sich in ihrer Bindung wie zwei stark kooperativ bindende Natriumionen verhalten (128).

Der Kotransport von mindestens zwei Natriumionen pro Proton erklärt die beobachtete Elektrogenität des Glutamintransporters SN1 in der vorliegenden Arbeit, weil bei einem Protonenantiport immer eine positive Nettoladung in die Zelle transportiert wird.

Die kinetischen Parameter verdeutlichen, dass die Erhöhung der Natriumkonzentration hauptsächlich die maximale Transportrate erhöht, ohne die Affinität des Karriers für das Substrat Glutamin zu ändern. Die K_m -Werte zeigen untereinander keinen signifikanten Unterschied. In anderen Worten, die Bindung von Natrium beeinflusst nicht die Affinität zum Glutamin. Diese Tatsache stimmt mit einem Mechanismus überein, in welchem Glutamin zuerst bindet und Natrium danach. Bemerkenswert ist, dass diese Reihenfolge der Bindung kein gemeinsames Charakteristikum in der SLC38 Familie ist. Im Gegensatz zu SN1 bindet im Falle der System A Isoform SA1 (ATA1), das SN1 in seiner Empfindlichkeit gegenüber pH und der Regulation durch die Osmolarität ähnelt (13), Natrium vor Glutamin (3,31,32).

Die SLC38 Genfamilie umfasst die natriumabhängigen neutralen Aminosäuretransporter (SNAT), die zahlreiche physiologische Rollen beim Transfer von Glutamin zwischen Astrozyten und Neuronen im ZNS einnehmen, in der Ammoniakentgiftung und Glukoneogenese in der Leber und in der renalen Adaptation bei Azidosis. Neuere Studien belegen, dass SLC38 Transporter neue therapeutische Möglichkeiten in der Behandlung von Neoplasien darstellen (102).

Neben der Substratabhängigkeit konnte in den Versuchen eine klare Spannungsabhängigkeit des durch SN1 vermittelten Glutamintransports gezeigt werden. Diese Abhängigkeit wurde weiter durch Veränderungen des vorgegebenen Membranpotentials in "Voltage-Clamp" Versuchen untersucht. Der Glutamintransport war bei einer Natriumkonzentration von 100 mM stark spannungsabhängig.

Die Variation glutamininduzierter Ströme I_{Gln} entsprechend der Änderung der extrazellulären Protonenkonzentration zeigt (20), dass die extrazelluläre Alkalinisierung Stimulierung, bzw. ein extrazelluläres saures Milieu eine Inhibition hervorruft. Die vorliegende Arbeit zeigt weiterhin, dass, ähnlich der

kinetischen Parameter in der Abhängigkeit der Transportrate von der Natriumkonzentration, die extrazelluläre Protonenkonzentration hauptsächlich den maximalen Strom verändert, ohne signifikant die Affinität des Transporters für das Substrat Glutamin zu beeinflussen. Die Reduktion des maximalen Stroms I_{Gln} resultiert wahrscheinlich daraus, dass durch den niedrigen pH-Wert die Affinität zu Na^+ extrem abgenommen hat. Diese Tatsache spiegelt die Rolle der pH sensitiven "modifier" als Kennzeichen aller Mitglieder der SLC38 Familie wider, in der die pH-Abhängigkeit nicht über den Protonenantiport zu erklären ist, sondern von einer pH sensitiven "modifier site" verursacht wird (21). Die pH-Empfindlichkeit des SN1 Transporters hat eine physiologische Bedeutung in der Leber, da die hepatische Glutaminaufnahme und die Unterstützung der Harnstoffsynthese bei Alkalose stimuliert werden.

Trotz der Annahme, dass durch den Protonenantiport eine Alkalinisierung des Zytosols der Oozyten erreicht wird und als Folge durch Aktivierung endogener pH-regulierter Kaliumkanäle substratinduzierte Ströme I_{Gln} induziert werden können, unabhängig von der Transportaktivität des Systems N1, kann in der vorliegenden Arbeit jedoch ein anderer Mechanismus bewiesen werden, in dem substratinduzierte Ströme I_{Gln} eine intrinsische Eigenschaft des Transporters darstellen. Der Vergleich der kinetischen Parameter substratinduzierter Ströme mit denen der Uptakes und die gleichzeitige Aktivierung von Strömen und Substratflüssen durch Koexpression von Proteinkinasen ^{S422D}SGK1, SGK3 und ^{T308D,S473D}PKB deuten darauf hin, dass die Induktion des glutamininduzierten Stroms I_{Gln} ein eigenes Charakteristikum des SN1-Transporters ist. Auch in der Literatur wurde diese Transporteigenschaft mehrmals beschrieben (31,32).

4.3.2. Bedeutung und Mechanismus der Regulation von SN1 durch Proteinkinasen und Ubiquitin Ligase Nedd4-2

Ausgehend von den beobachteten Ergebnissen beeinflussen sowohl die Proteinkinasen SGK1, SGK3 und PKB als auch die Ubiquitin Ligase Nedd4-2 die durch Glutamin hervorgerufenen Ströme. SN1 ist offensichtlich Ziel für die Ubiquitin Ligase Nedd4-2, welche das SN1-Protein ubiquitiniert, das dadurch endozytotisch internalisiert und zur Proteindegradierung vorbereitet wird (43,133). Nedd4-2 ist Ziel der serum- und glukokortikoidabhängigen Kinase SGK1 und ihrer Isoformen (43,133). SGK1 phosphoryliert Nedd4-2 und inaktiviert auf diese Weise die Ubiquitin Ligase.

Es wird postuliert, dass SGK1 der Rückkopplungsmechanismus zwischen Zellvolumen und Membrantransportern sein könnte (151). In jüngsten Arbeiten ist gezeigt worden, dass SGK1 Ionenkanäle einschließlich des amilorid-sensitiven epithelialen Na^+ -Kanals ENaC (16,33,106,129) und des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv1.3 (60,61,153) stimuliert. Aldosteron reguliert hormonell die Natrium- und Wasserresorption in der Niere über den Amilorid-sensitiven epithelialen Na^+ -Kanal ENaC. Es wurde gezeigt, dass die Transkription der SGK im Sammelrohr der Niere ebenfalls durch Aldosteron erhöht wird (106). Eine Koexpression von SGK und ENaC in *Xenopus laevis* Oozyten führt zu einer mehrfachen Stimulation des Amilorid-sensitiven Na^+ -Stroms (33,106). Im Falle des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv1.3 wird die Funktion der SGK1 auch von ihren Isoformen SGK2 und SGK3 erfüllt (60).

