

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen

Abteilung Physiologie I

Direktor: Professor Dr. F. Lang

**Regulation des Aminosäuretransporters ASCT2
durch die Serum- und Glukokortikoid- abhängigen
Kinasen SGK und die Proteinkinase B**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

Vorgelegt von:
Andreas Speil
aus Karlsruhe

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. B. Nürnberg

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Die zelluläre Homöostase und der Transport von Stoffen und Ionen über biologische Membranen	3
1.2	Einteilung der Transporter und Kanäle	5
1.2.1	Die SLC (solute carrier)- Reihe	7
1.2.2	Andere Transportergruppen / Nicht SLC- Transporter	8
1.3	Die SLC 1- Familie	9
1.4	Der hASCT2	12
1.4.1	Expression des hASCT2	13
1.4.2	Funktionelle Eigenschaften des hASCT2	15
1.4.3	Struktur der SLC1- Transporter	20
1.4.4	Regulation der Aktivität des hASCT2	21
1.5	Regulationsmechanismen der Enzymaktivität als Grundlage	

der Regulation der Aktivität von Membrantransportern	24
1.5.1 Allosterische Regulation	24
1.5.2 Kofaktoren	25
1.5.3 Proteolytische Spaltung	25
1.5.4 Regulation der Enzymaktivität mittels Proteinphosphorylierung durch Proteinkinasen	26
1.6 Die Serum- und Glukokortikoid - abhängigen Kinasen (SGK)	28
1.6.1 Eingruppierung, Isoformen und Expression in verschiedenen Geweben	29
1.6.2 Translationale Regulation der SGK	30
1.6.3 Posttranslationale Regulation / reversible Phosphorylierung der SGK	31
1.7 Regulation durch Ubiquitin induzierte Degradation	33
1.8 Wirkungsmechanismen und Interaktion mit anderen Proteinen	35
1.9 Klinische Relevanz	36
1.9.1 Der hASCT2 als retroviraler Rezeptor	36
1.9.2 Der hASCT2 als Zielstruktur von Legionella Pneumophila	36
1.9.3 Der Aminosäuretransporter hASCT2 im Tumormetabolom	37
1.10 Fragestellung und Hypothese der Arbeit	39
2 Material und Methoden	41
2.1 Lösungen und Substanzen	41
2.1.1 OR-2	41
2.1.2 ND 96 mit Antibiotika	41
2.1.3 Lösungen für die Messungen	42
2.2 Oozyten des afrikanischen Klauenfrosches als heterologes Expressionssystem	43
2.3 Oozytenpräparation	43
2.4 cRNA-Injektion	45
2.5 cRNA-Synthese	46
2.6 Mutagenese	47
2.7 Funktionelle Messungen	48
2.7.1 Uptake / „Tracer flux“ - Messungen	48
2.7.2 Quantifizierung der Oberflächenexpression durch Chemolumineszenz	50
2.8 Chemikaliennachweis	52
2.9 Auswertung und Statistik	52
2.10 Verzeichnis der Abkürzungen	52
3 Versuche und Ergebnisse	54
3.1 Die Aufnahme von L-[14C] Serin wird durch hASCT2 vermittelt	55
3.2 Der durch hASCT2 vermittelte Transport ist Na ⁺ abhängig	55
3.3 Transportkinetik des hASCT2 in Abhängigkeit des Substratangebotes	58
3.4 Die Regulation der L-[14C]Serin-Aufnahme durch hASCT2 durch die SGK Isoformen 1-3 und PKB	59
3.5 Der Effekt von konstitutiv inaktiven SGK- und PKB-Mutanten auf	

die L- [14C] Serin Aufnahme	63
3.6 Kinetische Analyse der L- [14C] Serin Aufnahme durch hASCT2 bei Koexpression der konstitutiv aktiven Mutanten von SKG 1 und 3	65
3.7 Oberflächenexpression des hASCT2 bei Koexpression von aktiven Mutanten der SGK1 und SGK3	67
3.8 Die Ubiquitinligase Nedd4-2 bei der Regulation des hASCT2	69
4 Diskussion	71
4.1 Fehlerdiskussion	71
4.1.1 Oozyten	71
4.1.2 Lösungen	71
4.1.3 Geräte	72
4.2 Diskussion der Ergebnisse	73
5 Zusammenfassung	81
6 Literaturverzeichnis	84
7 Anhang	105
7.1 Danksagung	105

1 Einleitung

1.1 Die zelluläre Homöostase und der Transport von Stoffen und Ionen über biologische Membranen

Die Transporter und Kanäle in der Zellmembran sind für die Homöostase aller Zellen und Zellorganellen in einer Schlüsselposition, da sie die Aufnahme und den Ausstrom fast aller wichtigen Substanzen wie zum Beispiel Aminosäuren, Zucker, Nucleotiden, Ionen aber auch vieler Medikamente kontrollieren wodurch sie alle höheren Zellfunktionen erst ermöglichen.

Es wird vermutet, dass mindestens 5%, das heisst über 2000 der menschlichen Gene für Transporter kodieren, was die Wichtigkeit der Transporter für die zelluläre Homöostase widerspiegelt (Hediger et al., 2004).

Kanäle, also Kanalproteine in biologischen Membranen, erlauben den Transport von löslichen Substanzen über die Membran entlang ihres elektrochemischen Gradienten. (Armstrong, 2003; Chen, 2003; DeCoursey, 2003; Gunther et al., 2003)

Transporter können in passive und aktive Transporter unterteilt werden.

Passive Transporter („carrier“) ermöglichen die sogenannte erleichterte Diffusion, also den Transport von löslichen Substanzen durch Lipidmembranen entlang ihres elektrochemischen Gradienten.

Aktive Transporter können Stoffe unter Verwendung verschiedener energiegekoppelter Mechanismen auch gegen ihren elektrochemischen Gradienten transportieren und erzeugen dadurch selbst elektrochemische Gradienten von Ionen oder löslichen Stoffen. Die Energiebereitstellung erfolgt durch energiereiche Substrate wie beispielsweise ATP.

Die aktiven Transporter werden weiterhin in primär und sekundär aktive Transporter unterteilt, je nach dem, ob der Transport direkt an Energie liefernde Substrate (z.B. ATP Hydrolyse) gekoppelt ist.

Zu den primär aktiven, ATP abhängigen Transportern zählen ATP bindende ABC-Transporter (ATP-binding cassette) und Ionenpumpen (ATPasen).

ABC Transporter binden oder hydrolysieren ATP und nutzen die frei werdende Energie für den Transport einer Vielzahl von Substanzen wie Ionen, Kohlenhydraten, Lipiden und Medikamenten über Zellmembranen (Borst & Elferink, 2002).

Ionenpumpen hydrolysieren ATP um Ionen wie Na^+ , K^+ , H^+ , Ca^{2+} und Cu^{2+} über Membranen zu transportieren. Dadurch werden durch Ionenpumpen elektrochemische Ionengradienten über Membranen erzeugt (Cox & Moore, 2002; Dunbar & Caplan, 2000; Muller & Gruber, 2003).

Diese elektrochemischen Ionengradienten werden von *sekundär aktiven, Ionen-gekoppelten Transportern* genutzt, um Stoffe gegen ihren Konzentrationsgradienten über Membranen zu transportieren. Dabei wird zwischen Symportern/Co-Transportern und Antiportern/Counter-Transportern unterschieden. Bei den Symportern strömen Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten über die Zellmembran und ermöglichen dadurch, dass ein weiteres Molekül in die gleiche Richtung, aber auch gegen seinen elektrochemischen Gradienten transportiert werden kann. Bei den Antiportern wird durch den Fluss von Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten der Fluss von weiteren Molekülen in die entgegengesetzte Richtung, entgegen ihres elektrochemischen Gradienten, ermöglicht.

Transporter haben typischerweise eine spezifische Stöchiometrie, also eine spezifische Anzahl von transportierten Ionen bzw. Molekülen pro Transport-Zyklus. Bei Kanälen wird der Ionen- bzw. Molekülfluss durch die Offenwahrscheinlichkeit und durch die Leitfähigkeit des Kanals bestimmt.

1.2 Einteilung der Transporter und Kanäle

Die Nomenklatur von Transportern und die Einteilung in Transportergruppen beruhte in der Vergangenheit auf teilweise sehr unterschiedlichen Kriterien und war dadurch uneinheitlich.

Die für die Nomenklatur verwendeten Kriterien waren unter anderem die ähnliche oder gleiche Substratspezifität; die Kopplung an Ionengradienten oder die Art des Transportes sowie das Gewebe, aus dem die Transporter zuerst isoliert wurden und die Funktion, die diese Transporter in diesem Gewebe erfüllen.

In den frühen 1960er Jahren begannen Christensen und Mitarbeiter mit Studien zur Definition des Aminosäuretransportes über Zellmembranen, wobei eine bestimmte nachgewiesene Transportaktivität als System bezeichnet wurde (Christensen, 1990).

So wurden zum Beispiel Transporter, die Alanin bevorzugen, dem System A zugeordnet, obwohl sie auch andere kleine aliphatische Aminosäuren transportieren (Christensen, 1990; Oxender & Christensen, 1963). Das ASC System bevorzugte die Aminosäuren Alanin, Serin und Cystein und andere neutrale Aminosäuren (Christensen et al., 1967; Oxender & Christensen, 1963). Die beiden Systeme wurden dadurch unterschieden, dass nur das System A n-methylierte Aminosäuren wie zum Beispiel Alpha-(methylamino)-Isobuttersäure (MeAIB) transportierte. Das System L wurde nach seiner Präferenz für Leucin benannt, obwohl es auch andere neutrale Aminosäuren transportiert (Christensen, 1990; Oxender & Christensen, 1963), während das System N Aminosäuren mit Stickstoff (*nitrogen*) in der Seitenkette (Glutamin, Asparagin und Histidin) bevorzugt. Die Transportsysteme geladener Aminosäuren wurden nach ihren Eigenschaften in die Systeme $B^{0,+}$, y^+ , y^+L , $X_{A,G}^-$ und X_C^- eingeteilt.

Daraus ergaben sich eine Vielzahl von verschiedenen Transportergruppen, die jedoch nichts über die phylogenetische Verwandtschaft der einzelnen Transporter

aussagten. Dadurch wurden aber auch einige Transporter, die in mehreren Geweben oder Zellarten exprimiert werden, nach unterschiedlichen Kriterien bewertet und dementsprechend mehrfach und unterschiedlich benannt.

Erst in den frühen 1990er Jahren wurde erstmals die cDNA eines Aminosäuretransporters der Plasmamembran isoliert und charakterisiert. Erst durch die Sequenzierung des Genoms und durch relativ neue Techniken wie Expressionsklonierung, zielgerichtete Mutagenese und „expressed sequence tag“ (EST) ist es möglich geworden, neue und bereits bekannte Transporter genetisch zu identifizieren, zu charakterisieren und unter den Gesichtspunkten der Substratspezifität und der phylogenetischen Verwandtschaft zu ordnen. Im Zuge der Einführung einer neuen Nomenklatur wurden die Transporter nach Art des Transportes in sogenannte SLC (solute carrier) Familien und „nicht SLC“ Transporterfamilien eingeordnet.

1.2.1 Die SLC (solute carrier)- Reihe

Die SLC- Reihe (solute carrier) stellt eine große, heterogene Gruppe von Transportern dar und beinhaltet passive Transporter und ionengekoppelte Sym- und Antiporter.

Diese Transporter werden anhand ihrer Substrataffinität in Familien unterteilt, wobei die Gene der einzelnen Transporter einer Familie phylogenetisch miteinander verwandt sind (Hediger et al., 2004).

Ein Transporter wird einer spezifischen SLC Familie zugerechnet, wenn seine Aminosäuresequenz mindestens 20-25% Übereinstimmung mit denen der anderen Transporter dieser Familie aufweist.

Die Nomenklatur beinhaltet die Grundbezeichnung „SLC“, gefolgt von der Nummer der Familie, dem Buchstaben „A“ als Trenner und der Nummer des spezifischen Transporters.

Bislang sind ca. 300 verschiedene Transporter in 43 verschiedenen SLC-Familien bekannt.

SLC Familie	Art der Transporter	Anzahl der Transporter
SLC 1	Transporter von Glutamat und neutralen Aminosäuren	7
SLC 2	GLUT Transporter	14
SLC 3	Schwere Untereinheiten von heterodimeren Aminosäuretransportern	2
SLC 4	Bikarbonat Transporter	10
SLC 5	Na ⁺ -Glukose-Kotransporter	8
SLC 6	Na ⁺ und Cl ⁻ abhängige Neurotransmitter- Transporter	16
SLC 7	Kationische Aminosäure / Glykoprotein- assoziierte Aminosäuretransporter	14
SLC 8	Na ⁺ /Ca ²⁺ Tauscher	3
SLC 9	Na ⁺ /H ⁺ Tauscher	8
SLC 10	Natrium Gallensalz Kotransporter	6
SLC 11	Protonengekoppelte Metallionen Transporter	2
SLC 12	Elektroneutrale Kationen- Chlorid Kotransporter	9
SLC 13	Humane Na ⁺ Sulfat / Carboxylat Kotransporter	5
SLC 14	Urat Transporter	2
SLC 15	Protonen / Oligopeptid Kotransporter	4

SLC 16	Monocarboxylat Transporter	14
SLC 17	Vesikuläre Glutamat Transporter	8
SLC 18	Vesikuläre Amin Transporter	3
SLC 19	Folat / Thiamin Transporter	3
SLC 20	Typ III Na ⁺ -Phosphat Kotransporter	2
SLC 21	Organische Anionen Transporter	11
SLC 22	Organische Kationen / Anionen / Zwitterionen Transporter	18
SLC 23	Na ⁺ abhängige Ascorbinsäuretransporter	4
SLC 24	Na ⁺ / (Ca ²⁺ -K ⁺) Tauscher	5
SLC 25	Mitochondriale Carrier	27
SLC 26	Multifunktionale Anionentauscher	10
SLC 27	Fettsäuretransportproteine	6
SLC 28	Na ⁺ gekoppelte Nucleosid Transporter	3
SLC 29	Nucleosid Transporter	4
SLC 30	Zink-Ausstrom-Familie	9
SLC 31	Kupfertransporter	2
SLC 32	Vesikuläre Transporter inhibitorischer Aminosäuren	1
SLC 33	Acetyl-CoA Transporter	1
SLC 34	Typ II Na ⁺ -Phosphat Kotransporter	3
SLC 35	Nucleosid-Zucker Transporter	17
SLC 36	Protonen gekoppelte Aminosäuretransporter	4
SLC 37	Zucker-Phosphat / Phosphat Tauscher	4
SLC 38	System A und N, Na ⁺ gekoppelte Transporter von neutralen Aminosäuren	6
SLC 39	Metallionen Transporter	14
SLC 40	Basolaterale Eisentransporter	1
SLC 41	"MgtE-like" Magnesium Transporter	3
SLC 42	Rh Ammonium Transporter	3
SLC 43	Na ⁺ -unabhängige, System-L-artige Aminosäuretransporter	2

Tabelle 1: Liste der bisher bekannten SLC Familien (modifiziert nach Hediger, 2003)

1.2.2 Andere Transportergruppen / Nicht SLC- Transporter

Die verbleibenden Nicht SLC- Transporter sind ABC-Transporter, Pumpen, Ionenkanäle, Wasserkanäle (Aquaporine), Transporter- und Kanaluntereinheiten sowie Hilfs- beziehungsweise regulatorische Transportproteine.

1.3 Die SLC 1- Familie

Die SLC 1- Familie umfasst 5 hochaffine Glutamat-Transporter und 2 Transporter neutraler Aminosäuren, zu welchen auch der in dieser Arbeit untersuchte Transporter hASCT2/SLC1A5 gehört. Obwohl diese 7 Transporter eine hohe strukturelle Ähnlichkeit aufweisen, zeigen sie unterschiedliche funktionelle Eigenschaften, die jedoch Varianten eines gemeinsamen Transportmechanismus sind (Kanai & Hediger, 2004).

Die Identifizierung der hochaffinen Glutamat- Transporter begann 1992, als 3 Isoformen (EAAC1, GLT1, GLAST) unabhängig voneinander durch unterschiedliche Vorgehensweisen identifiziert wurden. Durch Expressionsklonierung wurde cDNA isoliert, die den neuronalen und epithelialen hochaffinen Glutamat- Transporter EAAC1 kodiert (Kanai & Hediger, 1992). GLT1 wurde als 73 kDa Glykoprotein aus der Synaptosomenfraktion P₂ extrahiert, welches einen hochaffinen Glutamat- Transport aufwies. Mittels eines Antikörpers gegen das extrahierte Protein konnte anschließend ein Klon aus einer cDNA-Bank des Rattengehirns isoliert werden, der für den glialen Glutamattransporter GLT1 kodiert (Pines et al., 1992). GLAST wurde bei der Isolation von UDP-Galaktose-Ceramid Galaktosyltransferase als 66 kDa Glykoprotein extrahiert; die cDNA wurde durch partielle Aminosäuresequenzierung ermittelt (Storck et al., 1992). Zwei weitere Glutamattransporter (EAAT4 und EAAT5) sowie die zwei Natrium-abhängigen Transporter neutraler Aminosäuren (ASCT1 und ASCT2) wurden später aufgrund von Sequenzhomologien gegenüber den Glutamattransportern identifiziert (Arriza et al., 1993; Arriza et al., 1997; Kekuda et al., 1996; Storck et al., 1992; Utsunomiya-Tate et al., 1996)

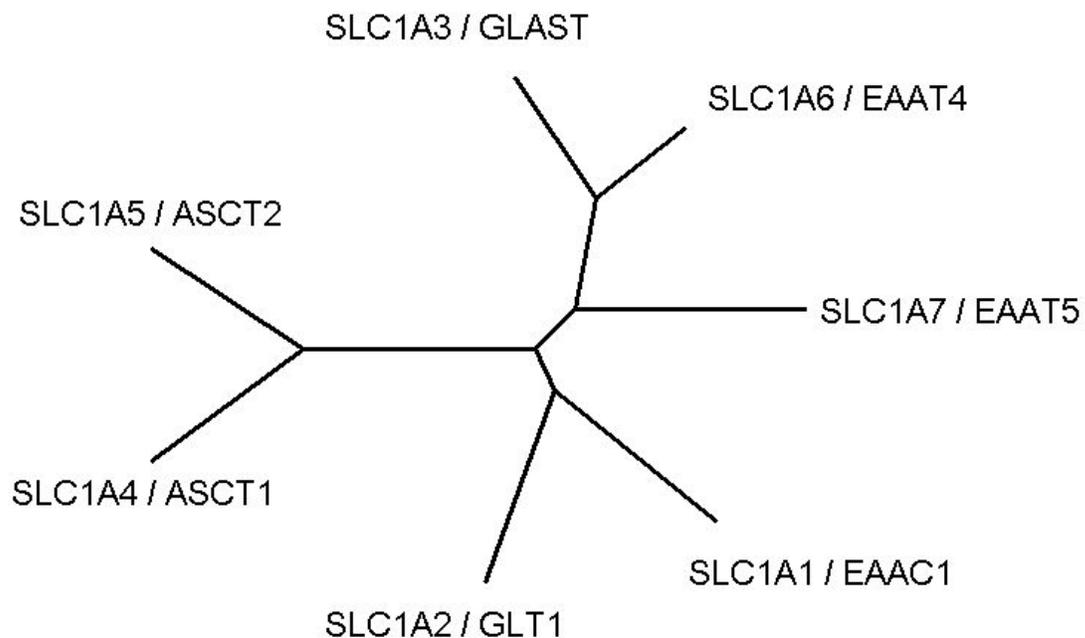


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der SLC1 Familie. Sie setzt sich aus 2 Untergruppen zusammen: den hochaffinen Glutamat- Transportern (SLC1A1,2,3 und 6) und den Transportern des ASC-Systems (SLC1A4 und 5) (modifiziert nach Kanai und Hediger, 2003).