Darüberhinaus werden SGK1 und 3 in einer Vielfalt von nicht-epithelialen und nicht-erregbaren Zellen exprimiert, was mehr oder weniger auf eine generelle Rolle dieser Isoformen in der Regulation von Zellfunktionen hinweist. In allen bisher untersuchten Geweben haben SGK1 und 3 ähnliche Effekte auf K^+ -Kanäle gezeigt, so dass erwartet werden kann, dass sie identische Funktionen haben. Die ähnlichen funktionellen Aktivitäten der SGK1 und ihrer Isoformen könnten noch darauf hindeuten, dass die Kinasen imstande sind, sich in speziellen Funktionen gegenseitig zu ersetzen. Genaue Differenzierung in der Expression von SGK1 in den einzelnen Organen zeigt extreme Unterschiede

innerhalb eines Organs. Die Niere z.B. exprimiert SGK1 nur im distalen Tubulus und im Glomerulum, aber nicht in der proximalen Tubulus (94). Auch die „Aufgabenverteilung“ der drei Kinasen innerhalb der Niere ist nicht identisch. Nachdem SGK1 K^+ -Kanäle in Zellen einer Funktionseinheit aktivieren kann, werden die gleichen K^+ -Kanäle von SGK2 und SGK3 von anderen Zellen innerhalb der Niere aktiviert. Die Spezifität der Kinasen verdeutlichen, dass die genomische Regulation der drei Kinasen fein abgestimmt ist (55,60). Außerdem ist gezeigt worden, dass SGK1 im Unterschied zu ihren Isoformen SGK2 und SGK3 durch Glukokortikoide, Mineralkortikoide und durch weitere Hormone und Mediatoren aktiviert wird. SGK2 und SGK3 jedoch sind resistent gegenüber den meisten oben genannten Stimuli (95). Allen gemein ist, dass alle drei Kinasen durch Insulin und „insulin-like-growth-factor“ IGF-1 stimuliert (88) werden und die Fähigkeit besitzen, spannungsgesteuerte Ionenkanäle zu stimulieren. Abhängig von dem Expressionsmuster in den Geweben und der Regulation können die drei Kinasen an der Regulation des epithelialen Transports und der Zellfunktion teilnehmen.

„Insulin-like-growth-factor“ (IGF1), auch als Somatomedin C bezeichnet, gehört in die Klasse der Wachstumsfaktoren und ist an der Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und –transformation beteiligt (11). Hauptsyntheseort von IGF-1 ist die Leber. Die IGF-1 Synthese wird durch das Wachstumshormon/„Growth hormon“ (GH) stimuliert. IGF-1 ist ein Polypeptid mit 67 Aminosäuren, welches 50% homolog zu Proinsulin ist.

Nedd4-2 ist nicht nur unter Kontrolle der SGK1, sondern auch unter Kontrolle der Isoform SGK3 und der Proteinkinase B. Sowohl SGK3 als auch PKB stimulieren wie SGK1 den SN1-Transporter. Wie SGK1 beeinflussen die Kinasen SGK3 und PKB die Aktivität der Ubiquitin Ligase Nedd4-2 auch, indem die Nedd4-2 phosphoryliert wird und dadurch die Bindung der Ubiquitin Ligase an das Zielprotein beeinträchtigt wird (43). Die vorliegende Arbeit zeigt deutlich, dass die Koexpression der Kinasen SGK1, SGK3 und PKB den Effekt von Nedd4-2 komplett aufhebt. Diese Beobachtung ist vereinbar mit der Hypothese, dass die Phosphorylierung die Interaktion zwischen SN1 und Nedd4-2 komplett aufhebt und die Ubiquitin Ligase inaktiviert.

Im Fall der Proteinkinase B, die die glutamininduzierten Ströme I_{Gln} potenter als die beiden anderen Kinasen stimuliert, ist nicht klar, ob die Wirkung auch über eine Inaktivierung der Ubiquitin Ligase erreicht wird. Da PKB die gleiche Konsensussequenz wie SGK1 hat, könnten beide Kinasen auf ähnliche Weise in der Modulation der Nedd4-2 Aktivität wirken. Welche Signalkaskade dann in der Regulation des SN1 Transporters eine Rolle spielt, ist noch nicht vollständig untersucht worden. Es konnte bisher gezeigt werden, dass PKB eine Fülle von Glukosetransportern stimuliert (38,76,90) und zudem noch ein zentraler Regulator des Wachstums, Überlebens, der Proliferation und Differenzierung ist.

Anzumerken ist, dass die exprimierten Proteinkinasen nicht konstitutiv aktiv sind, so dass diese erst aktiviert werden müssen. Die Aktivierung der Kinasen erfolgt durch einen Signalweg, der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und Phosphoinositid-abhängige Kinase (PDK1) involviert (88,113).

Die PI-3-Kinase ist eine Kinase, welche die Hydroxylgruppe an Position 3 des Inositolringes der Membranphosphatidylinositole phosphoryliert. Es entstehen Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat (PIP), Phosphatidyl-Inositol-3,4-Phosphat (PIP₂) und Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Phosphat (PIP₃). PIP₃ ist in allen eukaryontischen Zellen konstitutiv vorhanden. Die Konzentration der PIP₂ und PIP₃ steigen erst nach Stimulation der Zelle durch unterschiedliche Liganden an. Die PI-3-Kinase ist ein Heterodimer, bestehend aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit. Die regulatorische Untereinheit besitzt die Funktion eines Adapterproteins. Es sind 8 Isoformen der regulatorischen Untereinheit bekannt.

Die Aktivierung der Kinasen ist in den Oozyten nicht limitiert, obgleich die Expression der SGK3 den gleichen Effekt wie die Expression der konstitutiv-aktiven ^{S422D}SGK1 hat. In den vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass auch die SGK1 einen ähnlichen Effekt aufweist (58,94).

Die SGK1 könnte in der Regulation des Zellvolumens eine zentrale Bedeutung haben, da ein breites Spektrum von Zellfunktionen durch diese Regulation gesteuert werden. Mit eingeschlossen sind Protein- und Glykogenstoffwechsel, Zellmembran-assoziierte Transporte (einschließlich Ionenkanäle) und die

Genexpression (92,93). Folglich kann SGK1 über die Regulation des Zellvolumens hinaus, sowohl an der Regulation des epithelialen Transports, dem Stoffwechsel, der Hormonfreisetzung als auch an der Zellmigration, Zellproliferation und –überleben teilnehmen.

Die Erhaltung des Membranpotentials und damit des osmotischen Gleichgewichts erfordert den ständigen Transport von Ionen. Die SGK1 vermittelte Stimulation des Na^+ -Kanals führt zum Einwärtsstrom von Natriumionen in die Zelle, depolarisiert die Zellmembran und es treten Chloridionen in die Zelle ein. Es akkumuliert NaCl in der Zelle, was zur Erhöhung des intrazellulären Osmolarität führt und den Einstrom von Wasser mit sich bringt, wodurch sich das Zellvolumen erhöht (93,157). Der Zellschrumpfung folgt eine Erhöhung der Transkriptionsrate von SGK1 (10,150,152). Der volumenregulierte Natriumeinstrom kann durch ENaC und/oder andere Kationkanäle erfolgen (157), von welchen einige selbst durch die Koexpression mit SGK1 stimuliert werden (149). Auf der anderen Seite wird der stimulierende Effekt der SGK1 auf die K^+ - und Cl^- -Kanäle in Zusammenhang mit der Zellschwellung beobachtet, denn die Öffnung dieser Kanäle führt zum Ausstrom von KCl dem elektrochemischen Gradienten folgend und erniedrigt die zelluläre Osmolarität. Es kommt zur Inhibition der initial aktiven SGK1 (95).

Die durch Aminosäuren induzierte Zellschwellung erfolgt durch die Aufnahme von Aminosäuren durch Na^+ -abhängigen Aminosäuretransporter der Systeme A, N, und ASC (13). Die Anwesenheit von Aminosäuren senkt die Expressionsrate von SGK1. Sie wird erhöht durch erniedrigte Aminosäurekonzentration (150).

Demnach wird die Transkription von SGK1 durch Änderungen des Zellvolumens reguliert (88,150). Weil der gemeinsame Weg der posttranslationalen Aktivierung der Proteinkinasen über PI-3-Kinase und PDK1 geht, vermitteln möglicherweise die beiden anderen Kinasen SGK3 und PKB ähnliche metabolische Aktionen, bei denen wahrscheinlich die Zellvolumenzunahme durch Insulin über Aktivierung des $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-$ -Kotransport- und des Na^+/H^+ -Austauschsystems bedingt ist, was für die Auswirkungen von

Insulin auf den Protein- und Glukosemetabolismus verantwortlich gemacht werden. Entsprechend ist der Glutamintransport der Zellvolumenregulation unterworfen (120).

Mit diesen Befunden im Einklang steht die Beobachtung, dass die Proteinkinasen SGK1, 3 und PKB offensichtlich den Glutamintransport unter Mitwirkung von Hormonen regulieren. z.B wird der SGK1-sensitive Glutamintransport durch Glukokortikoide erhöht (140), welche die Expression von SGK1 stimulieren (156). Außerdem wird die Glutaminaufnahme durch Insulin (64,87,100,139) und "insulin-like-growth-factor" IGF1 (155) stimuliert. Es bestehen weitere Agonisten wie Zytokine und oxidativer Streß, die die Expressionsrate bzw. die Aktivität der Proteinkinasen erhöhen (88,95).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die möglichen Mechanismen bei der Modifikation des Glutamintransports durch die bisher genannten Stimuli nicht weiter analysiert. Möglicherweise werden durch die Proteinkinasen Faktoren aktiviert, die die Nedd4-2 Expression regulieren bzw. Mechnismen aktiviert, die den mRNA-Abbau beschleunigen.

Die Regulation von SN1 kann von entscheidender Bedeutung für die Regulation des Glutamintransports in Leber, Muskel und Gehirn sein (19,71), da sie eine zentrale Rolle bei der Anpassung der Glutaminaufnahme an die variablen Stoffwechselbedingungen des Organismus spielen können (154).

4.4. Schlussfolgerung aus der Arbeit

SN1 transportiert Glutamin natriumabhängig. Die zelluläre Aufnahme von Glutamin zeigt sich in einem Einwärtsstrom. Die Affinität des Transporters für Glutamin ist unabhängig gegenüber Änderungen des Extrazellulärraums in seiner Zusammensetzung bezüglich der Substratkonzentration. Der durch Natrium hervorgerufene Ladungstransfer hängt vom Membranpotential und pH-Wert ab.

Die hier präsentierten Daten lassen vermuten, dass der durch SN1 erzeugte Glutamintransport über einen Austauschmechanismus stattfindet, bei dem zwei Natriumionen gegen ein Proton ausgetauscht werden.

Bei der Untersuchung des in Oozyten exprimierten SN1 konnte festgestellt werden, dass die glutamininduzierten Ströme I_{Gln} von der extrazellulären Glutamin-, Natrium- und Protonenkonzentration und vom Glutamintransport abhängig sind. Folglich ist der beobachtete Transfer eine inhärente Eigenschaft des Transporters und spiegelt die Transportaktivität wider. Die SN1 mediierten Ströme sind inhibiert durch die Koexpression von Nedd4-2. Dieser Effekt wird durch die Koexpression von ^{S422D}SGK1, SGK3 und ^{T308D,S473D}PKB aufgehoben.

Die Serin/Threoninkinase SGK1 und ihre Isoformen sind neue und leistungsfähige Regulatoren des Glutamintransports, die sich voraussichtlich an der Regulation des Aminosäurestoffwechsels beteiligen werden.

5. Zusammenfassung

Der natrium- und protonengekoppelte Aminosäuretransporter SN1 ist verantwortlich für die Aufnahme von Aminosäuren, die in den Seitenketten Stickstoff enthalten: Histidin, Asparagin und Glutamin. Diese Substratspezifität ist identisch mit der des Aminosäuretransportsystems N.

SN1 ist der wichtigste Glutamintransporter. Vor allem wird er in Astrozyten und Hepatozyten exprimiert. In diesen Zellen vermittelt SN1 sowohl Glutaminaufnahme als auch -freisetzung. Der Transport ist gekoppelt an Natrium und Protonen.

Die SGK ist eine aldosteron- und zellvolumenregulierte Kinase, die in vielen Geweben wie Niere, Darm, Pankreas, und ZNS gefunden wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Aminosäuretransporter SN1 elektrophysiologisch und durch Fluxmessungen untersucht. Hierfür wurde SN1 in Oozyten exprimiert und mit Voltage-Clamp und Uptake Experimenten untersucht.

In der Charakterisierung des SN1-Transporters zeigte sich eine Abhängigkeit des Glutaminstroms I_{Gln} von der extrazellulären Glutamin- und Natriumkonzentration. Die substratinduzierten Ströme I_{Gln} zeigten eine Stimulation nicht nur durch Erhöhung der Glutamin- und Natriumkonzentration, sondern auch durch Hyperpolarisation und Alkalinisierung der Zelle. Eine Ansäuerung der Zelle auf pH6 inhibierte den Glutaminstrom.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich außerdem mit dem Einfluss der Proteinkinasen SGK1, SGK3 und PKB auf den SN1-Transporter und mit der Regulation des SN1-Transporters durch die Ubiquitin Ligase Nedd4-2.

Um die Regulation des SN1 zu untersuchen, wurden die substratinduzierten Ströme I_{Gln} elektrophysiologisch und die radioaktiven Glutamin-Uptakes in Oozyten bestimmt, die für SN1, Ubiquitin Ligase Nedd4-2 und/oder konstitutiv aktive Serum- und Glukokortikoid-abhängige Kinase ^{S422D}SGK1, ihre Isoform SGK3 und konstitutiv aktive Proteinkinase B (^{T308D,S473D}PKB) kodierten. Die Koexpression der Proteinkinasen und des SN1-Transporters führten zu einer 2 bis 4-fachen Stimulation des durch Glutamin induzierten Stroms I_{Gln} . Die

Koexpression von Nedd4-2 und SN1 hemmt den SN1-vermittelten Transport, während diese Hemmung durch die zusätzliche Koexpression von SGK1, SGK3 und PKB wieder aufgehoben wird. SN1 ist Ziel der Ubiquitin Ligase Nedd4-2, die durch die Serum- und Glukokortikoid-regulierte Kinase SGK1, ihre Isoform SGK3 und durch Proteinkinase B inaktiviert wird.

Die vorliegende Arbeit konnte anhand dieser Methode die Erkenntnisse des elektrogeneren Transports des Aminosäuretransporters des Systems SN1 bestätigen und korrigieren, sie aber auch durch neue Ergebnisse, wie die physiologische Regulation, erweitern.