Die Glutamattransporter weisen untereinander eine 44- 55% ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz auf, die Transporter von neutralen Aminosäuren, hASCT1/SLC1A4 und hASCT2/SLC1A5, haben 54% ihrer Aminosäuresequenz gemeinsam (Kanai & Hediger, 2004).

Die Synonyme, Substratspezifitäten, Transportcharakteristika und Expressionsorte der SLC 1 Familie sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgeführt. Der in dieser Arbeit untersuchte Transporter ist grau unterlegt.

Genname	Proteinname	Expression	Genort
SLC1A1	EAAC1 EAAT3	Gehirn (Neuronen), Darm, Niere, Leber, Herz	9q24
SLC1A2	GLT-1 EAAT2	Gehirn (Astrozyten), Leber	11p13-p12
SLC1A3	GLAST EAAT1	Gehirn (Astrozyten), Herz, Skelettmuskel, Plazenta	5p13
SLC1A4	ASCT1 SATT	ubiquitär	2p15-p13
SLC1A5	ASCT2 AAAT, ATB(0), M7V1, RDR, RDRC	Lunge, Skelettmuskel, Darm, Niere, Hoden, Fettgewebe	19q13.3
SLC1A6	EAAT4	Kleinhirn (Purkinje-Zellen)	19
SLC1A7	EAAT5	Retina	1p

Tabelle 2: Gen- und Proteinnamen sowie Expressions- und Genorte der SLC1-Familie.

Genname	Substrate	Transportcharakteristika	Synonyme
SLC1A1	L-Glu, D/L-Asp	Na ⁺ , H ⁺ , K ⁺ -Kotransporter	System X _{AG} ⁻
SLC1A2	L-Glu, D/L-Asp	Na ⁺ , H ⁺ , K ⁺ -Kotransporter	System X _{AG} ⁻
SLC1A3	L-Glu, D/L-Asp	Na ⁺ , H ⁺ , K ⁺ -Kotransporter	System X _{AG} ⁻
SLC1A4	L-Ala, L-Ser, L-Cys	Na ⁺ -Kotransporter, Aminosäurentauscher	System ASC
SLC1A5	L-Ala, L-Ser, L-Thr, L-Cys, L-Gln	Na ⁺ -Kotransporter, Aminosäurentauscher	System ASC
SLC1A6	L-Glu, D/L-Asp	Na ⁺ , H ⁺ , K ⁺ -Kotransporter	System X _{AG} ⁻
SLC1A7	L-Glu, D/L-Asp	Na ⁺ , H ⁺ , K ⁺ -Kotransporter	System X _{AG} ⁻

Tabelle 3: Gennamen, Substrate und Transportcharakteristika der Transporter der SLC1-Familie sowie deren Einordnung in synonym verwendete Transportsysteme.

1.4 Der hASCT2

Der humane Transporter neutraler Aminosäuren Typ 2 (hASCT2, Genname SLC1A5, Gen Bank Accession No. NM_005628, TC# 2.A.23.3.3) gehört gemeinsam mit dem Transporter ASCT1 (Genname SLC1A4) dem System ASC an. Der erste Transporter des Systems ASC, der kloniert wurde, war der ASCT1 und wurde 1993 aus einer cDNA Datenbank des menschlichen Motorkortex isoliert (Arriza et al., 1993) und wurde initial SATT genannt (Shafqat et al., 1993). Der ASCT2 konnte 3 Jahre später aus einer cDNA Datenbank der Maus, mittels PCR Primern für bestimmte Aminosäuresequenzen des ASCT1 und den exzitatorischen Glutamat Transportern, isoliert werden. Somit konnten alle bislang bekannten Mitglieder der SLC1 Familie identifiziert werden (Kanai & Hediger, 2003; Kanai & Hediger, 2004; Utsunomiya-Tate et al., 1996).

Der hASCT2 ist phylogenetisch eng mit dem hASCT1/SLC1A4 verwandt und stimmt mit diesem zu 54% in der Genstruktur überein. Beide transportieren eine überlappende, aber spezifische Gruppe neutraler Aminosäuren. Zusätzlich zu den für das ASC-System typischen Substraten (L- Alanin, L- Serin, L- Cystein) transportiert der hASCT2/SLC1A5 zusätzlich L- Glutamin und L- Asparagin mit hoher Affinität, weiterhin einige andere neutrale Aminosäuren mit geringer Affinität (Broer et al., 2000; Utsunomiya-Tate et al., 1996). Auch Glutamat ist Substrat des hASCT2. Der durch hASCT2 vermittelte Glutamattransport steigt bei azidotischer Stoffwechsellage (Gegelashvili et al., 2006; Utsunomiya-Tate et al., 1996). Wie auch der Transporter hASCT1, wird durch den hASCT2 ein obligat Natrium-abhängiger Austausch der spezifischen Substrate vorgenommen (Broer et al., 2000).

1.4.1 Expression des hASCT2

Der hASCT2 wird in sehr unterschiedlichen Geweben exprimiert, so zum Beispiel in Plazenta, Lunge, Skelettmuskel, Niere, Darm, Pankreas, Prostata und fetalen Astrozyten (Gegelashvili et al., 2006; Kekuda et al., 1996; Li et al., 2003). In der Niere und im Darm wird der hASCT2 im Bürstensaum-Epithel der proximalen Tubuluszellen und der Enterozyten exprimiert (Avisar et al., 2001) und dient hier dem transepithelialen Transport von Aminosäuren. Zudem versorgt der Transporter die Zellen mit den für den Metabolismus notwendigen Aminosäuren.

Im Gehirn der Ratte konnten in Astrozyten und Neuronen gleichermaßen ein hohes Expressionsniveau von ASCT1 nachgewiesen werden. ASCT2 konnte nur in Astrozyten nachgewiesen werden und scheint astrozytenspezifisch zu sein. Die Glutaminaufnahme in Astrozyten wird hauptsächlich durch Aminosäuretransportsysteme mit den funktionellen Eigenschaften der Transporter ASCT2, LAT1, LAT2, SN1 und $\gamma(+)$ LAT2 bewirkt (Broer et al., 1999; Dolinska et al., 2004; Heckel et al., 2003; Yamamoto et al., 2003).

Zumindest im Gehirn der Ratte konnte die wichtige Rolle des ASCT2 bei der Freisetzung von intrazellulärem Glutamin aus Astrozyten im obligaten Austausch gegen extrazelluläre Aminosäuren bewiesen werden. Die starke pH- Abhängigkeit dieses Transportmechanismus legt die Relevanz bei pathologisch- azidotischer Stoffwechsellage nahe (Broer et al., 1999).

Wie der ASCT1 ist auch der ASCT2 Bestandteil des hochaffinen Glutamin- Glutamat- Transportsystems, welches den essentiellen Transfer von Glutamin zwischen Astrozyten und Neuronen vermittelt. Welche definitive Rolle der ASCT2 neben dem ASCT1 im hochaffinen Glutamin - Glutamat - Transportsystem spielt, ist bislang jedoch noch unklar (Heckel et al., 2003; Yamamoto et al., 2003).

Expression des hASCT2 in der Plazenta

Das Hüllprotein, welches durch den humanen endogenen Virus Typ W (HERV-W) kodiert wird, ist unter anderem für die Fusion von Virus und Zelle verantwortlich. Darüber hinaus ist es hochgradig Zell-fusionierend und wird auch endogen in humanen plazentaren Synzytiotrophoblasten exprimiert und dort als Synctin-1 bezeichnet. Die Zielstrukturen dieses in der Plazentogenese wichtigen Proteins sind die Aminosäuretransporter hASCT1 und 2 (Lavillette et al., 2002). Die Fusion von Trophoblastenzellen in der Plazenta ist eine der wichtigsten und entscheidenden Grundlagen für eine gesunde Schwangerschaft. Dieser Fusionsprozess dauert über die gesamte Schwangerschaft an und ist entscheidend für die Erhaltung der Synzytiotrophoblastenschicht, der direkten Grenze zwischen fetalem Gewebe und maternalem Blut. Neben einigen anderen Proteinen ist Synctin-1 ein wichtiger Regulator der Fusion von Trophoblasten, deren gemeinsame Zielstruktur die Aminosäuretransporter hASCT1 und 2 sind (Lavillette et al., 2002).

Bei der plazentaren Hypoxie und der damit verbundenen gestörten Synzytiotrophoblastengnese konnte keine veränderte Aktivität von hASCT2 in Zytotrophoblasten nachgewiesen werden, wohl aber eine durch die Hypoxie verursachte Minderung (*down - Regulation*) der Expression von Synctin-1 (Chen et al., 2006; Knerr et al., 2003).

Expression des hASCT2 in Malignomen

Fuchs et al. konnten mittels einer EST-Sequenzierungsdatenbank des Cancer Genome Anatomy Projekt (CGAP) das Expressionsniveau klassischer Transporter neutraler Aminosäuren in normalen und in Tumorgeweben zeigen. Es zeigte sich, dass insbesondere die Transporter ASCT2 und LAT1 in Tumoren bis zu dreimal so stark exprimiert werden, als in den gesunden Ursprungsgeweben (Fuchs & Bode, 2005).

Eine deutliche Zunahme der Expression des ASCT2 konnte dabei für Malignome der humanen Gewebe Gehirn, Auge, Niere, Lymphknoten, Brustdrüse, Muskel, Plazenta und Haut nachgewiesen werden.

1.4.2 Funktionelle Eigenschaften des hASCT2

Die Glutamatrezeptoren der SLC1 - Familie koppeln den Aminosäuretransport an den Transport von anorganischen Ionen, wobei der hohe elektrochemische Gradient dieser Ionen über die Zellmembran als Energiequelle für den Aminosäuretransport genutzt wird (Kanai & Hediger, 2004; Schniepp et al., 2004). Damit zählen sie zu den bereits oben erwähnten sekundär aktiven, ionengekoppelten Transportern. Ein wichtiger Mechanismus für diese Funktion ist die Kalium-abhängige Relokation in die Ausgangsposition nach erfolgtem Einwärtstransport einer Aminosäure ohne einen damit verbundenen Auswärtstransport einer Aminosäure.

Während die Glutamat-Transporter Kalium für die Relokation benötigen, sind die ASC-Transporter nicht zu einer Kalium-abhängigen Relokation fähig (siehe auch Abbildung 2) (Broer et al., 2000; Zerangue & Kavanaugh, 1996a). Damit einhergehend sind in der Struktur der ASC-Transporter die für den Kalium Antiport und die Relokation verantwortlichen Aminosäuren Glutamat an Position 404 und Tyrosin an Position 403 nicht vorhanden.

Ebenfalls ist der Aminosäuretransport bei den ASC-Transporten im Gegensatz zu den Glutamat-Transportern nicht an einen Protonentransport gekoppelt (Broer et al., 2000; Zerangue & Kavanaugh, 1996a). Die ASC-Transporter scheinen als reine, Natrium-abhängige Aminosäuretaucher zu fungieren, während Glutamattransporter, aufgrund der Kalium-abhängigen Relokation auch als unidirektionale Transporter ohne Aminosäureaustausch arbeiten können.

Als Vertreter des ASC- Systems zeigt der hASCT2 somit die funktionellen Eigenschaften eines obligaten Aminosäuretauschers,, wobei die beiden Substrate homolog oder heterolog sein können (Broer et al., 1999; Torres-Zamorano et al., 1998; Zerangue & Kavanaugh, 1996a). Die Charakterisierung des humanen ASCT2 in *Xenopus laevis* Oozyten zeigte einen Natrium-abhängigen Einstrom von extrazellulären Aminosäuren im Austausch gegen intrazelluläre Aminosäuren,wobei nur die bereits erwähnten neutralen Aminosäuren als Substrate einen Austausch stimulieren können. Die Affinität des hASCT2 für ein bestimmtes Substrat ist hierbei symmetrisch, also unabhängig von der Richtung (Einstrom vs. Ausstrom) des Transportes. Dementsprechend ist der homo- oder heterologe Austausch von Aminosäuren durch den hASCT2 elektroneutral und benötigt den Kotransport eines Natrium-Ions mit einer neutralen Aminosäure in die Zelle hinein gekoppelt an den Kotransport eines Natrium Ions und einer Aminosäure aus der Zelle heraus (Fuchs & Bode, 2005). Somit zeigt der ASCT2 die Eigenschaften des klassischen Natrium-abhängigen Aminosäuretransports (Arriza et al., 1993; Kekuda et al., 1996; Shafqat et al., 1993; Utsunomiya-Tate et al., 1996)

Die ASC Transporter zeigen eine hohe Affinität für Alanin, Serin, Threonin und Cystein. Zusätzlich zu diesen für die ASC Transporter typischen Substrate, transportiert der ASCT2 auch Glutamin und Asparagin mit hoher Affinität sowie Methionin, Leucin und Glycin als Substrate mit niedriger Afinität. ASCT1 zeigte keine Affinität zu den genannten Substraten (Arriza et al., 1993; Kekuda et al., 1996; Shafqat et al., 1993; Utsunomiya-Tate et al., 1996).

Der Aminosäure-Natrium-Kotransport zeigt hierbei eine 1 zu 1 Stöchiometrie. Die Natriumkonzentration hat hierbei keinen Einfluss auf die Michaeliskonstante (K_m) für Glutamin und umgekehrt. In Epithelzellen der Rattenniere konnte anhand von Messungen der Transportkinetik gezeigt werden, dass vorzugsweise

extrazelluläres Glutamin im Kotransport mit Natrium gegen ein intrazelluläres Glutamatmolekül getauscht wird (Oppedisano et al., 2007; Schniepp et al., 2004).

Der Austauschmechanismus des ASCT2 kann somit den Pool an zytoplasmatischen Aminosäuren ausgleichen (Meier et al., 2002; Torres-Zamorano et al., 1998), ohne Energie aus dem elektrochemischen Natrium Gradienten zu verbrauchen (Zerangue & Kavanaugh, 1996a). Als obligater Aminosäuretaucher kann der ASCT2 per se keine Netto-Aufnahme von Aminosäuren bewirken; der heterogene Austauschmechanismus erlaubt jedoch eine Netto-Aufnahme von Substraten so lange für ein anderes Substrat ein Konzentrationsgradient über der Membran existiert (Zerangue & Kavanaugh, 1996a). Dementsprechend wurde postuliert, dass die Koexpression eines unidirektionalen Transporters mit überlappender Substratspezifität (wie zum Beispiel der SNAT der SLC38 Gruppe) für die Substrate des auswärts gerichteten Transportes des ASCT2 sorgen kann (Verrey, 2003).

So können Aminosäuretransporter des System A für erhöhte intrazelluläre Spiegel nicht essentieller Aminosäuren wie Glutamin und Alanin sorgen, die wiederum durch Transporter des Systems ASC gegen extrazelluläre essentielle Aminosäuren getauscht werden können (Broer, 2002). Innerhalb dieses Modells könnte ASCT2 die essentiellen Aminosäuren Threonin, Methionin, Leucin, Valin, Isoleucin, Phenylalanin und Tryptophan intrazellulär akkumulieren.

Trotz der stark unterschiedlichen Substratspezifität zwischen den klassischen Glutamattransporten und den Transporten hASCT1/2 als typische Vertreter der ASC-Gruppe, besitzen beide Gruppen gemeinsame Eigenschaften, welche ihre enge strukturelle Verwandtschaft zeigen. So zeigen Glutamatrezeptoren wie der EAAC1 eine Transportaktivität für die neutrale Aminosäure Cystein (Zerangue & Kavanaugh, 1996b), während seinerseits der Transporter neutraler Aminosäuren ASCT2 Glutamat transportiert, wenngleich auch mit geringerer Affinität (Utsunomiya-Tate et al., 1996).

Wie auch Glutamat-Transporter zeigen die ASC- Transporter ebenfalls eine Leitfähigkeit für Anionen; elektrophysiologisch verhalten sich diese Transporter also wie Liganden-gesteuerte Anionen Kanäle (Broer et al., 2000; Zerangue & Kavanaugh, 1996a).

Mittels Flux- Studien mit $(22)\text{NaCl}$ konnte gezeigt werden, dass mit jeder extrazellulären Aminosäure 4-7 Natrium Ionen in die Zelle gelangen, wobei hier kein stöchiometrisches Verhältnis vorliegt. Es kommt demnach in Anwesenheit der Substrate zu einem ungekoppelten Anionen-Fluss über die Zellmembran (Broer et al., 2000).

In der Abwesenheit der zu transportierenden Substrate konnte ebenfalls eine Leitfähigkeit für Anionen gezeigt werden, was auf eine Leck-Leitfähigkeit für Anionen hindeutet. Diese Leck-Leitfähigkeit kann durch Benzyl-Serin und Benzyl-Alanin spezifisch inhibiert werden, wobei diese Hemmung die Anwesenheit von extrazellulärem Natrium voraussetzt. Diese Natrium abhängige Leck-Leitfähigkeit für Anionen wurde auch für die eng verwandten Transportergruppe EAAT beschrieben und unterstreicht somit die auch die enge Verwandtschaft der funktionellen Eigenschaften (Grewer & Grabsch, 2004).