6. Literaturverzeichnis

1. Abriel, H.; Kamynina, E.; Horisberger, J.D.; Staub, O. (2000). Regulation of the cardiac voltage-gated Na⁺ channel (H1) by the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *FEBS Lett.* 466, 377-380
2. Ahmad, S.; White, C.W.; Chang, L.Y.; Schneider, B.K.; Allen, C.B. (2001). Glutamine protects mitochondrial structure and function in oxygen toxicity. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 280(4), L779-91
3. Albers, A.; Broer, A.; Wagner, C.A.; Setiawan, I.; Lang, P.A.; Kranz, E.U.; Lang, F.; Broer, S. (2001). Na⁺ transport by the neural glutamine transporter ATA1. *Pflugers Arch.* 443, 92-101
4. Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. (1989). *Molecular Biology of the Cell*. 2nd ed., Garland Publishing New York, London
5. Alessi, D.R.; Andjelkovic, M.; Caudwell, B.; Cron, P.; Morrice, N.; Cohen, P.; Hemmings, B.A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15, 6541-6551
6. Alvarez-Leefmans, F.J. (1992). Extracellular Reference Electrodes. 171-182
In: Gratyn, R.; Kettenmann, H. (eds.): *Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology*. 1st ed., New York
7. Amos, B.J.; Chesler, M. (1998). Charakterization of an intracellular alkaline shift in rat astrocytes triggered by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurophysiol.* 79, 695-703
8. Anan, T.; Nagata, Y.; Koga, H.; Honda, Y.; Yabuki, N.; Miyamoto, C.; Kuwano, A.; Matsuda, I.; Endo, F.; Saya, H.; Nakao, M. (1998). Human ubiquitin-protein ligase Nedd4: expression, subcellular localization and selective interaction with ubiquitin-conjugating enzymes. *Genes to Cells* 3, 751-763
9. Behar, K.L.; Rothman, D.L. (2001). In vivo nuclear magnetic resonance studies of glutamate-γ-aminobutyric acid-glutamine cycling in rodent and human cortex: the central role of glutamine. *J. Nutr.* 131, 2498S-2504S
10. Bell, L. M.; Leong, M. L. L.; Kim, B.; Wang, E.; Park, J.; Hemmings, B. A.; Firestone, G. L. (2000).

Hyperosmotic stress stimulates promoter activity and regulates cellular utilization of the serum and glucocorticoid-inducible protein kinase (sgk) by a p38 MAPK –dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 275(33), 25262-272

11. Benito, M.; Valverde, A.M.; Lorenzo, M. (1996). IGF-1: a mitogen also involved in differentiation processes in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28(5), 499-510, Review
12. Bezanilla, F.; Vergara, J.; Taylor, R.E. (1982). Voltage clamping of excitable membranes. In Ehrenstein G, Lecar H (eds): *Methods of Experimental Physics*. New York: Academic Press, vol 20, pp445-511
13. Bode, B. P.; Kilberg, M.S. (1991). Amino acid-dependent increase in hepatic system N activity is linked to cell swelling. *J. Biol. Chem.* 266, 7376-7381
14. Bode, B.P. (2001). Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. *J. Nutr.* 131, 2475S-2485S
15. Bode, B.P.; Fuchs, B.C.; Hurley, B.P.; Conroy, J.L.; Suetterlin, J.E.; Tanabe, K.K.; Rhoads, D.B.; Abcouwer, S.F.; Souba, W.W. (2002). Molecular and functional analysis of glutamine uptake in human hepatoma and liver-derived cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283(5), G1062-73
16. Böhmer, C.; Wagner, C. A.; Beck, S.; Moschen, I.; Melzig, J.; Werner, A.; Lin, J. T.; Lang, F.; Wehner, F. (2000). The shrinkage-activated Na^+ conductance of rat hepatocytes and its possible correlation to rENaC. *Cell Physiol. Biochem.* 10, 187-194
17. Böhmer, C.; Okur, F.; Setiawan, I.; Broeer, S.; Lang, F. (2003). Properties and regulation of glutamine transporter SN1 by protein kinases SGK and PKB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306(1), 156-62
18. Boulland, J.-L.; Osen, K.K.; Levy, L.M.; Danbolt, N.C.; Edwards, R.H.; Storm-Mathisen, J.; Chaudry, F.A. (2002). Cell-specific expression of the glutamine transporter SN1 suggests differences in dependence on the glutamine cycle. *Europ. J. Neurosc.* 15, 1615-31
19. Broeer, S.; Brookes, N. (2001). Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J. Neurochem.* 77, 705-719
20. Broeer, A.; Albers, A.; Setiawan, I.; Edwards, R.H.; Chaudry, F.A.; Lang, F.; Wagner, C.A.; Broeer, S. (2002 a).

- Regulation of the glutamine transporter SN1 by extracellular pH and intracellular sodium ions. *J. Physiol.* 539, 3-14
21. Broeer, S.; Wagner, C.A. (2002 b).
Structure-function relationships of heterodimeric amino acid transporters. *Cell Biochem. Biophys.* 36, 155-168
22. Brookes, N. (1992).
Effect of intracellular glutamine on the uptake of large neutral amino acids in astrocytes concentrative Na⁺-independent transport exhibits metastability. *J. Neurochem.* 59, 227-235
23. Brookes, N. (2000).
Functional integration of the transport of ammonium, glutamate and glutamine in astrocytes. *Neurochem. Int.* 37, 121-129
24. Brosnan, J.T. (2003).
Interorgan amino acid transport and its regulation. *J. Nutr.* 133(6), 2068S-2072S Review
25. Busch, A.E.; Lang, F. (1993).
Time dependent changes in biophysical properties of minK channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197(2), 473-7
26. Busch, A.E.; Waldegger, S.; Murer, H.; Lang, F. (1996).
The molecules of proximal tubular transport – insights from electrophysiology. *Nephron* 72, 1-8
27. Bussolati, O.; Sala, R.; Astorri, A.; Rotoli, B.M.; Dall'Asta, V.; Gazzola, G.C. (1993).
Characterization of amino acid transport in human endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 265, C1006-C1014
28. Calvert, D.T.; Kim, T.G.; Choung, J.J.; Burns, C.; Shennan, D.B. (1998).
Characteristics of L-glutamine transport by lactating mammary tissue. *J. Dairy Res.* 65, 199-208
29. Chaudhry, F.A.; Reimer, R.J.; Krizaj, D.; Barber, D.; Storm-Mathisen, J.; Copenhagen, D.R.; Edwards, R.H. (1999).
Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell* 99, 769-780
30. Chaudry, F.A.; Krizaj, D.; Larsson, P.; Reimer, R.J.; Wreden, C.; Storm-Mathisen, J.; Copenhagen, D.; Kavanaugh, M.; Edwards, R.H. (2001).
Coupled and uncoupled proton movement by amino acid transport system N. *EMBO J.* 20, 7041-7051

31. Chaudry, F.A.; Reimer, R.J.; Edwards, R.H. (2002 a).
The glutamine commute: take the N line and transfer to the A. *J. Cell Biol.* 157, 349-355
32. Chaudry, F.A.; Schmitz, D.; Reimer, R.J.; Larsson, P.; Gray, A.T.; Nicoll, R.; Kavanaugh, M.; Edwards, R.H. (2002 b).
Glutamine uptake by neurons: interaction of protons with system A transporters. *J. Neurosci.* 22, 62-72
33. Chen, S.Y.; Bhargava, A.; Mastrobeardino, L.; Meijer, O.C.; Wang, J.; Buse, P.; Firestone, G.L.; Verrey, F.; Pearce, D. (1999).
Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96, 2514-2519
34. Christensen, H.N.; Oxender, D.L.; Liang, M.; Vatz, K.A. (1965).
The use of *N*-methylation to direct the route of mediated transport of amino acids. *J.Biol.Chem.* 240, 3609-3616
35. Christensen, H.N. (1990).
Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol. Rev.* 70, 43-77
36. Cockerham, M.B.; Weinberger, B.B.; Lerchie, S.B. (2000).
Oral glutamine for the prevention of oral mucositis associated with high dose paclitaxel and melphalan for autologous bone marrow transplantation. *Ann. Pharmacother.* 34(3), 300-3
37. Coffey, P.J.; Jin, J.; Woodgett, J.R. (1998).
Protein kinase B (β -Actin): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem. J.* 335, 1-13
38. von der Crone, S.; Deppe, C.; Barthel, A.; Sasson, S.; Joost, H. G.; Schurmann, A. (2000).
Glucose deprivation induces Akt-dependent synthesis and incorporation of GLUT1, but not of GLUT4, into the plasma membrane of 3T3-L1 adipocytes. *Eur. J. Cell Biol.* 79, 943-949
39. Cynober, L.A. (2002).
Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. *Nutrition* 18(9), 761-6
40. Dall'Asta, V.; Rossi, P.A.; Bussolati, O.; Guidotti, G.G.; Gazzola, G.C. (1990).
The transport of L-glutamine into cultured human fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1052, 106-112
41. Dascal, N. (1987).

- The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC crit. Rev. Biochem.* 22(4), 317-387
42. Datta, S.R.; Dudek, H.; Tao, X.; Masters S.; Fu, H.; Gotoh, Y.; Greenberg, M.E. (1997).
Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241
43. Debonneville, C.; Flores, S.Y.; Kamynina, E.; Plant, P.J.; Tauxe, C.; Thomas, M. A.; Münster, C.; Chraïbi, A.; Pratt, J. H.; Horisberger, J.-D.; Pearce, D.; Loffing, J.; Staub, O. (2001).
Phosphorylation of Nedd4-2 by sgk1 regulates epithelial Na⁺ channel cell surface expression. *The EMBO J.* 20(24), 7052-7059
44. DeMarco, V.; Dyess, K.; Strauss, D.; West, C.P.; Neu, J. (1999).
Inhibition of Glutamine synthetase decreases proliferation of cultured rat intestinal epithelial cells. *J. Nutr.* 129, 57-62
45. De-Souza, H.M.; Borba, Murad, G.R.; Ceddia, R.B.; Curi, R.; Verdane-ga-Peicher, M.; Bazotte, R.B. (2001).
Rat liver responsiveness to gluconeogenic substrates during insulin-induced hypoglycemia. *J. Med. Biol. Res.* 34, 771-777
46. Deves, R.; Chavez, P.; Boyd, C.A.
Identification of a new transport system (y⁺L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *J. Physiol.* 454, 491-501
47. Dietzel, I.D.; Bruns, D.; Polder, H.-R.; Lux, H.D. (1992).
Voltage clamp recording, 256-262
In: Gratyn, R.; Kettenmann, H. (eds.): Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology. 1st ed., New York
48. Doyle, F.A.; McGiven, J.D. (1992).
The bovine renal epithelial cell line NBL-1 expresses a broad specificity Na⁺-dependent neutral amino acid transport system (System B⁰) similar to that in bovine renal brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1140, 55-62
49. Dudek, H.; Datta, S.R.; Franke, T.F.; Brinbaum, M.; Yao, R; Cooper, G.M; Segal, R.A.; Kaplan, D.R.; Greenberg M.E. (1997).
Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275, 661-665
50. Dumont, J.N. (1972).
Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136, 153-179

51. Easson, A.M.; Pawlik, T.M.; Fischer, C.P.; Conroy, J.L.; Sgroi, D.; Souba, W.W.; Bode, B.P. (2000).
Tumor-influenced amino acid transport activities in zonal-enriched hepatocyte populations. *Am. J. Physiol.* 279, G1209-G1218
52. Fantana, G.; Taccola, G.; Galante, J.; Salis, S.; Raiteri, M. (2001).
AMPA-evoked acetylcholine release from cultured spinal chord motoneurons and its inhibition by GABA and glycine. *Neuroscience* 106, 183-191
53. Fei, Y.J.; Sugawara, M.; Nakanishi, T.; Huang, W.; Wang, H.; Prasad, P.D.; Leibach, F.H.; Ganapathy, V. (2000).
Primary structure, genomic organization, and functional and electrogenic characteristics of human system N 1, a Na⁺- and H⁺-coupled glutamine transporter. *J. Biol. Chem.* 275(31), 23707-17
54. Felipo, V.; Butterworth, R.F. (2002).
Neurobiology of ammonia. *Prog. Neurobiol.* 67(4), 259-79
55. Fillon, S.; Klingel, K.; Wärntges, S.; Sauter, M.; Gabrysch, S.; Pestel, S.; Tanneur, V.; Waldegger, S.; Zipfel, A.; Viebahn, R.; Häussinger, D.; Bröer, S.; Kandolf, R.; Lang, F. (2002).
Expression of the serine/threonine kinase hSGK1 in chronic viral hepatitis. *Cell. Physiol. Biochem.* 12, 47-54
56. Finkel, A.S.; Gage, P.W. (1985).
Conventional voltage clamping with two intracellular microelectrodes. In Smith TGJr, Lecar H, Redman SJ, Gage PW (eds): "Voltage and Patch Clamping With Microelectrodes." Bethesda, MD: American Physiological Society, pp47-94
57. Flaring, U.B.; Rooyackers, O.E.; Wernerman, J.; Hammarqvist, F. (2003).
Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle. *Clin. Sci. (Lond)* 104(3), 275-82
58. Friedrich, B.; Feng, Y.; Cohen, P.; Risler, T.; Vandewalle, A.; Broer, S.; Wang, J.; Pearce, D.; Lang, F. (2003).
The serin/threonine kinase SGK2 and SGK3 are potent stimulators of the epithelial Na⁺ channel alpha, beta, gamma-ENaC. *Pflugers Arch.* 445, 693-696
59. Fürst, P. (2001).
New developments in glutamine delivery. *J. Nutr.* 131, 2562S-2568S
60. Gamper, N.; Fillon, S.; Feng, Y.; Friedrich, B.; Lang, P.A.; Henke, G.; Huber, S.M.; Kobayashi, T.; Cohen, P.; Lang, F. (2002 a).
K⁺ channel activation by all three isoforms of serum- and glucocorticoid-dependent protein kinase SGK. *Eur. J. Physiol.* 445, 60-66

61. Gamper, N.; Fillon, S.; Huber, S.M.; Feng, Y.; Kobayashi, T.; Cohen, P.; Lang, F. (2002 b).
IGF-1 up-regulates K⁺ channels via PI3-kinase , PDK1 and SGK1. *Pflugers Arch.* 443, 625-634
62. Gazzola, G.C.; Dall'Asta, V.; Franchi-Gazzola, R.; White, M.F. (1981).
The cluster tray method for rapid measurement of solute fluxes in adherent cultured cells. *Anal. Biochem.* 115, 368-374
63. Gebhardt, R.; Mecke, D. (1983).
Heterogeneous distribution of glutamine synthetase among rat liver parenchymal cells *in situ* and in primary culture. *EMBO J.* 2, 567-570
64. Gebhardt, R.; Kleemann, E. (1987).
Hormonal regulation of amino acid transport system N in primary cultures of rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 166, 339-344
65. Gras, G.; Chretien, F.; Vallat-Decouvelaere, A.V.; Le Pavec, G.; Porcheray, F.; Bossuet, C.; Leone, C.; Mialocq, P.; Dereuddre-Bosquet, N.; Clayette, P.; Le Grand, R.; Creminon, C.; Dormont, D.; Rimaniol, A.C.; Gray, F. (2003).
Regulated expression of sodium-dependent glutamate transporters and synthetase: a neuroprotective role for activated microglia and macrophages in HIV infection? *Brain Pathol.* 13, 211-22
66. Gu, S.; Roderick, H.L.; Camacho, P.; Jiang, J.X. (2000).
Identification and characterization of an amino acid transporter expressed differentially in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97, 3230-3235
67. Gurdon, J.B.; Lane, C.D.; Woodland, H.R.; Marbaix, G. (1971).
Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233, 177-182
68. Gurdon, J.B.; Wickens, M.P. (1983).
The use of *Xenopus* oocytes for the expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 101, 370-386
69. Harvey, K.F.; Kumar, S. (1999).
Nedd4-like proteins: an emerging family of ubiquitin-protein ligases implicated in diverse cellular functions. *Trends in Cell Biol.* 9, 166-169
70. Häussinger, D. (1986).
Regulation of hepatic ammonia metabolism: the intercellular cycle. *Adv. Enzym Reg.* 25, 159-180
71. Häussinger, D. (1998).