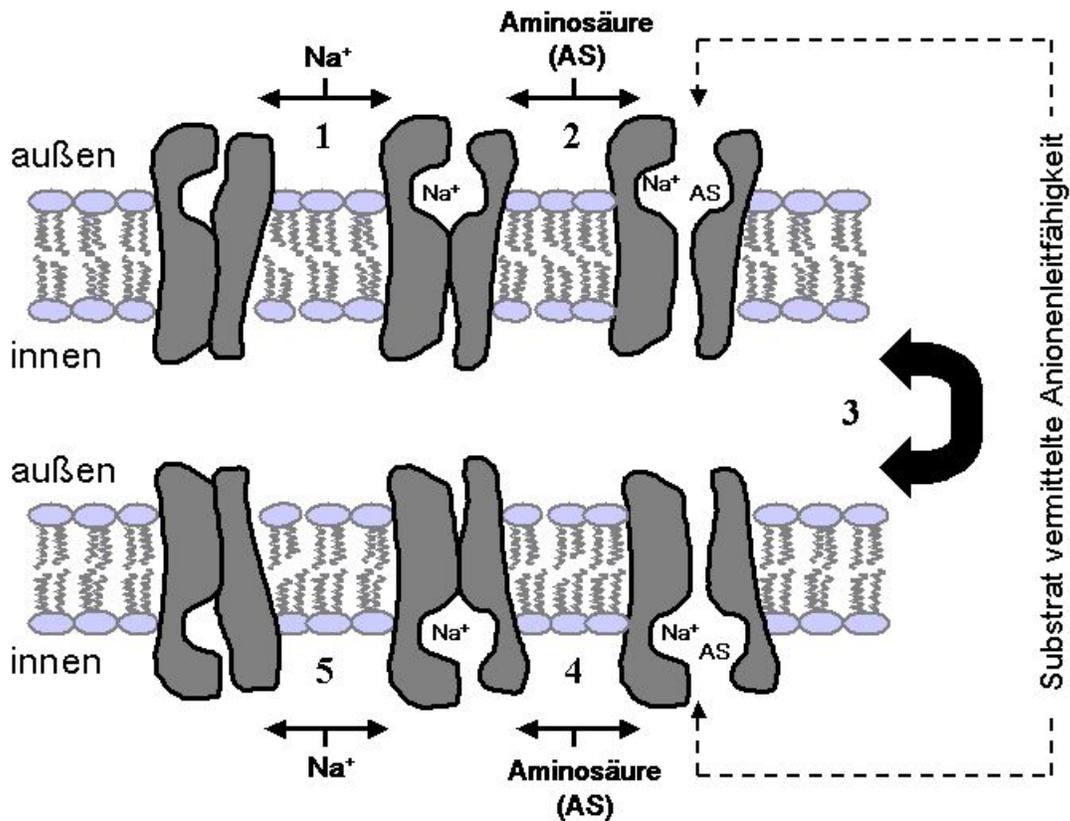


Abbildung 2: Kinetisches Modell der ASC-Transporter: unter normalen Bedingungen wird der „leere“ Transporter mit einer Aminosäure und einem Natrium-Ion beladen (Schritt 1 und 2), gefolgt von der Translokation des gesamten beladenen Transporters über die Plasma Membran (Translokation, Schritt 3) und dem Entlassen der gebundenen Substrate an der Innenseite der Membran (Schritt 4 und 5). Aufgrund der bei den ASC Transportern nicht vorhandenen ⁴⁰⁴Glutamat und ⁴⁰³Tyrosin-Reste ist die Kalium abhängige Relokation (Schritt 5 auf 1) nicht möglich, weswegen die Relokation nur durch einen weiteren, gegengerichteten Aminosäureaustausch (Schritt 5 bis 1) möglich ist. Die Substrat vermittelte Anionenleitfähigkeit ist rechts im Bild dargestellt. (modifiziert nach Kanai und Hediger, 2003)

1.4.3 Struktur der SLC1- Transporter

Das für den Transporter hASCT2 kodierende Gen SCL1A5 besteht aus 13712 Basenpaaren und liegt auf Chromosom 19 (19q13.3). Nach der Transkription und Translation entsteht ein Transporterprotein aus 541 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 56598 Dalton.

Mit Hilfe einer molekularbiologischen Software (Vector NTi) wurde in der Aminosäuresequenz des ASCT2 nach den von Kobayashi et al. 1993 beschriebenen Konsensussequenzen für die SGK oder PKB gesucht. Hierbei zeigten sich keine der bekannten Konsensussequenzen. Ebenfalls findet sich kein Tyrosin-Prolin (PY) Motiv, die Zielstruktur der Ubiquitinligase Nedd4-2.

In Abbildung 3 ist die Struktur der SLC1 Familie wiedergegeben. Das Modell zeigt 8 alpha-helikale Transmembrandomänen (# 1-8), eine lange glykolysierte extrazelluläre Schleife zwischen den Transmembrandomänen 3 und 4 sowie eine lange hydrophobe intrazelluläre Schleife am C-terminalen Ende.

Eine Schleife (A + B) zwischen den Transmembrandomänen 7 und 8 ähnelt dem Ionen-leitenden Porus eines Ionenkanals. C entspricht einer Schleife, von der angenommen wird, dass sie teilweise in die „Translokations-Öffnung“ hineinragt, welche sich zwischen den Transmembrandomänen 7 und 8 befindet.

In der 7. Transmembrandomäne befinden sich die Aminosäurenreste Glutamin (Pos. 404) und Tyrosin (Pos. 403) die bei den Glutamattransportern, abgesehen von hASCT1 und hASCT2, vorhanden sind und für die Kopplung des Transportmechanismus an Kalium verantwortlich sind (Kavanaugh et al., 1997; Zerangue & Kavanaugh, 1996a; Zhang & Kanner, 1999). Der Aminosäurerest Serin (Pos. 440) der sich auf der Außenseite der Schleife B befindet, scheint eine wichtige Rolle in der Kopplung des Transports an Natrium-Ionen zu spielen (Zhang et al., 1998).

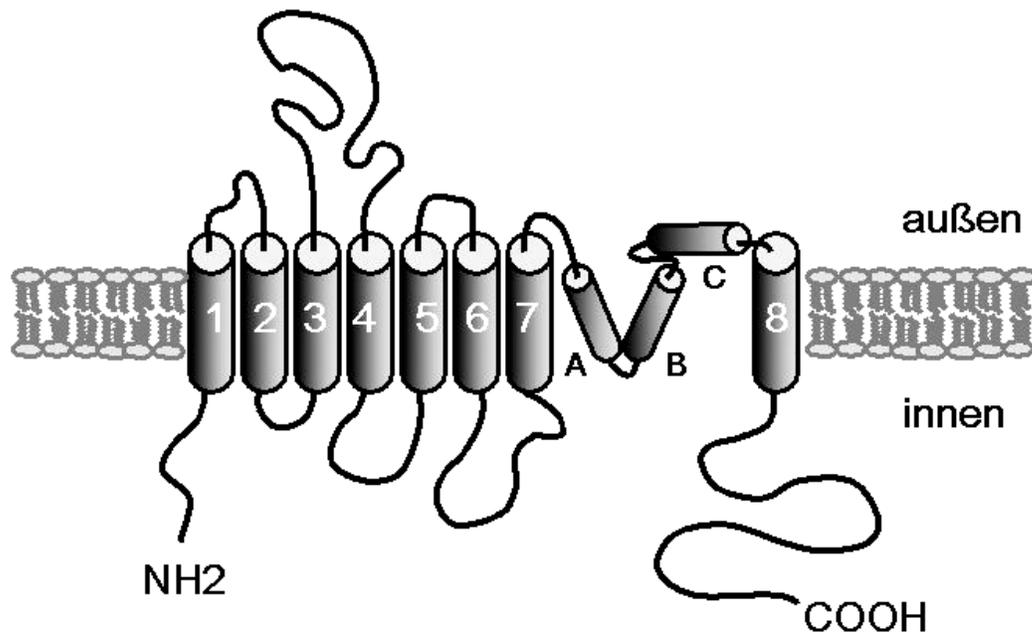


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Membrantopologie der SLC1 Transporterfamilie. Die Transmembrandomänen, die lang genug sind um in Form einer alpha-Helix die Membran zu überwinden, sind mit Zahlen gekennzeichnet. Die Schenkel der vermuteten Translokationsöffnung sind mit A und B gekennzeichnet. C kennzeichnet eine Schleife, von der vermutet wird, dass sie teilweise in die Translokationsöffnung zwischen den Transmembrandomänen 7 und 8 hineinragt. (Modifiziert nach Kanai und Hediger)

1.4.4 Regulation der Aktivität des hASCT2

Die Mechanismen der Regulation der Aktivität und der Expression des hASCT2 sind bislang nur unzureichend erforscht. In den letzten Jahren konnten jedoch zunehmend Erkenntnisse über die Mechanismen der Regulation der hASCT2-Aktivität auf Ebene der Transkription, der Proteinexpression (Bungard & McGivan, 2004) und der Translokation des hASCT2 von intrazellulären Kompartimenten in die Zellmembran gewonnen werden (Gegelashvili et al., 2006).

Mittels Antikörpern gegen das hASCT2 Kanalprotein in Hep2G-Zellen konnte in Western Blots eine steigende Expression von hASCT2 bei steigendem extrazellulärem Glutamatangebot gezeigt werden. Ebenfalls konnte mittels eines Luciferase-Vektors die gesteigerte Aktivität der hASCT2-Promotorregion und somit die Up-Regulation auf transkriptioneller Ebene bewiesen werden (Bungard & McGivan, 2004). Diese Stimulation der Promotorregion des hASCT2 scheint über die regulatorischen Proteine FXR/RXR zu erfolgen, welche ihrerseits an eine spezifische Interaktions-Sequenz im hASCT2 Promotor binden und so seine Aktivität steigern (Bungard & McGivan, 2005).

Ebenso konnten weitere Erkenntnisse über die extrazellulären Stimuli und der intrazellulären Signalkaskaden gewonnen werden, an deren Ende die Steigerung der Aktivität der Glutamat-Transporter der SLC1 Gruppe steht.

In fetalen Astrozyten konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre Anwesenheit von Glutamin und Alanin eine Verschiebung von hASCT2 von zytoplasmatischen Kompartimenten in die Plasmamembran bewirkt. Hierbei zeigte sich, dass bei Koexpression des astroglialen Glutamat Transporters GLAST und Glutamin-Synthetase (GS), welche Glutamat in Glutamin konvertiert, die intrazelluläre Glutaminkonzentration einen stärkeren Reiz zur Translokation des hASCT2 in die Plasmamembran darstellt als die alleinige, extrazelluläre Anwesenheit der hASCT2 spezifischen Substrate (Gegelashvili et al., 2006). Die pH-Abhängigkeit dieses Mechanismus mit hoher Konzentration des hASCT2 in der Plasmamembran bei Azidose gibt Hinweis auf die wichtige Rolle des hASCT2 bei azidotischer Stoffwechsellage, so z.B. bei ischämischer Azidose.

Der Glutamintransport in das intestinale Mukosaepithel durch hASCT2 wird durch den epidermalen Wachstumsfaktor (epidermal growth faktor, EGF) gesteigert. Hierfür konnte eine Signalkaskade identifiziert werden, welche die Proteinkinase C

(PKC) und mitogen-aktivierte Proteinkinase (MEK) einbindet (Wolfgang et al., 2003).

Die zelluläre Aufnahme von Aminosäuren wird weiterhin von Insulin und dem Insulin-ähnlichen-Wachstumsfaktor (Insulin like growth factor, IGF) reguliert, welche den Aminosäuretransport über eine Signalkaskade aktiviert. Auch in dieser Signalkaskade spielt die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-Kinase) eine Schlüsselrolle (Karlsen & Serck-Hanssen, 2002; Sims et al., 2000).

Die der PI3-Kinase in der Signalkaskade nachfolgenden Elemente sind unter anderem die Proteinkinase B (PKB) (Khan & Pessin, 2002; Lang & Cohen, 2001; Virkamaki et al., 1999), die Serum und Glukokortikoid induzierbare Kinase (SGK) 1 (Firestone et al., 2003) und deren Isoformen SGK2 und SGK3 (Kobayashi et al., 1999b).

Für viele Transporter, unter anderem auch für die Transporter SLC1A1 und SLC1A3 der SLC1 Glutamat-Transporterfamilie konnte eine Regulation durch die Kinasen SGK 1-3 nachgewiesen werden (Boehmer et al., 2003; Schniepp et al., 2004).

1.5 Regulationsmechanismen der Enzymaktivität als Grundlage der Regulation der Aktivität von Membrantransportern

Zellen, Zellverbände und Organismen sind im biochemischen bzw. physiologischen Sinn als Fließgleichgewichte zwischen chemischen Reaktionen unterschiedlicher Komplexität zu verstehen. Diese Reaktionen müssen zeitlich und räumlich, aber auch kinetisch koordiniert werden. Die kinetische Kontrolle der Reaktionen erfolgt in biologischen Systemen durch enzymatische Katalyse. Die Funktionen der Enzyme reichen von einfachen chemischen Reaktionen bis zu hochkomplexen Abläufen wie der DNS Replikation und der Translation. Die große Vielfalt der enzymatischen Reaktionen und der damit verbundenen Enzyme wird dabei durch vier prinzipiell verschiedene Mechanismen reguliert.

1.5.1 Allosterische Regulation

Bei der allosterischen Regulation erfolgt die Regulation durch die nicht kovalente Bindung eines Modulators am allosterischen Zentrum eines Enzyms. Mit der Bindung des Modulators verändert sich die Tertiärstruktur des Enzyms und damit die Affinität zwischen Substrat und aktivem Zentrum. Die Veränderung der Tertiärstruktur kann dabei zur Steigerung / Minderung der Affinität gegenüber dem Substrat (K-Typ) oder der Geschwindigkeit der Reaktion (V-Typ) kommen. Ein Substrat selbst kann dabei als Modulator agieren und somit die Katalyse weiterer Substrate induzieren. Hat ein Enzym mehrere aktive allosterische Zentren, so kann die Anlagerung eines Modulators / Substrates an das erste aktive Zentrum die Anlagerung eines zweiten Modulators / Substrates begünstigen. Man spricht hierbei von positiver Kooperativität.

1.5.2 Kofaktoren

Bei manchen Enzymen sind für die enzymatische Aktivität Kofaktoren notwendig. Kofaktoren sind meist kleinere Polypeptide, Metallionen oder leiten sich von den Vitaminen ab. Bei Enzymen, welche durch die Bindung von Kofaktoren reguliert werden bezeichnet man das Protein ohne den für die Funktion notwendigen Kofaktor Apoenzym; durch die Bindung des Kofaktors entstehen Holoenzyme. Generell sind zwei verschiedenen Gruppen von Kofaktoren zu unterscheiden, nämlich Koenzyme und prosthetische Gruppen. Die Koenzyme werden nicht kovalent an das Apoenzym gebunden. Bei der Reaktion werden Ligand und Koenzym verändert und freigesetzt wobei das Koenzym in einer zweiten, unabhängigen Reaktion regeneriert werden muss. Im Gegensatz zu Koenzymen sind prosthetische Gruppen kovalent an das Apoenzym gebunden. Eine Abspaltung führt zur irreversiblen Denaturierung des Enzyms. Auch prosthetische Gruppen werden bei der Katalysereaktion verändert, aber am gleichen Enzym regeneriert.

1.5.3 Proteolytische Spaltung

Viele Enzyme werden durch proteolytische Spaltung irreversibel aktiviert. Dabei werden die Enzyme als Proenzyme, also inaktive Vorstufen, synthetisiert. Ihre Aktivierung erfolgt durch spezifische Hydrolasen, die einen Teil der Aminosäurekette vom Proenzym hydrolytisch abspalten. Dadurch kommt es zur Konformationsänderung der Tertiärstruktur mit Bildung oder Freilegung des aktiven Zentrums.

1.5.4 Regulation der Enzymaktivität mittels Proteinphosphorylierung durch Proteinkinasen

In eukaryotischen Zellen und in höheren Organismen erfolgt die Kontrolle von Stoffwechselreaktionen überwiegend durch Interkonversion. Hierbei werden Enzyme mittels reversibler Phosphorylierung durch Proteinkinasen kovalent modifiziert.

Das Prinzip der Phosphorylierung von Enzymen zur Konformations- und Aktivitätsänderung gegenüber dem Substrat wurde in den 50er Jahren bei der Untersuchung des hepatischen Glykogenstoffwechsels entdeckt (Sutherland, Jr. & Wosilait, 1955).

Erst durch das Prinzip der Interkonversion sind komplexe Signalnetzwerke und Schaltsysteme möglich. Insbesondere die Wirkungen extrazellulärer Stimuli auf eine Zelle werden über membranständige und intrazelluläre Signalmechanismen weitergeleitet und beruhen auf einem komplexen Zusammenspiel von Proteinkinasen, Phosphatasen und Phospholipasen. Mit zunehmender funktioneller und damit auch metabolischer Komplexität des Organismus steigt gleichermaßen auch der Bedarf an spezifischen Regulationsmechanismen. Nach der Sequenzierung des humanen Genoms wurde berechnet, dass ungefähr 3% aller humanen Gene für Proteinkinasen kodieren. Bis jetzt konnten ca. 500 verschiedene humane Proteinkinasen identifiziert werden.

Die durch die Phosphorylierung bewirkte Konformationsänderung des Zielenzym führt dabei beispielsweise zur Freigabe von Bindungsstellen oder zur Änderung der Substrat-Affinität und kann sich somit aktivierend oder inhibierend auf den Aktivitätszustand auswirken. Hierbei können Enzyme von einer oder mehreren Kinasen spezifisch modifiziert werden, wobei sich aktivierende und inhibierende Signale summieren können, genauso kann eine Kinase mehrere Zielenzyme modifizieren.

Die energieaufwendige Phosphorylierung erfolgt durch Übertragung eines Phosphatrestes aus ATP auf eine für die Kinase spezifische Phosphorylierungsstelle auf dem Zielprotein. Dabei wird die ATP-Hydrolyse und die spezifische Bindung des Phosphats an eine Aminosäure (Serin, Threonin oder Thyrosin) durch die Proteinkinase gesteuert. Die Veränderung der enzymatischen Aktivität des Zielproteins bzw. Zielenzym erfolgt auch hier durch Veränderung der Tertiärstruktur, in diesem Falle durch die Addition der negativen Ladung des Phosphatrestes. Durch Proteinphosphatasen ist eine enzymatische Abspaltung des Phosphatrestes möglich, wodurch das Zielprotein / Zielenzym in seine ursprüngliche Konformation und damit in seinen ursprünglichen Aktivitätszustand zurückkehrt (Gao et al., 1994; Pollard TD & Earnshaw WC, 2002).

1.6 Die Serum- und Glukokortikoid- abhängigen Kinasen (SGK)

Die SGK 1 wurde 1993 erstmals von Webster und Mitarbeitern beschrieben. Die Konzentration der mRNA dieses Proteins stieg in einer Ratten-Tumorzelllinie innerhalb von 30 min stark an, nachdem die Zellen Serum oder Glukokortikoiden ausgesetzt wurden (Webster et al., 1993a; Webster et al., 1993b). Die hier gemachte Beobachtung des Anstiegs der zytosolischen Konzentration konnte in zahlreichen anderen Zelllinien bestätigt werden (Webster et al., 1993b). Das humane Homolog wurde 1997 als ein zellvolumenregulierendes und durch Hypertonizität aktivierbares Gen isoliert. Weiterführende Untersuchungen zeigten eine durch hypertonen Zellstress verursachte Aktivierung der Kinase durch Transkription (Waldegger et al., 1997).

Inzwischen ist eine große Zahl von stimulierenden Einflüssen unter Einbeziehung verschiedenster Reaktionskaskaden bekannt, die an der Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse beteiligt sind. Darunter sind unter anderem die renale Natriumrückresorption (Alvarez et al., 1999; Chen et al., 1999; Wang et al., 2001; Naray-Fejes-Toth et al., 2004; Naray-Fejes-Toth & Fejes-Toth, 2000; Naray-Fejes-Toth et al., 1999), der bronchiale Chloridtransport (Wagner et al., 2001), sowie die Zellproliferation und die Apoptose (Brunet et al., 2001; Brunet et al., 2004; Leong et al., 2003; Vereninov et al., 2001; Mikosz et al., 2001).

Des Weiteren wurde die SGK1 mit der Regulation zahlreicher Membrantransporter und Ionenkanäle in Zusammenhang gebracht, die zum Beispiel für den renalen Elektrolyttransport (Embark et al., 2004a; Palmada et al., 2003b; Palmada et al., 2003a; Embark et al., 2004b; Palmada et al., 2004a; Yun et al., 2002), die kardialen Funktionen (Henke et al., 2004; Embark et al., 2003) oder den enteralen Metabolittransport (Boehmer et al., 2004; Dieter et al., 2004; Palmada et al., 2004b) essentiell sind.