- Hepatic glutamine transport and metabolism. *Adv. Enzym. Relat. Areas Mol. Biol.* 72, 43-86
72. Häussinger, D.; Graf, D.; Weiergräber, O.H. (2001).
Glutamine and cell signalling in liver. *J. Nutr.* 131, 2509S-2514S
73. Hall, J.C.; Heel, K.; McCauley, R. (1996).
Glutamine. *Br. J. Surg.* 83, 305-312
74. Halliwell, J.V.; Plant, T.D.; Standen, N.B. (1987).
Voltage clamp techniques. In Standen NB, Gray PTA, Whitaker MJ (eds):
"Microelectrode Techniques." Cambridge, England: The Company of
Biologists, pp 13-28
75. Hediger, M.A.; Welbourne, T.C. (1999).
Introduction: Glutamate transport, metabolism, and physiological
responses. *Am. J. Physiol.*, 277(4Pt2), F477-F480
76. Hill, M.M.; Clark, S.F.; Tucker, D.F.; Birnbaum, M.J.; James, D.E.;
Macaulay, S.L. (1999).
A role for protein kinase Bbeta/Akt2 in insulin-stimulated GLUT4
translocation in adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7771-7781
77. Hille, B. (2001).
Ionic channels of excitable membranes. 2nd ed., Sinauer Associates Inc.
(Sunderland Massachusetts), 722pp
78. Hodgkin, A.L.; Huxley, A.F. (1952).
A quantitative description of membrane current and its application to
conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117, 500-544
79. Hundal, H.S.; Rennie, M.J.; Watt, P.W. (1987).
Characteristics of L -glutamine transport in perfused rat skeletal muscle. *J.
Physiol.* 393, 283-305
80. Huxley, A.F. (2002).
Hodgkin and the action potential 1935-1952. *J. Physiol.* 538.1, p.2
81. Jamshidi, M.B.; Kaye, P.L. (1995).
Glutamine transport by mouse inner cell masses. *J. Reprod. Fertil.* 104,
91-97
82. Jungermann, K.; Katz, N. (1989).
Functional specialization of different hepatocyte populations. *Phys. Rev.*
69, 708-764
83. Kalebic, T.; Kinter, A.; Pos, G. et al. (1991).

- Suppression of immunodeficiency virus expression in chronically infected monocyte cells by glutathione, glutathione ester, and N-acetylcysteine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 986-990
84. Kamynina, E.; Staub, O. (2002). Concerted action of EnaC, Nedd4-2, and SGK1 in transepithelial Na⁺ transport. *Am. J. Physiol.* 283, F377-F387
85. Karinch, A.M.; Lin, C.-M.; Wolfgang, C.L.; Pan, M.; Souba, W.W. (2002). Regulation of expression of the SN1 transporter during renal adaptation to chronic metabolic acidosis in rats. *Am. J. Physiol.* 283, F1011-F1019
86. Kilberg, M. S.; Handlogten, M. E.; Christensen, H. N. (1980). Characteristics of an amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparagine, histidine, and closely related analogs. *J. Biol. Chem.* 255, 4011-4019
87. King, P. A. (1994). Effects of insulin and exercise on amino acid transport in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 266, C524-C530
88. Kobayashi, T.; Cohen, P. (1999 a). Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem. J.* 339 (Pt2), 319-328
89. Kobayashi, T.; Deak, M.; Morrice, N.; Cohen, P. (1999 b). Charakterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochem. J.* 344, 189-197
90. Kristiansen, S.; Nielsen, J.N.; Bourgoin, S.; Klip, A.; Franco, M.; Richter, E.A. (2001). GLUT4 translocation in skeletal muscle studied with a cell-free assay: involvement of phospholipase D. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281, E608-E618
91. Kumar, S.; Tamooka, Y.; and Noda M. (1992). Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185, 1155-1161
92. Lang, F.; Busch, G.L.; Voelkl, H. (1998 a). The diversity of volume regulatory mechanisms. *Cell Physiol. Biochem.* 8, 1-45

93. Lang, F.; Busch, G.L.; Ritter, M.; Voelkl, H.; Waldegger, S.; Gulbins, E.; Häussinger, D. (1998 b).
Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 78, 247-306
94. Lang, F.; Klingel, K.; Wagner, C.A.; Stegen, C.; Warntges, S.; Friedrich, B.; Lanzendorfer, M.; Melzig, J.; Moschen, I.; Steuer, S.; Waldegger, S.; Sauter, M.; Paulmichl, M.; Gerke, V.; Risler, T.; Gamba, G.; Capasso, G.; Kandolf, R.; Herbert, S.C.; Massry, S.G.; Broer S. (2000).
Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8157-8162
95. Lang, F.; Cohen, P. (2001).
The regulation and physiological roles of serum and glucocorticoid-induced protein kinase. *Science's stke* 2001 RE17
96. Lavoine, A; Meisse, D.; Quillard, M.; Husson, A.; Renouf, S.; Yassad, A. (1998).
Glutamine and regulation of gene expression in rat hepatocytes: the role of cell swelling. *Biochimie* 80(10), 807-11
97. Lewis, A.M.; Kaye, P.L. (1992).
Characterization of glutamine uptake in mouse two-cell embryos and blastocysts. *J. Reprod. Fertil.* 95, 221-229
98. Löffler, G.; Petrides, P.E. (Auflage7).
Biochemie und Pathobiochemie. *Springer Verlag*
99. Low, S.Y.; Taylor, P.M.; Ahmed, A.; Pogson, C.I.; Rennie, M.J. (1991).
Substrate-specificity of glutamine transporters in membrane vesicles from rat liver and skeletal muscle investigated using amino acid analogues. *Biochem. J.* 278, 105-111
100. Low, S. Y.; Taylor, P.M.; Rennie, M.J. (1996).
Responses of glutamine transport in cultured rat skeletal muscle to osmotically induced changes in cell volume. *J. Physiol.* 492 (Pt3), 877-885
101. Low, S.Y.; Rennie, M.J.; Taylor, P.M. (1997).
Signaling elements involved in amino acid transport responses to altered muscle cell volume. *FASEB J.* 11(13), 1111-7
102. Mackenzie, B.; Erickson, J.D. (2003).
Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflügers Arch.* [Epub ahead of print]
103. McIntire, S.L.; Reimer, R.J.; Schuske, K.; Edwards, R.H.; Jorgensen, E.M. (1997).

Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* (Lond.) 389, 870-876

104. Müller, C.M. (1992).
Intracellular microelectrodes. 183-188
In: Gratyn, R.; Kettenmann, H. (eds.): Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology. 1st ed., New York
105. Murray, S.M.; Pindoria, S. (2002).
Nutrition support for bone marrow transplant patients. *Cochrane Database Syst. Review* (2), CD002920
106. Náray-Fejes-Tóth, A.; Canessa, C.; Cleaveland, E.S.; Aldrich, G.; Fejes-Tóth, G. (1999).
Sgk1 is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial Na⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 274, 16973-16978
107. Neu, J.; Shenoy, V.; Chakrabarti, R. (1996).
Glutamine nutrition and metabolism: Where do we go from here? *Faseb J.* 10, 829-837
108. Newsholme, P.; Lima, M.M.R.; Procopio, J.; Pithon-Curi, T.C.; Doi, S.Q.; Bazotte, R.B. (2003).
Glutamine and Glutamate as vital metabolites. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36(2), 153-163
109. O'Connor, C.M. and Smith, D.L. (1979).
Inhibition of oocyte maturation by theophylline: Possible mechanism of action. *Development Biology* 52, 318-322
110. Oeler, R.; Roth, E. (2003).
Regulative Capacity of glutamine. *Curr. Opin. Nutr. Metab. Care* 6(3), 277-82
111. Ohlemeyer, C.; Meyer, J.W. (1992).
The Faraday cage and grounding arrangements. 3-5
In: Gratyn, R.; Kettenmann, H. (eds.): Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology. 1st ed., New York
112. O'Sullivan, D.; Brosnan, J.T.; Brosnan, M.E. (1998).
Hepatic zonation of the catabolism of arginine and ornithine in the perfused liver. *Biochem. J.* 330, 627-632
113. Park, J.; Leong, M.L.; Buse, P.; Maiyar, A.C.; Firestone, G.L.; Hemmings, B.A. (1999).

Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the Pi 3-kinase-stimulated signalling pathway. *EMBO J.* 18, 3024-3033

114. Piva, T.J.; McCabe, M.G.; McEvoy-Bowe, E. (1992).
The kinetics of glutamine transport in bovine lymphocytes. *Biochem. Int.* 26, 309-316
115. Plant, P.J.; Yeager, H.; Staub, O.; Howard, P.; Rotin, D. (1997).
The C2-Domain of the ubiquitin protein ligase Nedd4 mediates Ca²⁺ dependent plasma membrane localization. *J. Biol. Chem.* 272(51), 32329-32336
116. Raol, Y.H.; Lynch, D.R.; Brooks-Kayal, A.R. (2001).
Role of excitatory amino acids in developmental epilepsies. *Mental Retardation and Developmental Disabilities research Reviews* 7, 254-260
117. Reeds, P.J.; Burrin, D.G. (2001).
Glutamine and the bowel. *J. Nutr.* 131, 2505S-2508S
118. Reimer, R.J.; Chaudry, F.A.; Gray, A.T.; Edwards, R.H. (2000).
Amino acid transport system A resembles system N in sequence but differs in mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(14), 7715-20
119. Rennie, M.J.; Hundal, H.S.; Babij, P.; Mac Lennan, P.; Taylor, P.M.; Watt, P.W.; Jepson, M.M.; Millward, D.J. (1986).
Characteristics of a glutamine carrier in skeletal muscle have important consequences for nitrogen loss in injury, infection, and chronic disease. *Lancet* 2, 1008-1012
120. Ritchie, J.W.A.; Baird, F.E.; Christie, G.R.; Stewart, A.; Low, S.Y.; Hundal, H.S.; Taylor, P.M. (2001).
Mechanisms of glutamine transport in rat adipocytes and acute regulation by cell swelling. *Cell Physiol. Biochem.* 11, 259-270
121. Rothmann, D.L.; Sibson, N.R.; Hyder, F.; Shen, J.; Behar, K.L.; Shulman, R.G. (1999).
In vivo nuclear magnetic resonance spectroscopy studies on the relationship between the glutamate-glutamine neurotransmitter cycle and functional neuroenergetics. *Phil. Trans. Roy. Soc. London. B, Biol. Sci.* 354, 1165-77
122. Rumberger, J.M.; Wu, T.; Hering, M.A.; Marshall, S. (2003).
Regulation of lipogenic enzyme mRNA levels by the hexosamine biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* 278(31), 28547-52
123. Sacks, G.S. (1999).
Glutamine supplementation in catabolic patients. *Ann. Pharmacother.* 33(3), 348-54

124. Saltiel, A.R.; Pessin, J.E. (2002).
Insulin signalling pathways in time and space. *Trends Cell Biol.* 12, 65-71
125. Sanderson, I.R.; He, Y. (1994).
Nucleotide uptake and metabolism by intestinal epithelial cells. *J. Nutr.* 124(1), 131S-137S
126. Savy, G.K. (2002).
Glutamine supplementation. Heal the gut, help the patient. *J. Infus. Nurs.* 25(1), 65-9
127. Schmidt, R.F.; Thews, G.; Lang, F. (28. Auflage)
Physiologie des Menschen. *Springer Verlag*, Berlin 2000
128. Segel, Irwin H. (1976).
Biochemical calculations. How to solve mathematical problems in general biochemistry. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore
129. Shigaev, A.; Asher, C.; Latter, H.; Garty, H.; Reuveny, E. (2000).
Regulation of sgk by aldosterone and its effects on the epithelial Na⁺ channel. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 278, F613-F619
130. Shulman, R.G.; Rothmann, D.L. (1998).
Interpreting functional imaging studies in terms of neurotransmitter cycling. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A* 95, 11993-8
131. Sigel, E. (1990).
Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *J. Membr. Biol.* 117, 201-221
132. Singh, R.; Gopalan, S.; Sibal, A. (2002).
Immunonutrition. *Indian J. Pediatr.* 69(5), 417-9
133. Snyder, P.M.; Olson, D.R.; Thomas, B.C. (2002).
Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 277, 5-8
134. Soreq, H. (1985).
The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA-microinjected *Xenopus* oocytes. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 18(3), 199-238
135. Souba, W.W.; Pan, M.; Stevens, B.R. (1992).
Kinetics of the sodium-dependent glutamine transporter in human intestinal cell confluent monolayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188, 746-753
136. Stühmer, W.; Terlau, H.; Heinemann, S.H. (1992).

- Xenopus oocytes for two-electrode and patch clamp recording. 121-125
In: Gratyn, R.; Kettenmann, H. (eds.): Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology. 1st ed., New York
137. Suarez, I.; Bodega, G.; Fernandez, B. (2002).
Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. *Neurochem. Int.* 41(2-3), 123-42
138. Swandulla, D. and Chow, R.H. (1992).
Recording solutions for isolating specific ionic channel current. 164-168
In: Gratyn, R.; Kettenmann, H. (eds.): Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology. 1st ed., New York
139. Tadros, L. B.; Taylor, P. M.; Rennie, M. J. (1993).
Characteristics of glutamine transport in primary tissue culture of rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 265, E135-E144
140. Tamarappoo, B. K.; Nam, M.; Kilberg, M. S.; Welbourne, T.C. (1993).
Glucocorticoid regulation of splanchnic glutamine, alanine, glutamate, ammonia, and glutathione fluxes. *Am. J. Physiol.* 264, E526-E533
141. Tamarappoo, B.K.; Raizada, M.K.; Kilberg, M.S. (1997).
Identification of a system N-like Na⁺-dependent glutamine transport activity in rat brain neurons. *J. Neurochem.* 68, 954-960
142. Tarnuzzer, R.W.; Campa, M.J.; Qian, N.X.; Englesberg, E.; Kilberg, M.S. (1990).
Expression of the mammalian system A neutral amino acid transporter in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 265(23), 13914-17
143. Taylor, P.M.; Egan, C.J.; Rennie, M.J. (1989).
Transport of glutamine across blood-facing membranes of perfused rat jejunum. *Am. J. Physiol.* 256, E550-E558
144. Taylor, P.M.; Mackenzie, B.; Low, S.Y.; Rennie, M.J. (1992).
Expression of rat liver glutamine transporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 267(6), 3873-77
145. Taylor, P.M.; Kaur, S.; Mackenzie, B.; Peter, G.J. (1996).
Amino-acid-dependent modulation of amino acid transport in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Exp. Biol.* 199(Pt4), 923-31
146. Usui, S. (1998).
[Progress of enteral nutrition]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 99(3), 154-8
147. Verrey, F.; Jack, D.L.; Paulsen, I.T.; Saier, M.H., Jr. & Pfeiffer, R. (1999).