Auch im Genom vieler anderer Eukaryoten wurde die SGK mit hoher Homologie identifiziert. Diese Homologie, welche als evolutiv konservativ aufzufassen ist und die Expression in niedrigen wie höheren Organismen weisen auf eine grundlegende zellphysiologische Funktion der Kinase hin (Gonzalez-Robayna et al., 2000; Waldegger et al., 1998a; Waldegger et al., 1998b).

1.6.1 Eingruppierung, Isoformen und Expression in verschiedenen Geweben

Die SGK gehört zur Gruppe der AGC Kinasen und steht phylogenetisch in der Nähe von Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase B (PKB oder Akt) und Proteinkinase C (PKC). Insbesondere mit der Proteinkinase B ist die SGK im katalytischen Zentrum zu ca. 50% homolog (Lang & Cohen, 2001).

Durch Sequenzvergleiche sind im humanen Genom zwei weitere Isoformen der SGK gefunden worden. Das die SGK1 kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 6, die Gene der Isoformen SGK2 und SGK3 auf Chromosom 20 bzw. 8. Die Isoformen sind in den Aminosäuresequenzen der katalytischen Zentren zu 80% identisch, wobei die C-Termini eine hohe und die N-Termini fast keine Homologie aufweisen (Kobayashi et al., 1999b).

Wie auch PKB phosphorylieren SGK1, SGK2 und SGK3 die Aminosäuren Serin und Threonin, wenn diese innerhalb der SGK Phosphorylierungsstelle Arg-Xaa-Arg-Xaa-Xaa-Ser/Thr (wobei Xaa für eine beliebige Aminosäure steht) liegen (Kobayashi et al., 1999a).

Trotz der hohen Homologie der Sequenzen zeigen sich deutliche Unterschiede in der Gewebeverteilung und der Regulation. Die SGK1 fand sich in allen bislang untersuchten humanen Geweben wie zum Beispiel Niere, Hirn, Herz, Leber, Pankreas, Lunge, Plazenta und Skelettmuskel. Innerhalb dieser Gewebe ist die SGK allerdings nicht in allen Zelltypen exprimiert (Alliston et al., 2000; Gonzalez-Robayna et al., 1999; Klingel et al., 2000; Lang et al., 2000; Loffing et al., 2001; Waldegger et al., 1997; Waldegger et al., 1999; Warntges et al., 2002).

Gleichermaßen wird die SGK3 in allen humanen Geweben exprimiert, besonders stark in embryonalem Gewebe (Liu et al., 2000), Herz und Milz (Kobayashi et al.,

1999b). Die SGK2 hingegen wird nur in Leber, Niere, Pankreas und Gehirn exprimiert.

Hierbei wird ersichtlich, dass die Isoformen der SGK vor allem in Geweben mit hoher Transportkapazität für Ionen und Metabolite stark exprimiert werden und somit von größter physiologischer Bedeutung sind.

Mit der zunehmenden Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, die durch die SGK reguliert werden (z.B. beta-catenin, nuclear factor kappa B und forkhead transcription factor FKHRL1) wurde die zentrale physiologische Bedeutung der Serum- und Glukokortikoid-abhängigen Kinase nicht nur in der Regulation einzelner Transportsysteme sondern auch in der Steuerung von grundlegenden Funktionen wie der Zellproliferation und der Apoptose bekannt. Eine wichtige Rolle der SGK bei pathophysiologischen Prozessen wie dem Wachstum von Malignomen ist dementsprechend mehr als wahrscheinlich.

1.6.2 Translationale Regulation der SGK

Die vorwiegende Regulation der SGK geschieht auf der Ebene der Transkription. Als Induktoren der Transkription der SGK 1 sind bislang Serum (Webster et al., 1993b; Webster et al., 1993a), Glukokortikoide (Maiyar et al., 1996; Maiyar et al., 1997), Mineralokortikoide wie Aldosteron (Chen et al., 1999; Naray-Fejes-Toth, 1999), Vitamin D3 (Akutsu et al., 2001), Antidiuretisches Hormon (ADH oder Vasopressin), Follikel stimulierendes Hormon (FSH), Calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), der transformierende Wachstumsfaktor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), Tumor Nekrose Faktor α (TGF α), Interleukin 4 (IL-4), Thrombin sowie Hyperosmolarität bekannt (Firestone et al., 2003). Heparin hingegen inhibiert die SGK1 Transkription (Delmolino & Castellot, Jr., 1997).

Desweiteren wird die Transkription der SGK1 auch unter pathophysiologischen Bedingungen induziert. Dazu zählen unter anderem die Schädigung von Neuronen (Hollister et al., 1997; Imaizumi et al., 1994), fibrosierende Gewebe (Fillon et al.,

2002; Kumar et al., 1999; Lang et al., 2006a; Waldegger et al., 1999), die Wundheilung (Iyer et al., 1999) und die Erhöhung des Blutzuckers (Kumar et al., 1999; Lang et al., 2000).

Ein weiterer intrazellulärer Botenstoff, welcher die SGK1-Transkription stimuliert und für die gesteigerte SGK1 Expression bei Zellschädigung verantwortlich sein könnte, ist Ca^{2+} (Klingel et al., 2000).

Die auf die SGK1 Transkription regulierend einwirkenden Signalwege sind bislang nur unzureichend beschrieben. Bislang ist bekannt, dass die hypertone Aktivierung der SGK1 durch die stressaktivierte Proteinkinase 2 (SAPK2 oder p38) vermittelt wird (Bell et al., 2000; Waldegger et al., 2000). Weiterhin beteiligt sind Proteinkinase C (Mizuno & Nishida, 2001), Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (Park et al., 1999) sowie cAMP (Klingel et al., 2000).

Durch die Vielzahl der Faktoren, welche die SGK1 auf Transkriptionsebene regulieren wird die Sonderstellung der SGK1 hervorgehoben, da die Mehrzahl der anderen Proteinkinasen meist posttranslational durch Phosphorylierung herauf- oder herunterreguliert werden.

Eine transkriptionelle Regulation ist für die Isoformen SGK2 und SGK3 bislang nicht nachgewiesen (Lang & Cohen, 2001). Bekannt ist lediglich, dass die SGK2 Transkription in H4IIE Zellen nicht sensitiv für Serum und die Transkription der SGK3 in Rattenfibroblasten nicht sensitiv für Serum und Glukokortikoide ist (Kobayashi et al., 1999b).

1.6.3 Posttranslationale Regulation / reversible Phosphorylierung der SGK

Während die Regulation der Transkription der SGK auf genomischer Ebene durch die oben beschriebene Modulation des SGK Promotors erfolgt, findet die posttranskriptionelle Regulation der SGK auf Proteinebene durch reversible Phosphorylierung statt. Analog zur PKB, welche eine zu 54% identische katalytische Dömanne aufweist, erfolgt die Aktivierung der SGK hierbei über die

Phosphoinositid abhängigen Kinasen 1 und 2 (PDK 1 und 2), welche ihrerseits durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3) durch Phosphorylierung aktiviert werden. Die PI3-Kinase kontrolliert somit durch Phosphorylierung die Aktivität der PDK, welche ihrerseits direkt die SGK phosphoryliert und aktiviert (Biondi et al., 2001; Kobayashi & Cohen, 1999; Park et al., 1999; Verrey, 1999).

Die membranständigen PI3 Kinasen phosphorylieren PDK 1 und 2 nicht direkt. Die PI3 Kinasen katalysieren die Synthese spezifischer Phosphatidyl-Inositol-Phosphate, welche mit PH-Domänen der PDK interagieren. Die SGK selbst besitzt keine PH-Domäne.

Diese Kaskade ist durch den spezifischen PI3-Kinase-Blocker Wortmannin inhibierbar und somit PI3K abhängig.

Die SGK 1 besitzt 2 Phosphorylierungsstellen, wobei zunächst Serin auf Position 422 und anschließend Threonin auf Position 256 phosphoryliert wird. Erst durch die Phosphorylierung auf Position 422 wird durch Konformationsänderung die Phosphorylierung an Position 256 durch die PDK1 ermöglicht.

Analog dazu befinden sich die Phosphorylierungsstellen bei der SGK 2 auf Position 193 und 356, bei der SGK 3 auf Position 253 und 419 (Faletti et al., 2002; Kobayashi & Cohen, 1999).

Durch den Austausch von Serin gegen Aspartat an der Position 422 wird eine konstitutiv aktive Mutante der SGK 1 (^{S422D}SGK1) erzeugt. Durch Austausch von Lysin gegen Asparagin an Position 127 im katalytischen Zentrum der SGK1 wird eine inaktive Mutante (^{K127N}SGK1) erzeugt (Kobayashi & Cohen, 1999).

1.7 Regulation durch Ubiquitin induzierte Degradation

Während Proteinkinasen mittels Phosphorylierung Enzymaktivitäten kontrollieren, wobei durch reversible kovalente Bindungen inhibierend oder aktivierend wirkende Konformationsänderungen erfolgen, wird bei der Degradation nicht die Aktivität des Enzyms, sondern die Konzentration des Enzyms im Zytosol oder der Membran selbst reguliert.

Das Prinzip der Ubiquitinierung ist ein wichtiger Mechanismus bei der Degradation intrazellulärer und membrangebundener Proteine und besteht in der Markierung der Zielproteine durch enzymatische Anbindung von Ubiquitin und den anschließenden Abbau des Zielproteins im 26S-Proteasom. Membranproteine werden nach der Markierung mit Ubiquitin durch Endozytose internalisiert und anschließend endosomal bzw. lysosomal abgebaut.

Der Grad der Ubiquitinierung bestimmt dabei die Halbwertszeit des Zielproteins (Brickley et al., 2002).

Die Ubiquitinligase Nedd4-2 (neural-precursor-cell-expressed, developmentally down-regulated 4-2) konnte bei einer Vielzahl von Rezeptoren, Kanälen und Membrantransportern als Interaktionspartner identifiziert werden, welcher zur Aktivitätsminderung durch Internalisierung aus dem Zytoplasma in intrazytoplasmatische Kompartimente führt.

Jedoch auch die Kinasen als regulatorische Proteine unterliegen einer Degradation. Nach der Translation wird die SGK schnell wieder degradiert, wobei die Halbwertszeit im Zytosol bzw. an der Zellmembran beträgt lediglich ca. 30 Minuten beträgt (Brickley et al., 2002).

Als Interaktionspartner und Verantwortlicher für die Ubiquitinierung der SGK konnte ebenfalls Nedd4-2 identifiziert werden (Zhou & Snyder, 2005).

Die Bindungsstelle der Ubiquitinligase am Zielprotein wird als PY-Motiv bezeichnet und besteht aus der Sequenz Pro-Pro-Xaa-Tyr. Es konnten jedoch noch weitere Aminosäurefolgen als Zielsequenz der Ubiquitinierung identifiziert werden. Nedd4-2 tritt mit seinen 4 WW Domänen (Tryptophan basierte Motive aus 38

Aminosäuren) mit den PY-Motiven in Kontakt (Bruce et al., 2008). Es ist bekannt, dass unter anderem SGK ein PY-Motiv enthält und die Aktivität der SGK dosisabhängig durch Ubiquitin vermittelten Abbau reduziert wird.

Weiterhin steht die Ubiquitinierung ihrerseits unter der Kontrolle von Proteinkinasen, so wird Nedd4-2 durch die SGK 1 phosphoryliert, wodurch sich die Aktivität der Ubiquitinligase und die von ihr vermittelte Degradation vermindert (Boehmer et al., 2006). Eine direkte Interaktion zwischen SGK und dem zu regulierenden Transporter ist hierfür nicht notwendig (Palmada et al., 2004a). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass eine Ubiquitinierung und damit eine Degradation von SGK durch Nedd4-2 erst nach einer Phosphorylierung von Nedd4-2 durch SGK möglich ist, was am Beispiel des epithelialen Natriumkanals ENaC gezeigt werden konnte (Debonneville et al., 2001; Staub et al., 1997b), Die SGK induziert somit gleichzeitig den eigenen Abbau im Sinne einer Feedback-Inhibition (Zhou & Snyder, 2005).

Die Oberflächenexpression von Membranproteinen wird durch Insertion von intrazellulär in Vesikeln befindlichen Membranproteinen in die Plasmamembran und durch die Internalisierung durch Nedd4-2 vermittelte Ubiquitinierung bestimmt. SGK inhibiert somit die Internalisierung von Membranproteinen durch Nedd4-2. Am Beispiel des SLC1A1 konnte gezeigt werden, dass dieser durch Kinasen an der SGK / PKB Phosphorylierungsstelle (Thr482) phosphoryliert und damit direkt aktiviert wird. Gleichzeitig wird er indirekt durch die kinasenabhängige Phosphorylierung und damit Inaktivierung von Nedd4-2 positiv moduliert. Der SLC1A3 wird nur durch den letztgenannten Mechanismus moduliert (Boehmer et al., 2003; Schniepp et al., 2004).

1.8 Wirkungsmechanismen und Interaktion mit anderen Proteinen

Wie bereits beschrieben interagieren die SGKs mit ihren Zielstrukturen über bestimmte Zielsequenzen. Jedoch werden nicht alle Proteine, die diese Zielstrukturen enthalten, durch die SGK reguliert. So konnte für den Aminosäuretransporter hCAT1 keine Regulation durch die SGK gezeigt werden, obwohl spezifische Phosphorylierungsequenzen in der Sequenz zu finden sind (Palmada et al., 2004b). Desweiteren gibt es jedoch auch Proteine, die ebenfalls durch die Serum- und Glukokortikoid-abhängige Kinase reguliert werden, obwohl sie keine der bekannten Sequenzen besitzen (Henke et al., 2004). Der Mechanismus dieser Interaktion ist bis dato nicht abschließend geklärt, die Regulation über ein weiteres dazwischengeschaltetes Protein ist jedoch wahrscheinlich (Pearce, 2003).

Am Beispiel des Kaliumkanals Kv1.3 konnte gezeigt werden, dass dieser durch die SGK1 stimuliert wird, obwohl er keine der bislang bekannten SGK Phosphorylierungsequenzen aufweist. Weiterhin kam es zu einer deutlichen Aktivitätsminderung des Kv1.3 bei Koexpression der Ubiquitinligase Nedd4-2, obwohl in der Sequenz des Kv1.3 kein PY-Motiv, also keine spezifische Nedd4-2 Interaktionssequenz nachgewiesen werden konnte (Henke et al., 2004).

Verschiedene Proteine werden durch die SGKs reguliert, eine direkte Interaktion ist aber nicht immer nachzuweisen, so dass eine Signalkaskade über noch nicht identifizierte Zwischenproteine wahrscheinlich ist, die die Wirkung der SGK vermitteln.

1.9 Klinische Relevanz

1.9.1 Der hASCT2 als retroviraler Rezeptor

Der hASCT2 konnte als Rezeptorstruktur für Retroviren identifiziert werden (Rasko et al., 1999) und wird von einer breiten Gruppe von Retroviren genutzt, um Zellen zu infizieren. Zu diesen Retroviren zählen unter anderem die Typ C Retroviren der Katze (*feline endogenous virus*, RD114), des Affen (*baboon endogenous virus*, BaEV), das humane endogene Virus Typ W (HERV-W) und das immunsuppressive Typ D Retrovirus des Primaten (Rasko et al., 1999; Tailor et al., 1999; Tailor et al., 2001). Der RD114 der Typ D Gruppe benutzt den hASCT2 um Zellen zu infizieren, reduziert aber gleichzeitig den durch diesen vermittelten Transport spezifischer Aminosäuren (Rasko et al., 1999). Der geminderte Transport von Aminosäuren, die für den zellulären Metabolismus essentiell sind, könnte Einfluss auf die virale Replikation haben, aber auch die Zellproliferation beeinträchtigen, was als ein Mechanismus der viralen Toxizität und der Immunsuppression vermutet wird. Das Typ D Retrovirus des Affen verursacht bei Makaken eine Immunsuppression und ist mutmaßlicher Auslöser opportunistischer Infektionen bei AIDS Patienten (Tailor et al., 1999). Es wurde mittlerweile bewiesen, dass eine N-terminale Glykosylierung einer hypervariablen Sequenz von 21 Aminosäuren in der 2. extrazellulären Schleife des hASCT2 die retrovirale Rezeptorfunktion determiniert (Marin et al., 2003).

1.9.2 Der hASCT2 als Zielstruktur von *Legionella Pneumophila*

Legionella Pneumophila ist ein gramnegatives Stäbchenbakterium, welches sich in phagozytischen Zellen vermehren kann und als opportunistischer Erreger zu atypischen, interstitiellen und meist schwerwiegenden Pneumonien beim Menschen führt. Der Prozess der Phagozytose führt zu einer gravierenden Änderung der Umweltbedingungen, die eine koordinierte Regulation der Expression von *L. pneumophila* Genen für das intrazelluläre Überleben notwendig

macht. Für diesen Mechanismus konnten einige Proteine identifiziert werden, welche nur bei sich intrazellulär vermehrenden Legionellen nachweisbar waren und möglicherweise Gen-regulatorische Funktion besitzen (Susa et al., 1996). Es konnte jedoch weiterhin nachgewiesen werden, dass *L. pneumophila* vom Transportsystem neutraler Aminosäuren hASCT2 der Wirtszelle abhängt und dieses bei einer Infektion verstärkt exprimiert wird. Durch pharmakologische Inhibition des hASCT2 mittels BCH (2-Aminobicyclo[2,2,1]Heptan-2-Carboxylsäure), einem kompetitiven Inhibitor der Aminosäureaufnahme, sowie durch Stilllegung des hASCT2 Gens mittels siRNA wurde die intrazelluläre Vermehrung von *L. pneumophila* vollständig blockiert, ohne die Vitalität der Wirtszelle zu beeinträchtigen (Wieland et al., 2005).

1.9.3 Der Aminosäuretransporter hASCT2 im Tumormetabolom

Wie bereits in Kapitel 1.4.1 beschrieben, konnte mittels der EST Datenbanken des Cancer Genome Anatomy Projekt (CGAP) durch Fuchs et al. ein stark erhöhtes Expressionsniveau des ASCT2 in vielen humanen Malignomen nachgewiesen werden, wobei sich das Expressionsniveau bis zu 3-fach erhöht zeigte.

Viele andere klassische Aminosäuretransportsysteme zeigten hingegen keine oder nur eine geringe Erhöhung ihres Expressionsniveaus, was auf eine besondere Stellung der Funktion des hASCT2 im Tumormetabolom schliessen lässt (Fuchs & Bode, 2005).

Im Folgenden sind einige Malignome und Malignom-Zelllinien aufgeführt, in denen dem ASCT2 eine wichtige Rolle zugeschrieben wird.

hASCT2 im humanen Kolonkarzinom

Am humanen Kolonkarzinom der Zelllinien KM12C und WiDr konnte *in vitro* gezeigt werden, dass eine kompetitive Hemmung des durch den ASCT2 vermittelten Glutamintransportes das Wachstum der Tumorzelllinie inhibiert (Pawlik et al., 2000). Immunhistochemisch konnte bei Patienten mit kolorektalem

Adenokarzinom ein hohes hASCT2 Expressionsniveau mit aggressivem Wachstumsverhalten und einer schlechten Überlebensrate in Verbindung gebracht werden (Witte et al., 2002). Gleiches konnte für das Adenokarzinom der Prostata nachgewiesen werden (Li et al., 2003).

hASCT2 bei hirneigenen Tumoren

In Malignomzellen des Hirngewebes scheint der ASCT2 eine wichtige Rolle im Glutamin-abhängigen Wachstum zu spielen. Dies konnte an einer Astrozyten-Zelllinie der Ratte (Dolinska et al., 2003), aber auch an einer humanen Neuroblastom-Zelllinie nachgewiesen werden (Wasa et al., 2002), wobei ASCT2 für >90% der Glutaminaufnahme verantwortlich ist. Mittels RT-PCR Analysen konnten die unterschiedlichen Expressionsniveaus von Glutamattransportern bei normalem Hirngewebe und hirneigenen Tumoren dargestellt werden. Hierbei zeigte sich die ASCT2 Expression im anaplastischen Astrozytom (WHO Grad III), im Glioblastom (WHO Grad IV) und in Zellkulturen von Gliomen und Metastasen um das 2,5fache gegenüber der Kontrolle erhöht (Sidoryk et al., 2004).

ASCT2 im hepatozellulären Karzinom

In Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms (HCC) wird ASCT2 stark exprimiert, in normalen Hepatozyten jedoch gar nicht. Dies passt zu der beobachteten 10-20 fach verstärkten Glutaminaufnahme in HCC-Zellen gegenüber normalen Hepatozyten. Die Expression von ASCT2 ist ein gemeinsames Merkmal aller bisher untersuchten Malignom-Zelllinien der Leber und ist hier für die Glutaminaufnahme hauptsächlich verantwortlich (Bode et al., 2002). Eine kompetitive Hemmung der ASCT2 Funktion führte jedoch nur in einem Teil der untersuchten Zelllinien zu einem Wachstumsstopp (Bode et al., 1998). Anscheinend haben die noch besser differenzierten Zelllinien noch alternative Möglichkeiten der Glutaminaufnahme oder Synthese (Bode et al., 2002).

1.10 Fragestellung und Hypothese der Arbeit

Es wurde bereits beschrieben, dass der durch hASCT2 medierte Glutamintransport durch den epidermalen Wachstumsfaktor EGF über eine Signalkaskade aktiviert wird, die die Proteinkinase C und die mitogen aktivierte Proteinkinase MEK beinhaltet (Wolfgang et al., 2003). Die Aktivität der zellulären Aminosäureaufnahme wird weiterhin durch Insulin und den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor (IGF) gesteuert, welche den Aminosäuretransport über die PI3-Kinase stimuliert (Karlsen & Serck-Hanssen, 2002; Sims et al., 2000). Die der PI3-Kinase untergeordneten Elemente in der Signalkaskade sind unter anderem die Proteinkinase B (PKB) (Khan & Pessin, 2002; Lang & Cohen, 2001; Virkamaki et al., 1999), die Serum- und Glukokortikoid-abhängige Kinase (SGK)1 (Firestone et al., 2003) und ihre Isoformen SGK2 und SGK3 (Kobayashi et al., 1999b).

Mittlerweile sind eine Fülle von Proteinen bekannt, die durch die SGK moduliert werden. Hierunter sind Ionenkanäle (z.B NaC, ROMK, Kv1.3, TRPV5) und Transporter (z.B NHE3, Glut1, SGLT1). Auch für Aminosäuretransporter der SLC1-Glutamattransporterfamilie konnte eine Regulation durch die SGK beschrieben werden, so zum Beispiel für den SLC1A1 und den SLC1A3 (Boehmer et al., 2003; Schniepp et al., 2004) die in ihrer Struktur mit dem hASCT2 eng verwandt sind (Siehe Kapitel 1.3).

Obwohl in der Sequenz des hASCT2 keine SGK Konsensussequenz enthalten zu sein scheint, ist - wie bereits beschrieben - eine Modulation hierdurch nicht ausgeschlossen und aufgrund der engen phylogenetischen Verwandtschaft zu Transportern, die durch die SGK reguliert werden, durchaus wahrscheinlich. Weiterhin ist eine durch die SGK vermittelte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (z.B. forkhead transcription factor FKHL1, beta-catenin und nuclear factor kappaB) bekannt und untermauert die Bedeutung der SGK bei der Zellproliferation, der Apoptose und wahrscheinlich auch beim Wachstum von Malignomen (Lang et al., 2006b). Es konnte gezeigt werden, dass der SLC1A5 eine wichtige Rolle im

Tumormetabolom spielt und in vielen Malignomen verstärkt exprimiert wird (Fuchs & Bode, 2005) und dass der ASCT2 durch seine Interaktion mit mTOR anscheinend ebenfalls eine wichtige Rolle in der Steuerung von Zellproliferation und Apoptose spielt (Kapitel 4.2). Eine Interaktion der SGK mit dem hASCT2 ist im Hinblick auf diese Erkenntnisse durchaus wahrscheinlich.

Genauer formuliert stehen folgende Fragen zur Beantwortung:

1. Wird der Aminosäuretransporter hASCT2 durch die Serum- und Glukokortikoid-abhängigen Kinasen reguliert?
2. Wird der hASCT2 durch die Proteinkinase B, welche den SGK in Regulation und Wirkungsmechanismus sehr ähnlich ist, reguliert?
3. Welche Rolle spielen die Phosphorylierungssequenzen der SGK bezüglich einer Regulation?
4. Wie ändert sich die Kinetik des durch den hASCT2 vermittelten Aminosäuretransportes durch eine SGK vermittelte Regulation?
5. Beeinflusst die SGK die Oberflächenpräsenz von hASCT2 auf der Zellmembran?
6. Beeinflusst die Ubiquitinligase Nedd4-2 die hASCT2 Aktivität?

Experimentell wurden diese Fragetellungen mittels heterologer Expression des humanen Transporters und Kinasen in *Xenopus laevis* Oozyten durchgeführt. Der experimentelle Schwerpunkt lag dabei auf den Koexpressionsexperimenten und der Quantifizierung der Serin-Aufnahme in die Zellen mittels Isotopen-Flux Messungen.

2 Material und Methoden

2.1 Lösungen und Substanzen

Im Folgenden sind die zur Oozytenlagerung, Behandlung und Messung verwendeten Lösungen aufgelistet. Die Lösungen wurden jeweils als 10-fach konzentrierte Stammlösung hergestellt und gelagert, um Veränderungen der Lösung durch Abbauprozesse der verwendeten Substanzen zu minimieren. Zur Einstellung des pH-Wertes wurde NaOH beziehungsweise HCl verwendet. Die Kontrolle der Osmolarität erfolgte mit einem Osmometer (Vapor Pressure Osmometer, Vapro 5520, Wescor, Logan, USA). Vor jedem Versuch wurden neue Lösungen aus den Stammlösungen hergestellt und der pH- Wert und die Osmolarität kontrolliert.

2.1.1 OR-2

Die OR-2 Lösung ist eine Oozytenringerlösung und wurde für die Dekollagenisierung der gerade entnommenen Oozyten verwendet. Zur optimalen Kollagenasewirkung ist sie Ca^{2+} frei.

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	82,5
KCl	2,5
MgCl ₂	1
Tris-Hepes	5
pH-Wert	7,4

Tabelle 4: OR-2 Lösung, pH 7,4.

2.1.2 ND 96 mit Antibiotika

Die ND 96 Lösung (200mOsm) mit Zusatz von Antibiotika wurde zur Aufbewahrung der Oozyten verwendet. Gentamycin verhindert die mikrobielle Infektion der Zellen, Theophyllin hemmt die weitere Reifung (Wagner et al., 2000).

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	96
KCl	2
CaCl ₂	1,8
MgCl ₂	1
Tris-Hepes	5
Natriumpyruvat	2,5
Theophyllin	0,5
Gentamycin	50 [µg/l]
pH-Wert	7,4

Tabelle 5: ND 96 mit Antibiotika, pH 7,4.

2.1.3 Lösungen für die Messungen

Die für die Messung verwendeten Lösungen basieren auf der ND 96 Lösung als Grundlösung.

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	96
KCl	2
CaCl ₂	1,8
MgCl ₂	1
Tris-Hepes	5
pH-Wert	7,4

Tabelle 6: ND 96, pH 7,4.

Für einige Versuche musste während der Inkubation oder zur Messung Natrium entfernt werden. Hierbei wurde NaCl isoosmolar durch Cholin-Chlorid ersetzt.

2.2 Oozyten des afrikanischen Klauenfrosches als heterologes Expressionssystem

Die Eizellen des südafrikanischen Klauenfrosches „*Xenopus laevis*“ sind schon seit langem als Expressionssystem für heterologe RNA etabliert und bieten insbesondere für physiologische, entwicklungs- und molekularbiologische Arbeiten viele technische Vorteile (Dawid et al., 1985; Dawid & Sargent, 1988; Gurdon et al., 1971; Wagner et al., 2000).

Die Haltung der anspruchslosen, aquatisch lebenden Klauenfrösche im Labor ist unkompliziert, die Anschaffung vergleichsweise kostengünstig. Ebenso unkompliziert ist die Anästhesie und Entnahme der Eizellen. Durch den relativ großen Zelldurchmesser der Eizellen (ca. 1mm) wird die allgemeine Handhabung und die Injektion von cRNA erleichtert. Die Eizellen eignen sich zudem für verschiedenste Methoden zur Messung physiologischer Größen, so zum Beispiel elektrophysiologische Untersuchungen mittels mehrerer intrazellulärer Glaskapillaren und „Tracer flux“ Untersuchungen mit radioaktiv markierten Substraten.

2.3 Oozytenpräparation

Weibliche *Xenopus laevis* Frösche wurden in artgerechten Aquarien mit fließendem Wasser, Wasserfiltern und künstlicher Beleuchtung untergebracht. Zur Oozytenentnahme wurde ein *X. laevis* zunächst in einer 0,1%igen 3-Aminobenzoessäureethylester-Lösung als Anästhetikum innerhalb von 20 Minuten narkotisiert. Die Tiefe der Narkose wurde durch ein Ausbleiben des Schluckreflexes nach Reizung der Kinnpartie kontrolliert. Anschließend wurde der Frosch in Rückenlage auf ein mit Eis bedecktes Präparationstablett gelagert. Die Schleimschicht im Bereich des Hautschnittes wurde durch mehrmaliges trockenes Abtupfen entfernt, die Lederhaut im Bereich des Schnittes wurde mehrfach mit einem jodhaltigen Desinfektionsmittel gründlich desinfiziert. Mit sterilem Besteck wurde nun ein ca. 0,5-1cm langer Hautschnitt an der lateralen unteren Bauchdecke angelegt, im Anschluss erfolgte die stumpfe Präparation der darunter liegenden Muskelschicht. Nach Aufsuchen des Ovars erfolgte die scharfe Absetzung

desselben am Mesovar. Die gewonnenen Ovarlobuli wurden in Oozytenringerlösung OR-2 zwischengelagert.

Die Bauchdecke wurde im Anschluss schichtweise mit einer Muskel- und einer Hautnaht mit resorbierbarem Fadenmaterial verschlossen. Zum Abklingen der Narkose wurde der Frosch in ein nicht vollständig bedeckendes Wasserbad gelegt, um dem Ersticken vorzubeugen. Nach einigen Stunden konnten die Tiere ins Aquarium zurück gebracht werden. Es wurde jeweils nur ein Ovar entnommen, so dass jedes Tier zweimal operiert werden konnte. Das entnommene Ovar wurde nun manuell in kleinere, noch zusammenhängende Einheiten von ca. 10 Oozyten getrennt. Nicht oozytenhaltiges Bindegewebe wurde dabei entfernt.

Mittels einer Kollagenaselösung [2 mg/ml Kollagenase (Boehringer, Ingelheim, Deutschland) in kalziumfreier OR2] wurden die Oozyten unter ständiger Bewegung bei Raumtemperatur denudiert. Nach jeweils einer Stunde wurde die Kollagenaselösung gewechselt, um den Bindegewebsverdau zu optimieren. Der Fortschritt wurde unter einem Stereomikroskop kontrolliert. Wenn ein Großteil der Zellen vereinzelt und von blutgefäßhaltigem Bindegewebe befreit war, wurde die Kollagenasereaktion mittels mehrmaligem Spülen mit ND96-Lösung angehalten. Anschließend wurden die nun einzeln und defolikulierte vorliegenden Oozyten unter dem Binokular nach folgenden Kriterien manuell sortiert:

Zur Verwendung kamen nur Zellen,

1. bei denen die äußeren 3 Membranschichten durch die Kollagenasereaktion vollständig entfernt wurde und nur noch die innere „Vitellin“-Schicht verblieben ist (Dascal, 1987).
2. die sich im Stadium V oder VI befanden (Dumont, 1972).
3. die eine klare Trennung in Vegetal- und Animalpol aufwiesen.
4. die keine Aufhellung im Animalpol zeigten.

Die Aufbewahrung der Oozyten erfolgte bei 18°C in ND 96 mit Gentamycin und Theophyllin. Die erste cRNA-Injektion erfolgte am nächsten Tag.

2.4 cRNA-Injektion

Zur Injektion der Oozyten wurden Borsilikatglaskapillaren (Hilgenberg, Malsfeld) mit 1,2 mm Außendurchmesser mit einem Kapillarziehgerät (DMZ-Universal Puller, Fa. Zeitz, München) so gezogen, dass sie eine lange Spitze aufwiesen. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde mittels einer Pinzette die Spitze der Kapillare abgebrochen, so dass ein Lumen von ca. 10-20µm entstand. Die Kapillare wurde luftblasenfrei mit Parafinöl (Sigma, Deisendorf, Deutschland) gefüllt und in einen automatischen Mikroinjektor (World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) eingespannt, welcher an einen Mikromanipulator angebracht war. Die in DEPC-Wasser gelöste cRNA, welche bei -80°C gelagert wurde, wurde nun aufgetaut und in den Mikroinjektor eingesaugt.

Zur Injektion wurden die Oozyten in einer mit ND 96 gefüllten Petrischale mit einem darinliegendem Kunststoffgitter angeordnet, um ein Wegrutschen bei der Injektion zu verhindern. Unter Binokularkontrolle wurde nun die Oozytenmembran in einem Winkel von 45° mit der Injektionskapillare penetriert und pro Oocyte mittels eines Mikroinjektors jeweils 25nl der jeweiligen cRNA Lösung injiziert. Falls mehrere Proteine exprimiert werden sollten, so wurden die verschiedenen cRNA-Lösungen einzeln und im zeitlichen Abstand injiziert, um die Volumenbelastung gering zu halten. Nach der Injektion wurden die Oozyten in Petrischalen mit antibiotikahaltiger ND96- Lösung bei einer konstanten Temperatur von 16°C aufbewahrt. Das Medium wurde täglich gewechselt und avitale Oozyten wurden entfernt.

Am ersten Tag wurden die Kinasen-cRNA, am darauffolgenden Tag die Transporter cRNA injiziert. Die Messungen wurden am 3.Tag nach Transporteinjektion durchgeführt. Tabelle 7 fasst die verwendete cRNA sowie deren injizierte Konzentrationen und Inkubationszeiten zusammen.

Protein	[cRNA] (ng/μl)	Inkubationszeit [d]	injizierte Stoffmenge
hASCT2	300	3	7,5 ng
ASCT2-HA	300	3	7,5 ng
S422D ^D SGK1	300	4	7,5 ng
K127N ^N SGK1	300	4	7,5 ng
S356D ^D SGK2	300	4	7,5 ng
S419D ^D SGK3	300	4	7,5 ng
K191N ^N SGK3	300	4	7,5 ng
T308A ^A S473A ^A PKB	300	4	7,5 ng
hNedd4-2	600	4	15 ng

Tabelle 7: Die in dieser Arbeit verwendete cRNA und deren injizierten Konzentrationen.

Die Oozyten wurden jeweils mit 25 nl cRNA injiziert. Falls mehrere Proteine exprimiert wurden, wurden die entsprechenden cRNAs hintereinander injiziert.

2.5 cRNA-Synthese

Die für die Injektion in *Xenopus laevis* Oozyten verwendete cRNA wurde mittels kommerziell erhältlichen Kits (MESSAGE MACHINE™, Ambion, Austin, USA) gemäß den Vorschriften des Herstellers synthetisiert. Relevante Daten der benutzten Konstrukte sind in Tabelle 8 aufgeführt.

cRNA	Vektor	Promotor	Enzym Linearisierung
SGK1(S422D)	pGemHeJuel	T7	Stu I
SGK1(K127N)	pGemHeJuel	T7	Stu I
SGK2	pGemHeJuel	T7	Stu I
SGK3(S419D)	pGemHeJuel	T7	Stu I
SGK3(K191N)	pGemHeJuel	T7	Stu I
PKB(T308A,S473A)	pGemHeJuel	T7	Sal I
hNdd4-2	pGemHeJuel	T7	Hind III

Tabelle 8: relevante molekularbiologische Daten zur Synthese und Injektion der in dieser Arbeit verwendeten cRNA.

2.6 Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese wurde zum Austausch von einzelnen Aminosäuren im Protein verwendet. Benutzt wurde ein kommerzieller Kit (QuikChange™ Site-directed Mutagenesis Kit, Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) nach Herstellerangaben. In Tabelle 9 sind die *sense*- und *antisense*- Primer aufgelistet, die für die Mutagenese verwendet wurden.

Das Prinzip der zielgerichteten Mutagenese besteht in der Einführung von einzelnen oder gleichzeitig mehreren Mutationen, Deletionen oder Insertionen in ein Plasmid mittels PCR (Wang & Malcolm, 1999). Dafür werden 2 Primer benötigt, die zueinander und zu der zu mutierenden Stelle im Plasmid komplementär sind und in ihrer Mitte die Mutation enthalten. Der jeweils neu synthetisierte Strang enthält damit die Mutation. Nach einigen Zyklen entstehen praktisch nur noch Plasmide, bei denen beide Stränge mutiert sind. Um unerwünschte Wildtyp-Plasmide zu entfernen, werden diese mit der Restriktions-Endonuklease *Dpn I* verdaut. *Dpn I* schneidet selektiv methylierte und damit von Bakterien generierte DNA.

Die so entstandenen Konstrukte wurden sequenziert um das Vorhandensein der gewünschten Mutation zu verifizieren

Protein	Sense	Antisense
S356D _{SGK2}	5`gcattcctgggatttgattatgcgcc agagg3`	5`cctctggcgcataatcaaatcccag gaatgc3`
S419D _{SGK3}	5`gatgcattcgttggttcgattaatgc acctcctcag3`	5`ctgaaggagggtgcataatcgaaac caacgaatgcatc3`
K191N _{SGK3}	5`atgctgtcaatgtgttacag3`	5`ctgtaacacattgacagcat3`
SLCT1A5-HA	5`ggccgtggtggcctacgacgtacc agattacgctggcgtggcgctgg3`	5`ccagcgccacgccagcgtaatctg gtacgtcgtaggccaccacggcc3`

Tabelle 9: Die Sequenzen der zur zielgerichteten Mutagenese verwendeten Primer.

Funktionelle Messungen

Zur Quantifizierung von Stofftransporten über die Membran lebender Zellen wurden zwei in der membranphysiologischen Forschung gängige Methoden angewendet. Die Aufnahme radioaktiv markierten Substrates in die Zelle ermöglicht die direkte Quantifizierung des Stofftransports über die Membran. Dazu werden Oozyten mit radioaktiv markiertem Substrat inkubiert und anschließend die intrazelluläre Akkumulation dieses Substrates in Abhängigkeit der Zeit gemessen.

2.6.1 Uptake / „Tracer flux“ - Messungen

Das Prinzip der Flüssigkeitsszintillation

Bei der Flüssigkeitsszintillation können die Aktivitäten und - nach erfolgter Umrechnung - die Menge eines Radionuklids, beziehungsweise eines mit einem Radionuklid markierten Proteins in einer Probe bestimmt werden. Die zu messende Probe wird hierbei mit einem Lösungsmittel und einer Szintillationsflüssigkeit gemischt. In der Szintillationsflüssigkeit können aus der Energie des Betastrahlers Photonen erzeugt werden, welche mittels eines Photomultipliers quantitativ bestimmt werden können.

Da das in dieser Arbeit verwendete Radionuklid ^{14}C Betastrahlung mit nur geringer Energie abgibt und die verwendete Menge des Radionuklids möglichst gering gehalten werden soll, eignet sich das Prinzip der Flüssigkeitsszintillation, bei der die zu messende Probe mittels eines Lösungsmittels vollständig in der Szintillationsflüssigkeit gelöst ist, so dass alle emittierten Beta-Elektronen nach Erzeugung von Photonen vom Szintillationszähler erfasst werden können. Der flüssige Szintillator hat die Aufgabe, die Anregungsenergie der Beta-Elektronen zu übernehmen und diese in Lichtquanten umzuwandeln, welche durch die Katode des Photomultipliers detektiert werden können. Die verbreiteten und in dieser Arbeit verwendeten Szintillationsflüssigkeiten (Ultima Gold, Packard, Groningen, Niederlande) sind Gemische („Cocktails“) aus

verschiedenen Szintillatoren (PBD, PPO, BBOT, POPOP), um die Eigenschaften der Einzelsubstanzen zu optimieren.

Die hierbei erzeugte Lichtemission hat einen spezifischen Energiebereich, welcher für das radioaktive Isotop charakteristisch ist. Mittels Detektion der Anzahl der Lichtereignisse dieses typischen Spektrums lässt sich das Isotop quantitativ bestimmen.

Wenn ein Teil des Fluoreszenzlichtes aufgrund von Wechselwirkungen innerhalb des Messansatzes zu niedrigeren Spektren verschoben wird und somit nicht durch den Photomultiplier erfasst werden kann, entsteht ein Messfehler, der *Quench* genannt wird. Dies kann auf einer Einfärbung der Probe beruhen, wobei Photonen bereits in der Probe absorbiert werden (optischer *Quench*) oder darauf, dass ein Teil der Energie durch die angeregten Lösungsmittelmoleküle in Wärme umgewandelt und somit nicht auf die das Photon erzeugende Szintillatorflüssigkeit übertragen wird (chemischer *Quench*).

Daher ist es bei der Messung mit flüssigen Szintillatoren notwendig, den Wirkungsgrad der Messung zu kontrollieren. Bei der Wirkungsgradbestimmung mit dem „internen Standard“ wird eine genau bekannte Menge und Aktivität des Nuklides gemessen und die Zählrate bestimmt.

Mittels Division der bekannten Aktivität durch die Zählrate erhält man den Wirkungsgrad, welcher auf alle Messungen übertragen wird um die reale Aktivität des zu bestimmenden Nuklids zu erhalten.

Bestimmung der Aufnahmeaktivität des hASCT2

Mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillationsmessung kann die in Oozyten aufgenommene Menge von mit ^{14}C radioaktiv markiertem L-Serin direkt quantifiziert werden.

Verwendet wurde L- ^{14}C -Serin mit einer spezifischen Aktivität von 166 mCi/mmol, beziehungsweise 6,16 Bq/mmol (PerkinElmer, Deutschland).

Die Aufnahmeaktivität wurde 3 Tage nach Injektion der Oozyten mit hASCT2-cRNA bestimmt. Pro Gruppe wurden jeweils 5-10 einzelne Oozyten in 0,5ml ND 96

mit 0,5µCi L-[¹⁴C]Serin und 100µM „kaltem“ L-Serin für 30min inkubiert. (Für die kinetische Analyse wurden die dort aufgeführten Serin-Konzentrationen verwendet. Für die Messung der Aktivität in Abwesenheit von Natrium wurde isoosmolare ND 96 Lösung mit Cholinchlorid verwendet).

Das Gemisch aus „heißem“ und „kaltem“ L-Serin dient hierbei zur Minimierung des verwendeten, radioaktiven Substrates.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Serin Aufnahme mittels Absaugen der Uptakelösung und mittels fünfmaligem Spülen mit jeweils 3ml eiskalter ND 96 beendet. Die Oozyten wurden anschließend einzeln in Szintillationsröhrchen überführt und durch Zugabe von jeweils 200µl 10% SDS Lösung lysiert. Hierbei wurden die Zellen so lange lysiert, bis keine Fragmente mehr erkennbar waren und das Gemisch homogen war. Nach Zugabe von 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, Packard, Groningen, Niederlande) und gründlicher Mischung wurde die durch die Oozyten aufgenommene Radioaktivität in einem Szintillationszähler (Wallac, Freiburg) gemessen.

Die Aufnahmeaktivität wurde in L-Serin [pmol] pro Oozyte pro Minute umgerechnet.

2.6.2 Quantifizierung der Oberflächenexpression durch Chemolumineszenz

Zur Quantifizierung der Oberflächenexpression des hASCT2 auf den verwendeten *Xenopus laevis* Oozyten wurde eine extrazelluläre Schleife des hASCT2 Transporters durch eine Hämagglutinin-Sequenz markiert. Dazu wurde in *X. laevis* Oozyten zunächst jeweils 7,5ng ^{S422D}SGK1 oder ^{S419D}SGK3 cRNA injiziert. Am darauffolgenden Tag wurde 7,5ng cRNA des mit humanem Hämagglutinin (HA) markierten SLC1A5 injiziert. Am dritten Tag nach der Transporterinjektion wurden die Oozyten dann zunächst mit 1µg/ml Ratten- anti- Hämagglutinin- Antikörper inkubiert (Klon 3F10, Boehringer, Deutschland) und nach intensivem Waschen anschliessend mit 2 µg/ml Peroxidase-konjugiertem, anti- Ratten- IgG- Antikörper der Ziege (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) inkubiert.

Die Oozyten wurden nun erneut gewaschen und einzeln in jeweils ein Loch einer 96-Loch Platte gegeben und jeweils 20µl Substratlösung (SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate, Pierce, Rockford, USA) hinzugegeben. Diese Substratlösung, welche Luminol als Spaltprodukt enthält, wird daraufhin von der dem 2. Antikörper angehängten Peroxidase katalytisch umgesetzt, wobei Licht emittiert wird.

Die entstehende Lichtmenge wurde mittels eines Mikroplattenluminometers bestimmt und über die Zeit von 1s integriert. Die emittierte Lichtmenge ist dabei direkt proportional zur Anzahl der mit HA markierten Transporterproteine auf der Oberflächenmembran der Oozyten.

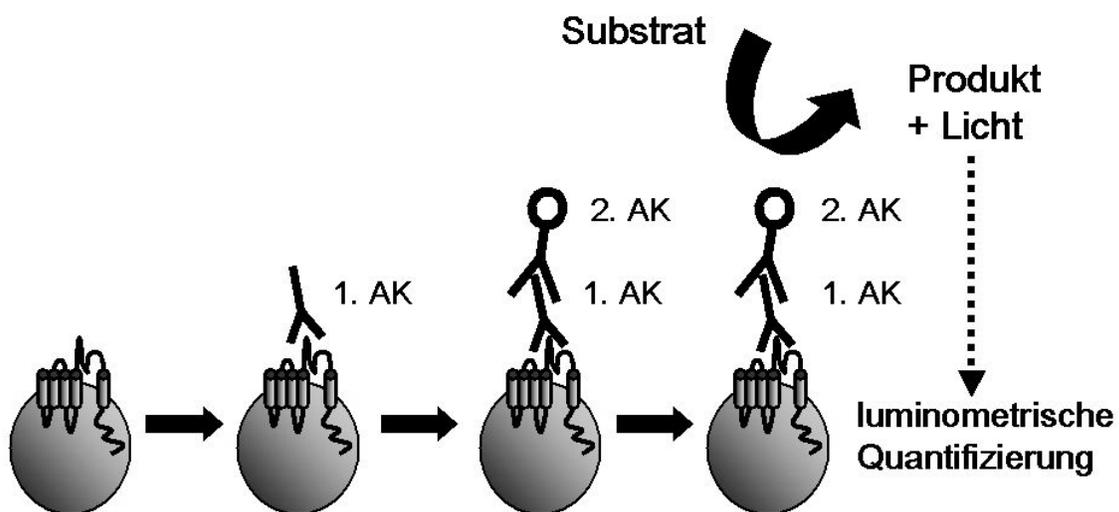


Abbildung 4: Das Prinzip der Chemolumineszenz: Durch die Insertion einer Hämagglutininsequenz in die extrazellulären Anteile eines Membranproteins kann deren Oberflächenexpression durch Luminometrie bestimmt werden.

2.7 Chemikaliennachweis

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland).

2.8 Auswertung und Statistik

Die gezeigten Daten sind dargestellt als das arithmetische Mittel \pm den Standardfehler (SEM) der Messergebnisse. „n“ bezeichnet die Anzahl der einzeln untersuchten Oozyten. Bei dem Vergleich von Mittelwerten zweier Gruppen wurden die Werte auf Normalverteilung geprüft und mit dem ungepaarten zweiseitigen Student t-Test auf Signifikanz überprüft. Nur Werte mit einem p-Wert unter 0,05 wurden als signifikant angesehen und mit „*“ gekennzeichnet. Wurden mehr als eine Gruppe mit der Kontrollgruppe verglichen, wurden diese mittels ANOVA auf signifikante Unterschiede getestet.

2.9 Verzeichnis der Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cRNA	copy RNA
DEPC -Wasser	hochreines Wasser mit Zusatz von Diethylpyrocarbonat (DEPC) als RNase Inaktivator
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl) Ethansulfonsäure
IGF	insulinartiger Wachstumsfaktor
MEK	mitogen aktivierte Proteinkinase

mTOR	mammalian Target-of-Rapamycin
ND96	Oozytenstandardlösung mit 96 mM Natriumchlorid
Nedd4-2	neuronal precursor cells expressed developmentally downregulated, Ubiquitinligase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
SGK	Serum- und Glukokortikoid-abhängige Kinase
SLC1A5	Genname des hASCT2

3 Versuche und Ergebnisse

Wie bereits oben beschrieben, wurde gezeigt, dass der Transporter hASCT2 durch Phosphorylierung aktiviert wird (Wolfgang et al., 2003). Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) stimuliert den Transporter über eine Signalkaskade, die auch die Proteinkinase C und die mitogen aktivierte Proteinkinase MEK involviert (Wolfgang et al., 2003). Weiterhin konnte für ein Mitglied der strukturell eng verwandten Glutamat-Transporterfamilie, den Transporter SLC1A1/EAAC1, gezeigt werden, dass EGF die Aktivität der zellulären Aminosäureaufnahme über eine Signalkaskade steigert, welche die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3) beinhaltet (Karlsen & Serck-Hanssen, 2002; Sims et al., 2000). Als Elemente der Signalkaskaden, welche der PI3 Kinase untergeordnet sind, konnten unter anderem die Proteinkinase B (PKB) (Khan & Pessin, 2002; Lang & Cohen, 2001; Virkamaki et al., 1999), die Serum- und Glukokortikoid-abhängige Kinase (SGK) 1 (Firestone et al., 2003) und ihre Isoformen 2 und 3 (Kobayashi et al., 1999b) identifiziert werden.

Um herauszufinden, ob der hASCT2 durch die Serum- und Glukokortikoid-abhängigen Kinasen (SGKs) oder die Proteinkinase B (PKB), welche unter Kontrolle der PI3-Kinase stehen, reguliert wird, wurden folgende Versuche an *Xenopus laevis* Oozyten durchgeführt.

Hierfür wurde hASCT2 in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die Aufnahme von L-[¹⁴C] Serin mittels Flux Messung bestimmt.

3.1 Die Aufnahme von L-[¹⁴C] Serin wird durch hASCT2 vermittelt

Die heterologe Expression von hASCT2 durch Injektion von cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten führt nach drei Tagen Inkubation zu einer starken Aufnahme von L-[¹⁴C] Serin in die Oozyten.

Um eine endogene Leitfähigkeit der *Xenopus laevis* Oozyten für L-[¹⁴C] Serin und die durch die Injektion möglicherweise entstehenden Leck-Leitfähigkeit zu erfassen, wurde eine Kontrollgruppe gleicher Anzahl gemessen.

Als Kontrollgruppe wurde eine Serie von Oozyten mit dem gleichen Volumen DEPC Wasser injiziert. Die mit hASCT2 cRNA injizierten Oozyten zeigten hierbei eine ungefähr 4fach höhere L-[¹⁴C] Serin Aufnahme ($5,48 \pm 0,33$ pmol/min/Oozyte; n = 26) als die mit DEPC Wasser injizierten Zellen der Kontrollgruppe ($1,34 \pm 0,20$ pmol/min/Oozyte; n = 25). Siehe Abbildung 5.

3.2 Der durch hASCT2 vermittelte Transport ist Na⁺ abhängig

Im natriumfreien Medium, in welchem Natrium in isomolarer Menge durch Cholin-Chlorid ersetzt wurde, kam es zu einer signifikanten Abnahme der L-[¹⁴C] Serin Aufnahme ($2,36 \pm 0,38$ pmol/min/Oozyte; n = 26). Dies deckt sich mit dem Modell des Transportmechanismus des hASCT2, welches bereits oben ausführlich erläutert wurde und mit den bereits gewonnenen Erkenntnissen, dass der Aminosäuretransport durch den hASCT2 von einem Natriumgradienten abhängig ist. Siehe Abbildung 5.

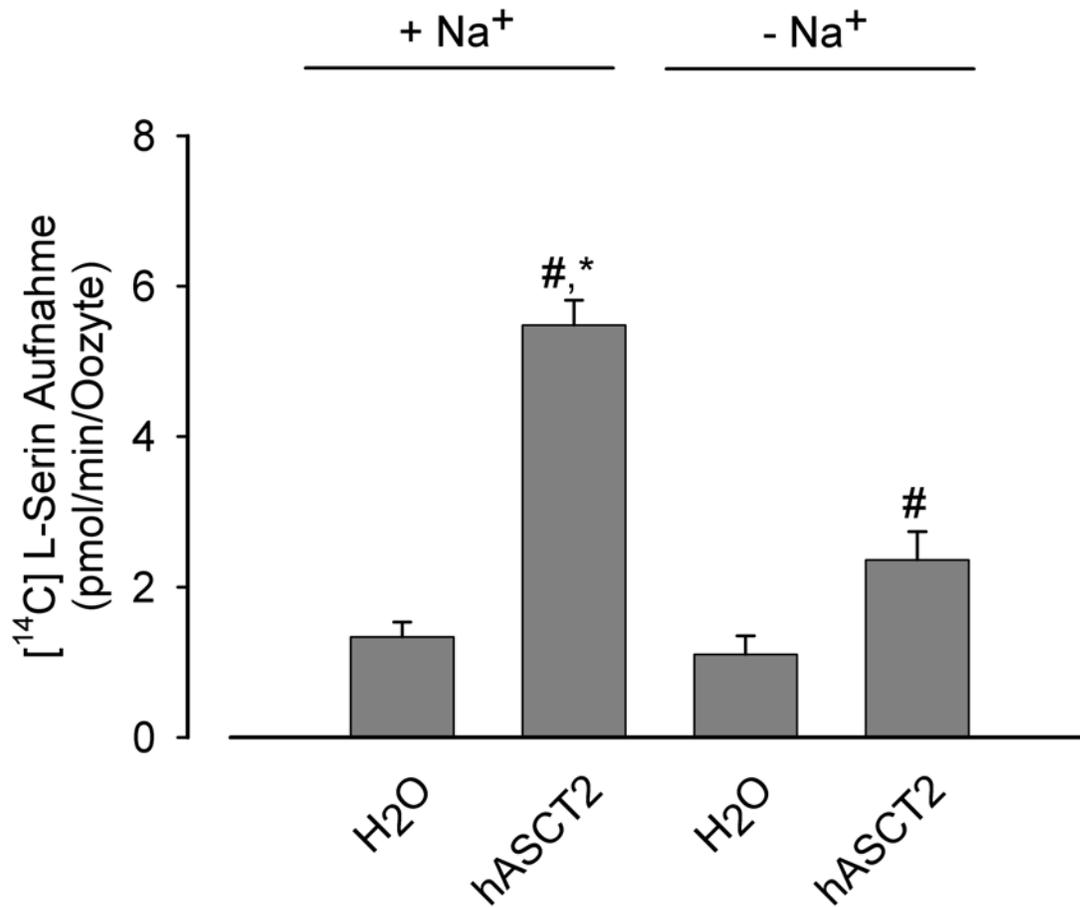


Abbildung 5: L-Serin Transport durch hASCT2. *X. laevis* Oozyten wurden mit ASCT2 cRNA oder mit DEPC Wasser (Kontrollgruppe) injiziert. Drei Tage nach der cRNA Injektion wurde die Aufnahme von ¹⁴C markiertem Serin als Maß der ASCT2 Aktivität gemessen. Balkendiagramm mit dem arithmetischen Mittel ± Standardabweichung der L-[¹⁴C] Serin Aufnahme. # steht für den statistisch signifikanten Unterschied zu lediglich mit Wasser injizierten *Xenopus* Oozyten. * steht für den statistisch signifikanten Unterschied zur L-[¹⁴C] Serin Aufnahme im natriumfreien Medium in *Xenopus* Oozyten, die ASCT2 exprimieren.

3.3 Transportkinetik des ASCT2 in Abhängigkeit des Substratangebotes

Zur Bestimmung der maximalen Transportrate des hASCT2 wurde hASCT2 cRNA in *Xenopus* Oozyten injiziert, nach drei Tagen Inkubation wurden die Zellen 30 Minuten in Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen von L-Serin und L-[¹⁴C] Serin inkubiert, bevor die biochemische Reaktion durch mehrmaliges Spülen in eiskalter ND96 Lösung angehalten wurde. Anschließend wurde mittels Flux Messung die Menge des in die Zelle aufgenommenen L-[¹⁴C] Serin gemessen und auf die Gesamtaufnahme an Serin umgerechnet.

Zur kinetischen Analyse wurden Inkubationslösungen mit 3, 10, 30, 100 und 1000µM L-Serin und entsprechend 0,015, 0,05, 0,15, 0,5 und 5 µCi L-[¹⁴C] Serin verwendet.

Hiebei zeigte sich die L-[¹⁴C]Serin-Aufnahme durch hASCT2/SLC1A5 konzentrationsabhängig und sättigbar.

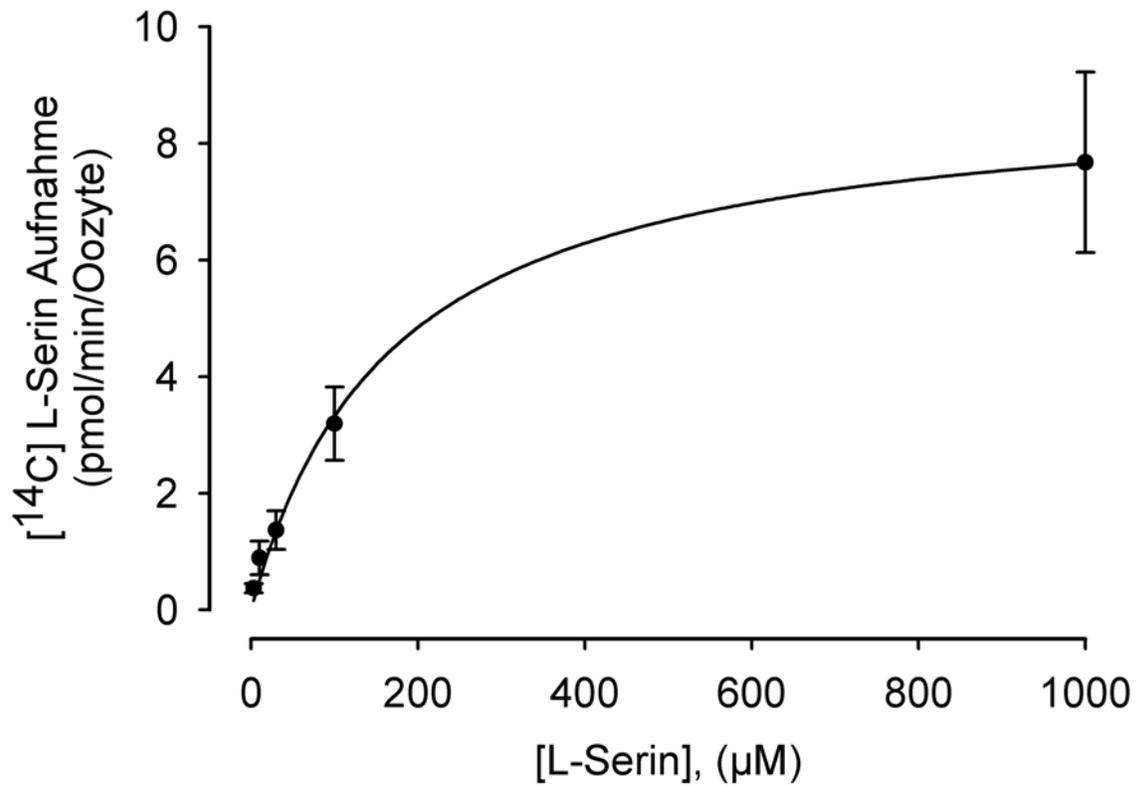


Abbildung 6: Transportkinetik des hASCT2. Diagramm der L- $[^{14}\text{C}]$ Serin - Aufnahme bei den angegebenen Konzentrationen an L-Serin in der Inkubationslösung. Arithmetisches Mittel \pm Standardfehler, $n = 5$.

3.4 Die Regulation der L-[¹⁴C]Serin-Aufnahme durch hASCT2 durch die SGK Isoformen 1-3 und PKB

Die heterologe Expression des hASCT2 Transporters in *Xenopus laevis* Oozyten zeigte eine für den Transporter typische Aufnahme von L-[¹⁴C] Serin, welche bei nur mit DEPC Wasser injizierten Zellen nicht nachweisbar war. Die gleichzeitige Expression der konstitutiv aktiven SGK 2 Mutante ^{S356D}SGK2 hatte keinen Effekt auf die L-[¹⁴C]Serin-Aufnahme (Abbildung 7).

Im Gegensatz dazu führte die Koexpression von hASCT2 und der konstitutiv aktiven SGK1 Mutante ^{S422D}SGK1 zu einer signifikanten Aktivierung der L-[¹⁴C]Serin -Aufnahme ($145,9 \pm 9,0$ % der Kontrollgruppe; n = 40). Die Koexpression von hASCT2 und der konstitutiv aktiven SGK3 Mutante ^{S419D}SGK3 führte ebenfalls zu einer signifikanten Aktivierung ($155,8 \pm 7,2$ % der Kontrollgruppe; n = 50). (siehe Abbildung 8).

Die konstitutiv aktive Mutante der Proteinkinase B ^{T308DS473D}PKB, welche im katalytischen Zentrum eine zu ca. 60%ige Homologie zu den SGK zeigt und die gleiche Konsensus-Sequenz (Arg-Xxx-Arg-Xxx-Xxx-Ser/Thr) führte ebenfalls zu einer Steigerung des durch hASCT2 vermittelten Serin Transportes ($137,8 \pm 4,8$ % der Kontrollgruppe; n = 46). (siehe Abbildung 8).

Um eine alleinige Stimulation endogener Aminosäuretransporter mit Affinität für Serin auszuschließen, wurden auch Messungen an Oozyten durchgeführt, die nur mit cRNA der Kinasen sowie einem der hASCT2 cRNA der Vergleichsgruppe entsprechenden Volumenäquivalent an DEPC Wasser injiziert wurden, um Volumeneffekte zu neutralisieren. Dabei zeigte sich keine signifikante Erhöhung der Menge an aufgenommenem L-[¹⁴C]Serin in die Zellen gegenüber den nur mit DEPC Wasser injizierten Zellen (siehe Abbildung 9).

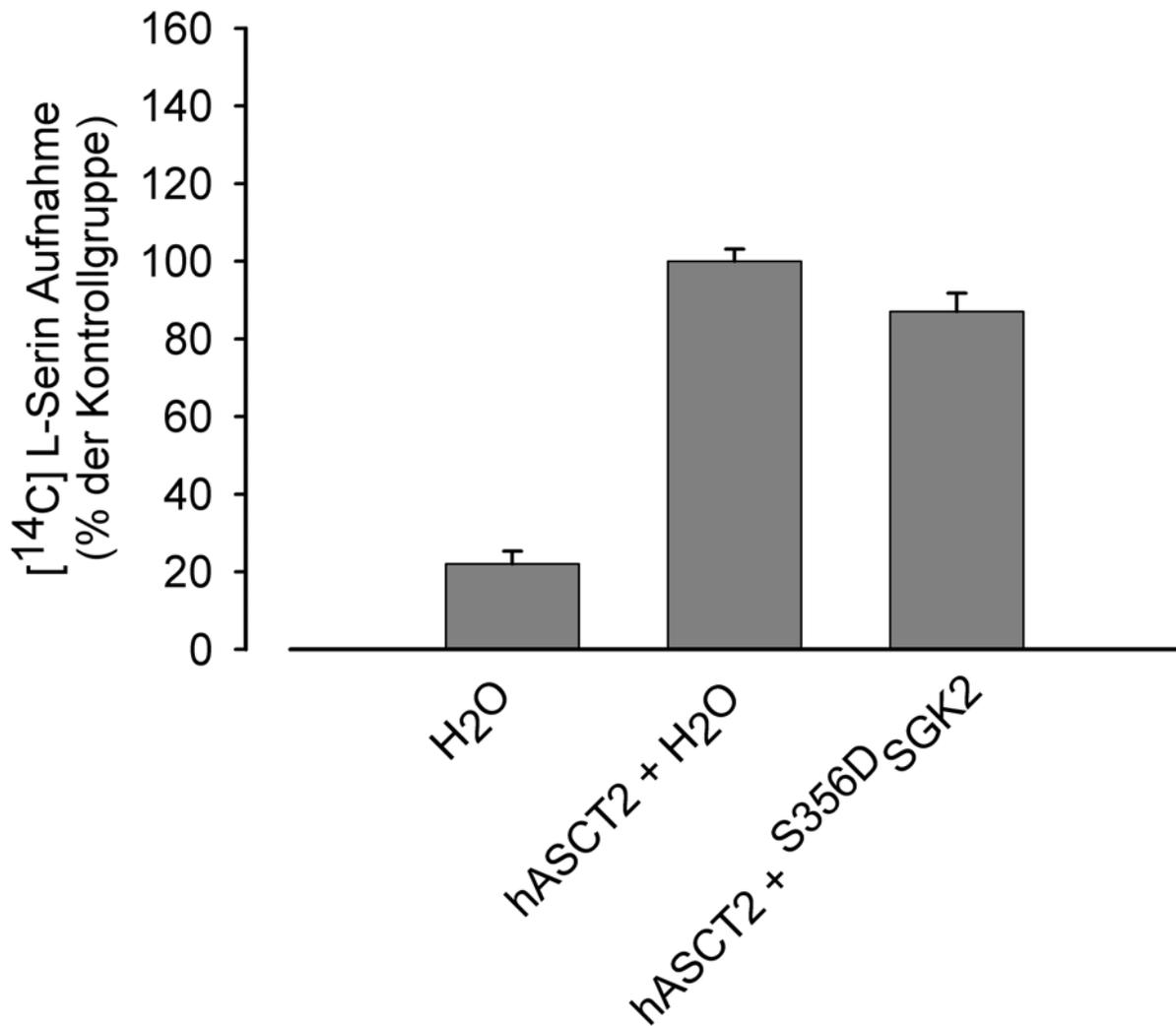


Abbildung 7: Einfluss der konstitutiv aktiven Mutante ^{S356D}SGK2 auf hASCT2 induzierte Serin Aufnahme. In *Xenopus laevis* Oozyten wurde zunächst cRNA des hASCT2 injiziert, danach cRNA der konstitutiv aktiven Mutante ^{S356D}SGK2. Als Kontrollgruppe dienten mit DEPC Wasser injizierte Oozyten. Drei Tage nach der Injektion wurden Flux Messungen durchgeführt. Gemessen wurden die Aktivität des aufgenommenen, radioaktiv markierten L-[¹⁴C]Serin. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen hASCT2 vs. hASCT2 + ^{S356D}SGK2. Balkendiagramm mit auf den Mittelwert der hASCT2 normierten L-[¹⁴C]Serin -Aufnahme. Arithmetisches Mittel ± Standardfehler.

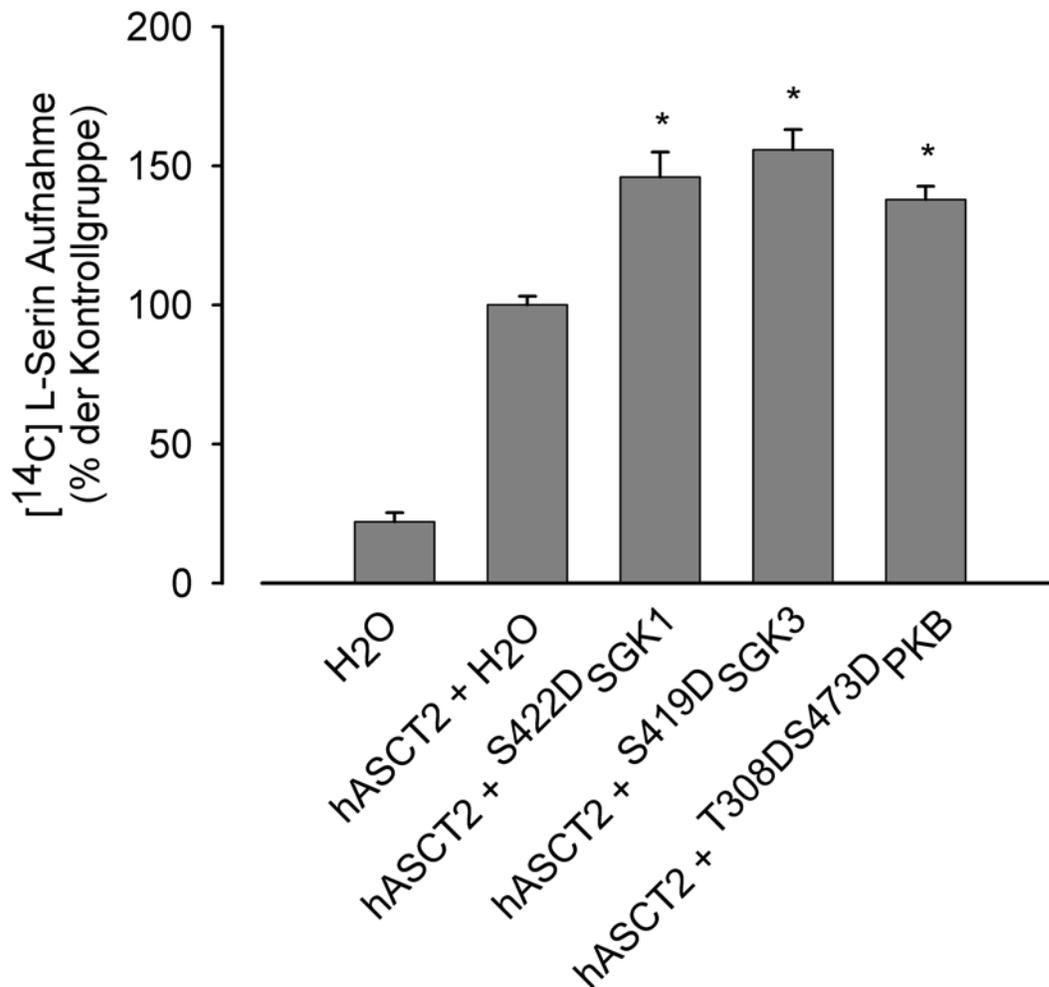


Abbildung 8: Einfluss der konstitutiv aktiven Mutanten ^{S422D}SGK1, ^{S419D}SGK3 und ^{T308DS473D}PKB auf die hASCT2 induzierte L-[¹⁴C]Serin - Aufnahme.

In *Xenopus laevis* Oozyten wurde cRNA des hASCT2 und DEPC Wasser bzw. cRNA des hASCT2 und cRNA der konstitutiv aktiven Mutanten ^{S422D}SGK1, ^{S419D}SGK3 oder ^{T308DS473D}PKB injiziert. Nach 3 Tagen wurden Flux Messungen durchgeführt. Gemessen wurden die Aktivität des aufgenommenen, radioaktiv markierten L-[¹⁴C]Serin. Die Koinjektion von hASCT2 + ^{S422D}SGK1, ^{S419D}SGK3 oder ^{T308DS473D}PKB bewirkte eine signifikante Aktivierung der L-[¹⁴C]Serin -Aufnahme. Balkendiagramm mit auf den Mittelwert der hASCT2 - Gruppe normierte maximale L-[¹⁴C]Serin -Aufnahme. Arithmetisches Mittel ± Standardfehler, n = 40-50. * indiziert signifikante Unterschiede zur hASCT2 - Gruppe.

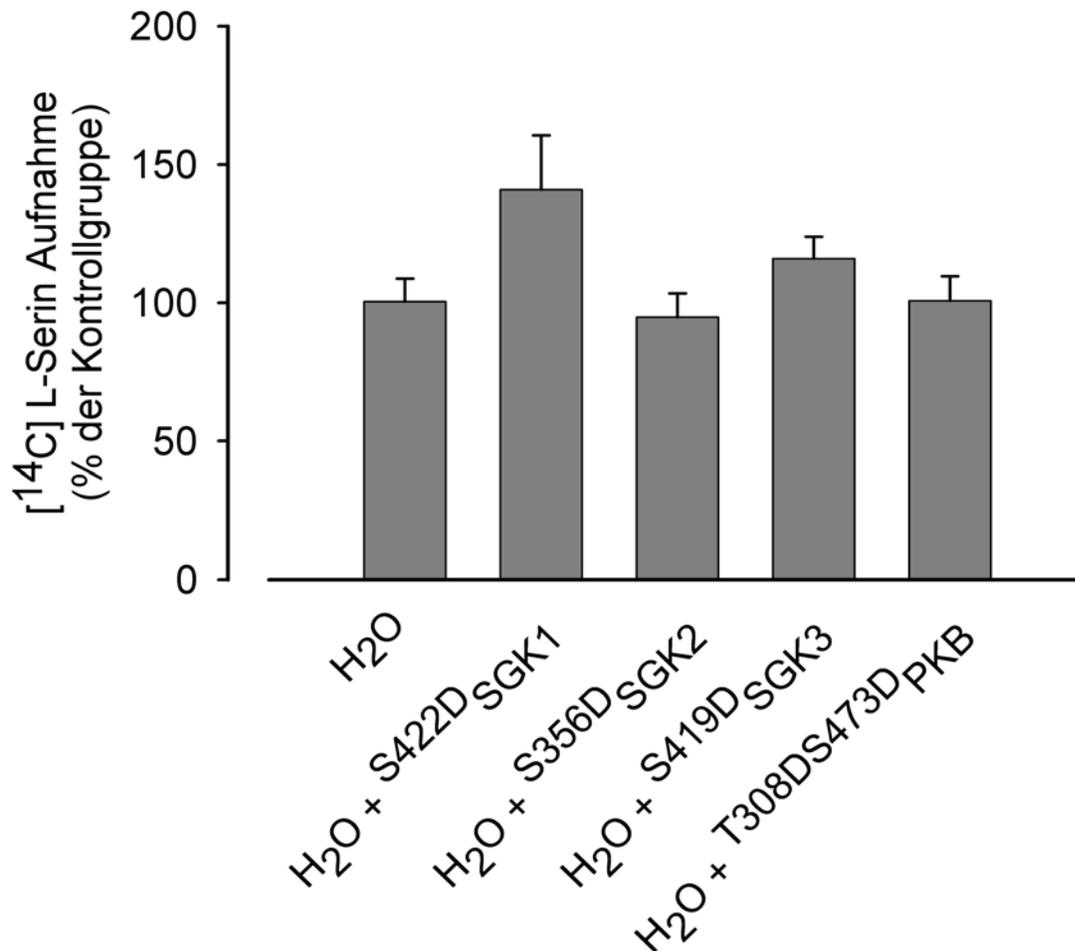


Abbildung 9: SGK1, SGK3 und PKB beeinflussen nicht die endogene Leitfähigkeit für L-Serin.

In *Xenopus laevis* Oozyten wurde DEPC Wasser und ASCT2 cRNA oder DEPC Wasser und cRNA der konstitutiv aktiven Mutanten ^{S422D}SGK1, ^{S356D}SGK2, ^{S419D}SGK3 oder ^{T308DS473D}PKB injiziert. Nach 3 Tagen wurden Flux Messungen durchgeführt. Gemessen wurden die Aktivität des aufgenommenen, radioaktiv markierten L-[¹⁴C]Serin. Die alleinige Kinasenexpression ohne gleichzeitige Expression von hASCT2 bewirkt keine signifikante Aktivierung der Aufnahmekapazität von L-[¹⁴C]Serin im Vergleich zu Oozyten, die nur mit DEPC Wasser injiziert wurden. Balkendiagramm mit auf den Mittelwert der hASCT2 Gruppe normierte maximale L-[¹⁴C]Serin -Aufnahme. Arithmetisches Mittel ± Standardfehler, n = 19-21.

3.5 Der Effekt von konstitutiv inaktiven SGK- und PKB- Mutanten auf die L- [¹⁴C] Serin Aufnahme

Wie in Kapitel 1.5.6. bereits beschrieben, phosphorylieren die Proteinkinasen SGK 1-3 wie auch die PKB die Aminosäuren Serin und Threonin, wenn diese innerhalb der SGK Phosphorylierungsstelle Arg-Xaa-Arg-Xaa-Xaa-Ser/Thr liegen. Die Aminosäuresequenz des ASCT2 weist keine dieser Konsensussequenzen auf (siehe Kapitel 1.4.3).

Um zu untersuchen, ob die Regulation der L-[¹⁴C]Serin-Aufnahme durch hASCT2/SLC1A5 durch die Serum- und Glukokortikoid-abhängigen Kinasen SGK 1 und 3 und die Proteinkinase B durch eine Phosphorylierung bewirkt wird, wurden katalytisch inaktive Mutanten der Kinasen hergestellt (^{K127N}SGK1, ^{K191N}SGK3 und ^{T308AS473A}PKB), bei denen die oben genannten Phosphorylierungsstellen inaktiviert sind.

In *Xenopus laevis* Oozyten wurde cRNA des hASCT2 alleine bzw. cRNA des hASCT2 und cRNA der konstitutiv inaktiven Mutanten ^{K127N}SGK1, ^{K191N}SGK3 oder ^{T308AS473A}PKB injiziert. Nach 3 Tagen wurden Flux Messungen durchgeführt.

Gemessen wurden die Aktivität des aufgenommenen, radioaktiv markierten L- [¹⁴C]Serin.

Es zeigte sich die bereits oben beschriebene Aufnahme von L-[¹⁴C]Serin in den mit cRNA des hASCT2 injizierten Oozyten im Vergleich zu der nur mit DEPC Wasser injizierten Oozyten. Weiterhin zeigte sich, dass die konstitutiv inaktiven Mutanten ^{K127N}SGK1, ^{K191N}SGK3 oder ^{T308AS473A}PKB zu keiner signifikanten Modulation der L- [¹⁴C]Serin Aufnahme führen (^{K127N}SGK1 exprimierende Oozyten: 100,4 ± 6,6 % der Kontrollgruppe, n = 23; ^{K191N}SGK3 exprimierende Oozyten: 88,9 ± 10,3 % der Kontrollgruppe, n = 9; ^{T308AS473A}PKB exprimierende Oozyten: 106,1 ± 5,3 % der Kontrollgruppe, n = 50). Dies indiziert, dass die katalytische Funktion der Phosphorylierungssequenzen der Kinasen für die Auf-Regulation der hASCT2 vermittelten Serin Aufnahme notwendig ist und damit die Regulation der hASCT2 Aktivität an Phosphorylierung gebunden ist.

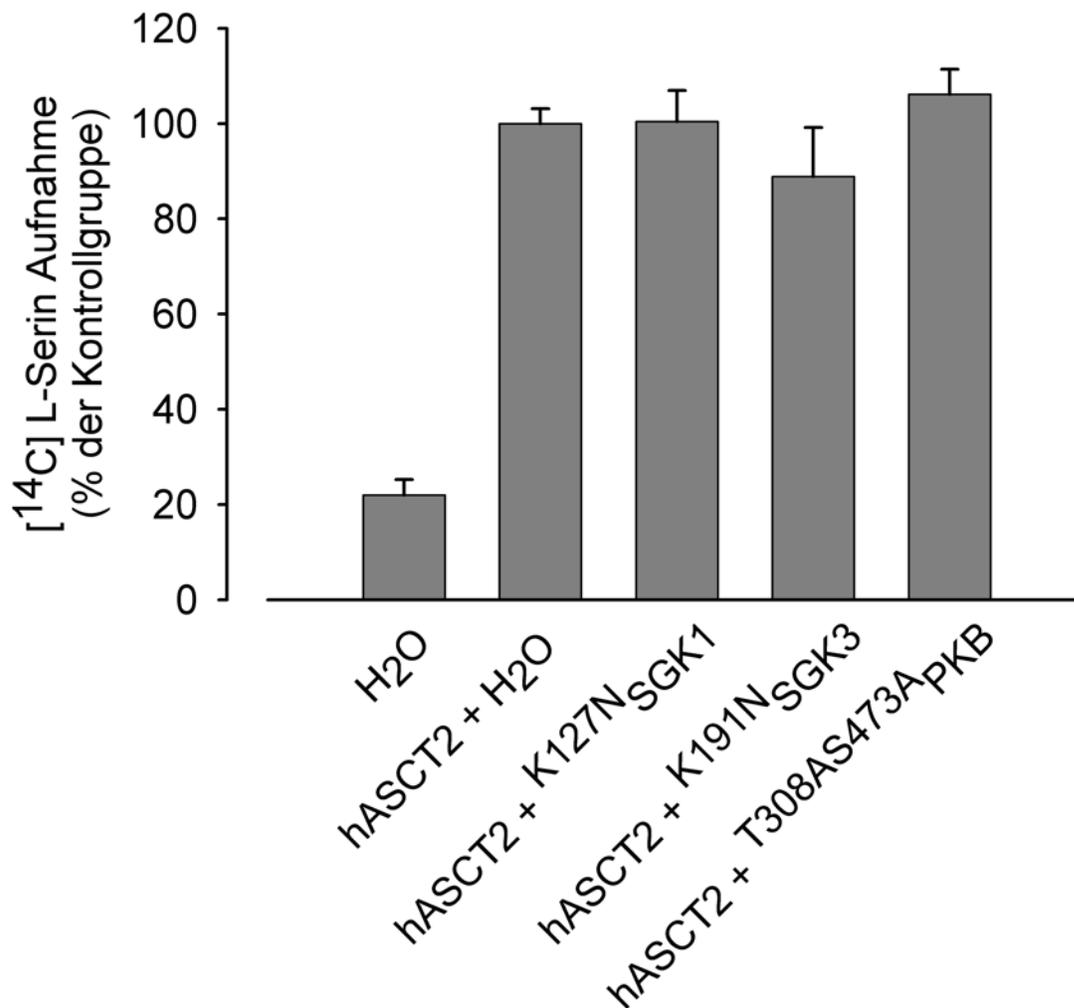


Abbildung 10: Die konstitutiv inaktiven Kinasen ^{K127N}SGK1, ^{K191N}SGK3 und ^{T308AS473A}PKB führen zu keiner signifikanten Regulation der hASCT Aktivität.

Xenopus laevis Oozyten wurden mit cRNA des hASCT2 mit oder ohne cRNA der konstitutiv inaktiven Mutanten ^{K127N}SGK1, ^{K191N}SGK3 oder ^{T308AS473A}PKB injiziert. Nach 3 Tagen wurden Flux Messungen durchgeführt. Gemessen wurden die Aktivität des aufgenommenen, radioaktiv markierten L-[¹⁴C]Serin. Balkendiagramm mit auf den Mittelwert der hASCT2 Gruppe normierte maximale L-[¹⁴C]Serin - Aufnahme. Arithmetisches Mittel ± Standardfehler, n = 9-50.

3.6 Kinetische Analyse der L- [¹⁴C] Serin Aufnahme durch hASCT2 bei Koexpression der konstitutiv aktiven Mutanten von SGK 1 und 3

Um der Frage nachzugehen, ob die konstitutiv aktiven Mutanten ^{S422D}SGK1 und ^{S419D}SGK3 die Eigenschaften der Transportkinetik des hASCT2 modifizieren, wurde die Substrataffinität des hASCT2 in An- bzw. Abwesenheit von ^{S422D}SGK1 und ^{S419D}SGK3 bestimmt. Hierzu wurden *Xenopus laevis* Oozyten mit cRNA des hASCT2 alleine bzw. cRNA des hASCT2 und cRNA der konstitutiv aktiven Mutanten ^{S422D}SGK1 und ^{S419D}SGK3 injiziert. Nach 3 Tagen wurde die durch hASCT2 vermittelte L-Serin Aufnahme bei verschiedenen Substratkonzentrationen in der Inkubationslösung gemessen und gegen die Substratkonzentration aufgetragen.

Hierbei wurden Inkubationslösungen mit 3, 10, 30, 100 und 1000µM L-Serin und entsprechend 0,015, 0,05, 0,15, 0,5 und 5 µCi L-[¹⁴C] Serin verwendet.

Wie in Abbildung 11 und in Tabelle 10 zu erkennen, wird die Aktivität des hASCT2 durch ^{S422D}SGK1 und ^{S419D}SGK3 gesteigert, indem es bei der Koexpression zu einer Zunahme der maximalen Transportgeschwindigkeit V_{max} kommt. Die Substrataffinität ändert sich hingegen nicht signifikant.

injizierte cRNA	K_m (µM)	V_{max} (pmol/min/Oozyte)
hASCT2	169,67 ± 79,90	8,95 ± 1,18
hASCT2 + ^{S422D} SGK1	134,25 ± 36,84	15,64 ± 1,44
hASCT2 + ^{S419D} SGK3	107,12 ± 12,96	14,39 ± 0,53

Tabelle 10: gemessene K_m und V_{max} -Werte für den hASCT2 alleine und bei Koexpression der angegebenen Kinasen.

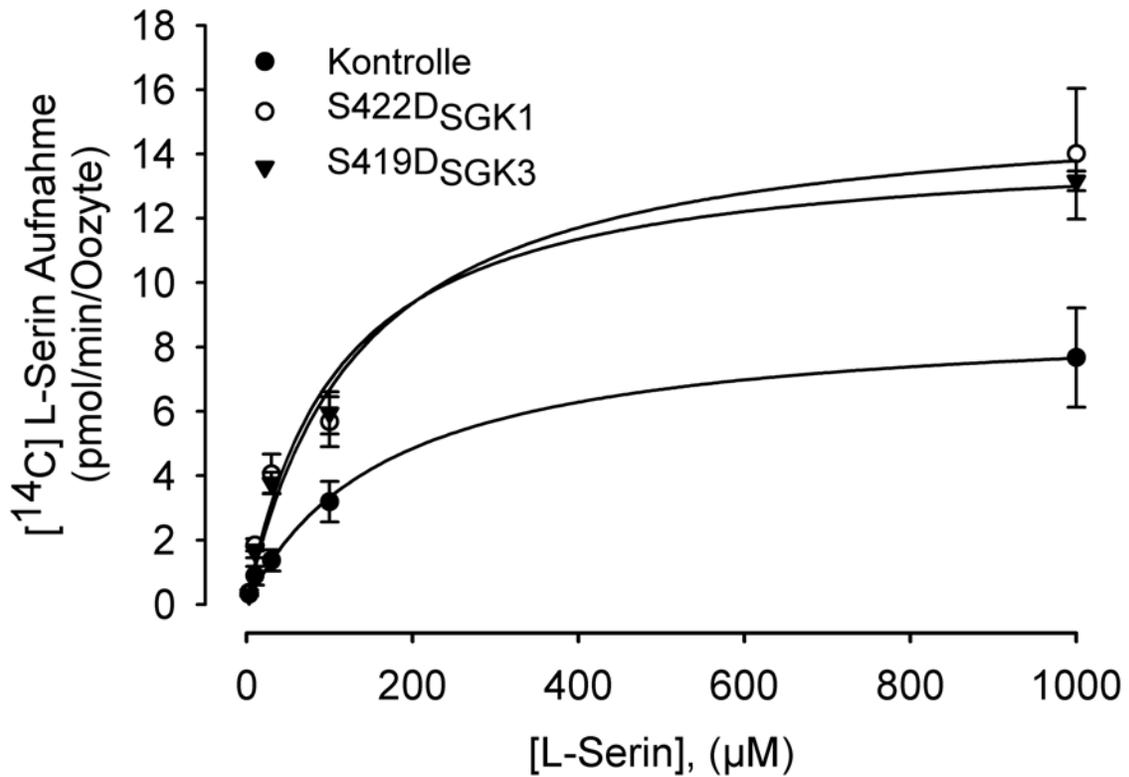


Abbildung 11: Die maximale Transportrate V_{\max} des hASCT2 wird durch die Koexpression von S^{422D} SGK1 und S^{419D} SGK3 signifikant gesteigert. *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit hASCT2 bzw. hASCT2 und S^{422D} SGK1 oder S^{419D} SGK3 cRNA injiziert. Nach 3 Tagen wurde mittels Flux Messung die L - [14 C]Serin - Aufnahme bei den angegebenen Substratkonzentrationen der Inkubationslösung gemessen. Arithmetisches Mittel \pm Standardfehler; n = 5.

3.7 Oberflächenexpression des hASCT2 bei Koexpression von aktiven Mutanten der SGK1 und SGK3

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die konstitutiv aktiven Mutanten ^{S422D}SGK1, ^{S419D}SGK3 und ^{T308DS473D}PKB den durch hASCT2 vermittelten Substrattransport signifikant steigern, wobei die maximale Transportgeschwindigkeit signifikant gesteigert wird, ohne die Substrataffinität zu verändern. Um herauszufinden, ob die genannten Kinasen die Anzahl bzw. die Dichte der hASCT Transporter in der Oozytenmembran verändern, wurden weitere Versuche mit Hämagglutinin - markierten (HA) hASCT2-Transportern durchgeführt. Hierfür wurden von der Follikelmembran befreite *Xenopus laevis* Oozyten zunächst mit cRNA der Kinasen ^{S422D}SGK1 oder ^{S419D}SGK3 injiziert. Am Folgetag erfolgte die Injektion mit hASCT2 - HA cRNA. Als Kontrollgruppe dienten nur mit hASCT2 - HA cRNA injizierte Oozyten und eine Gruppe mit DEPC Wasser injizierter Oozyten. Nach 3 Tagen wurde die Oberflächenexpression der HA-markierten hASCT2-Transporter mittels Chemolumineszenzmessung quantifiziert. Wie in Abbildung 12 zu erkennen, führt eine Koexpression von ^{S422D}SGK1 oder ^{S419D}SGK3 in Oozyten, die mit hASCT2 - HA cRNA injiziert sind, zu einer signifikanten, ca. 2fachen Erhöhung der HA - Signale an der Zellmembran (^{S422D}SGK: 207,8 ± 46,8 % der Kontrollgruppe, n = 44; ^{S419D}SGK3: 205 ± 30,6 % der Kontrollgruppe, n = 54) im Vergleich zu Oozyten, die nur hASCT2 - HA exprimieren (n = 55).

Die beobachtete Steigerung der hASCT2 Aktivität durch Koexpression von ^{S422D}SGK1 oder ^{S419D}SGK3 korreliert also mit der veränderten hASCT2 - Oberflächenexpression.

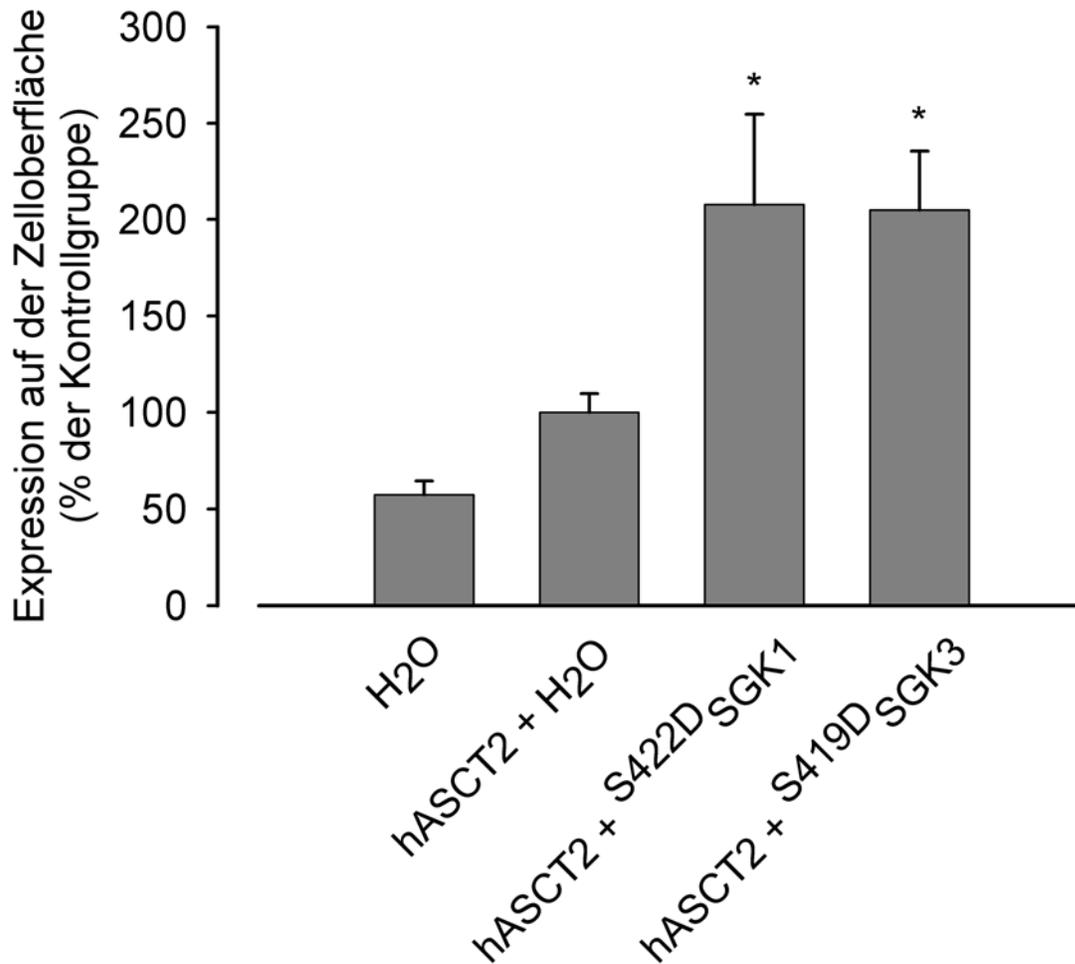


Abbildung 12: ^{S422D}SGK1 und ^{S419D}SGK3 steigern die Dichte der HA-markierten hASCT2-Transporter in der Zellmembran. *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit hASCT2-HA-cRNA alleine oder in Kombination mit ^{S422D}SGK1 oder ^{S419D}SGK3 injiziert. Nach 3 Tagen wurden Chemolumineszenzmessungen durchgeführt. Balkendiagramm der auf den Mittelwert der hASCT2 - HA - Gruppe normierten HA - Signale nach Aufnahme und Integration über 1 Sekunde. Arithmetisches Mittel und Standardfehler, n = 44-55. * zeigt den signifikanten Unterschied zwischen Oozyten, die nur mit hASCT2-HA und Oozyten die mit hASCT2-HA und ^{S422D}SGK1 oder ^{S419D}SGK3 injiziert wurden.

3.8 Die Ubiquitinligase Nedd4-2 bei der Regulation des hASCT2

Um zu prüfen, ob Nedd4-2 Einfluss auf die durch hASCT2 vermittelte L-[¹⁴C]Serin - Aufnahme hat, wurden *Xenopus laevis* Oozyten mit cRNA von hASCT2 alleine und in Kombination mit hNedd4-2 injiziert. Weiterhin wurde eine Gruppe von Oozyten nur mit cRNA von hNedd4-2 injiziert, um Effekte auf möglicherweise endogen in *Xenopus laevis* vorhandene Transportmechanismen für das verwendete Substrat zu erkennen. Die Kontrollgruppe wurde mit DEPC Wasser volumenäquivalent injiziert, um mögliche Volumeneffekte zu verhindern. Nach 3 Tagen wurden Flux Messungen durchgeführt. Gemessen wurden die Aktivität des aufgenommenen, radioaktiv markierten L-[¹⁴C] Serin.

Wie in Abbildung 13 zu erkennen ist, zeigen Oozyten, die lediglich hNedd4-2 exprimieren, keine signifikante Aufnahme von L-[¹⁴C]Serin gegenüber lediglich mit DEPC Wasser injizierten Zellen. Eine Koexpression von hASCT2 und hNedd4-2 zeigte eine signifikante Reduktion der Menge an aufgenommenem L-[¹⁴C]Serin pro Oozyte ($48,14 \pm 1,1$ mmol/min/Oozyte) gegenüber Zellen, die nur mit hASCT2 cRNA injiziert wurden ($81,94 \pm 2,87$ mmol/min/Oozyte). Die Koexpression von hNedd4-2 führt somit zu einer signifikanten Hemmung der Aktivität von hASCT2.