- New glycoprotein-associated amino acid transporters. *J. Membr. Biol.* 172, 181-192
148. Wagner, C.A.; Friedrich, B.; Setiawan, I.; Lang, F.; Bröer, S. (2000 a).
The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell. Physiol. Bioch.* 10, 1-12
149. Wagner, C.A.; Bröer, A.; Albers, A.; Gamper, N.; Lang, F.; Bröer, S. (2000 b).
The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/LAT1 is associated in *Xenopus* oocytes with a non-selective cation channel that is regulated by the serine/threonine kinase sgk1. *J. Physiol.* 526, 35-46
150. Waldegger, S.; Barth, P.; Raber, G.; Lang, F. (1997).
Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic alterations of cell volume. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94, 4440-4445
151. Waldegger, S.; Barth, P.; Forrest Jr, J.N.; Greger, R.; Lang, F. (1998).
Cloning of sgk serine–threonine protein kinase from shark rectal gland – a gene induced by hypertonicity and secretagogues. *Pflügers Arch.* 436, 575-580
152. Waldegger, S.; Gabrysch, S.; Barth, P.; Fillon, S.; Lang, F. (2000).
h–sgk serine–threonine protein kinase as transcriptional target of p38/MAP kinase pathway in HepG2 Human Hepatoma Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 10, 203-208
153. Warntges, S.; Friedrich, B.; Henke, G.; Duranton, C.; Lang, PA.; Waldegger, S.; Meyermann, R.; Kuhl, D.; Speckmann, E.J.; Obermuller, N.; Witzgall, R.; Mack, A.F.; Wagner, H.J.; Wagner, A.; Broer, S.; Lang, F. (2002).
Cerebral localization and regulation of the cell volume-sensitive serum- and glucocorticoid-dependent kinase SGK1. *Pflugers Arch.* 443, 617-624
154. Wasa, M.; Bode, B. P.; Souba, W. W. (1996).
Adaptive regulation of amino acid transport in nutrient–deprived human hepatomas. *Am. J. Surg.* 171, 163-169
155. Wasa, M.; Wang, H. S.; Tazuke, Y.; Okada, A. (2001).
Insulin-like growth factor–I stimulates amino acid transport in a glutamine –deprived human neuroblastoma cell line. *Biochim. Biophys. Acta* 1525, 118-124
156. Webster, M. K.; Goya, L.; Ge, Y.; Maiyar, A. C.; Firestone, G. L. (1993).

Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol. Cell Biol.* 13, 2031-2040

157. Wehner, F.; Böhmer, C.; Heinzinger, H.; van den Boom, F.; Tinel, H. (2000).
The hypertonicity-induced Na^+ conductance of rat hepatocytes: physiological significans and molecular correlate. *Cell Physiol. Biochem.* 10, 335-340
158. Welbourne, T.C. (1995).
Increased plasma bicarbonate and growth hormone after an oral glutamine load. *Am. J. Dis. Child.* 61, 1058-1061
159. Wilde, S.W.; Kilberg, M.S. (1991).
Glutamine transport by basolateral plasma-membrane vesicles prepared from rabbit intestine. *Biochem. J.* 277, 687-91
160. Van Winkle, L.J.; Campione, A.L.; Gorman, J.M. (1988).
 Na^+ -independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates. *J. Biol. Chem.* 263, 3150-3163
161. Young, R.Y.; Ajami, A.M. (2001).
Glutamine: The Emperor or his clothes? *J. Nutr.* 131, 2449S-2459S
162. Ziegler, T.R. (2001).
Glutamine supplementation in cancer patients receiving bone marrow transplantation and high dose chemotherapy. *J. Nutr.* 131 (9 Suppl), 2578S-84S discussion 2590S

7. Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Florian Lang bedanken für die Überlassung des Themas, seine Anleitung und für seine außerordentliche Fähigkeit das Team für die Wissenschaft zu begeistern. Er stand mir stets bei allen Fragen zur Seite. Für sein entgegengebrachtes Vertrauen möchte ich mich ausdrücklich von Herzen bedanken.

Meinen Betreuern Iwan Setiawan und Christoph Böhmer danke ich vielmals für die Unterstützung und Hilfestellungen in wissenschaftlichen und technischen Angelegenheiten, bei der Arbeit am Computer und für die Einführung in die radioaktive Uptake-Messung an *Xenopus* Oozyten.

Herzlichen Dank an Christoph Böhmer für die ständige Begleitung bei der Fertigung dieser Arbeit, für die Hilfe beim Korrekturlesen als auch sonst für sein Verständnis und seine Hilfsbereitschaft.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Birgitta Noll, die mich in die Elektrophysiologie und in die Handhabung der Oozyten einlernte. Zudem danke ich ihr für die Synthese der RNA.

Vielen Dank auch an die Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Physiologischen Institutes für die angenehme und freundliche Atmosphäre.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Kemal und Beyhan Mutlu, bei meinen Geschwistern Yavuz Selim, Fatima, Tuba und Semih Mutlu, vor allem bei meiner Schwester Emine Coskun und besonders herzlich bei meinem Ehemann Isa Okur bedanken, die mich in jeder Hinsicht, in der man einen Studenten helfen kann, unterstützten und mich immer wieder aufs Neue ermutigten.

8. Lebenslauf

8. September 1977	Geboren in Calw. Eltern: Kemal Mutlu und Beyhan Mutlu, geb. Yilmaz
09/1989 – 07/1994	Realschule Althengstett, Mittlere Reife
09/1994 – 06/1997	Technisches Gymnasium Calw, Abitur
07/1997 – 05/1998	Osswald Nussbaum Presse- und Wirtschaftsverlag, Weil der Stadt
06/1998 – 10/1998	University of Tampa, American Language Academy, Florida
10/1998 – 04/1999	Datenverarbeitungsakademie, Technische Informatik, Böblingen
04/1999 – 05/2005	Studium der Medizin an der Eberhard- Karls- Universität Tübingen
03/2001	Ärztliche Vorprüfung in Tübingen
04/2001 – 10/2003	Arbeit am Physiologischen Institut I der Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. Lang
03/2002	Erster Teil der Ärztlichen Prüfung
03/2004	Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung
04/2004 – 04/2005	Praktisches Jahr im Städtischen Krankenhaus Sindelfingen, Wahlfach Neurologie
31. Mai 2005	Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung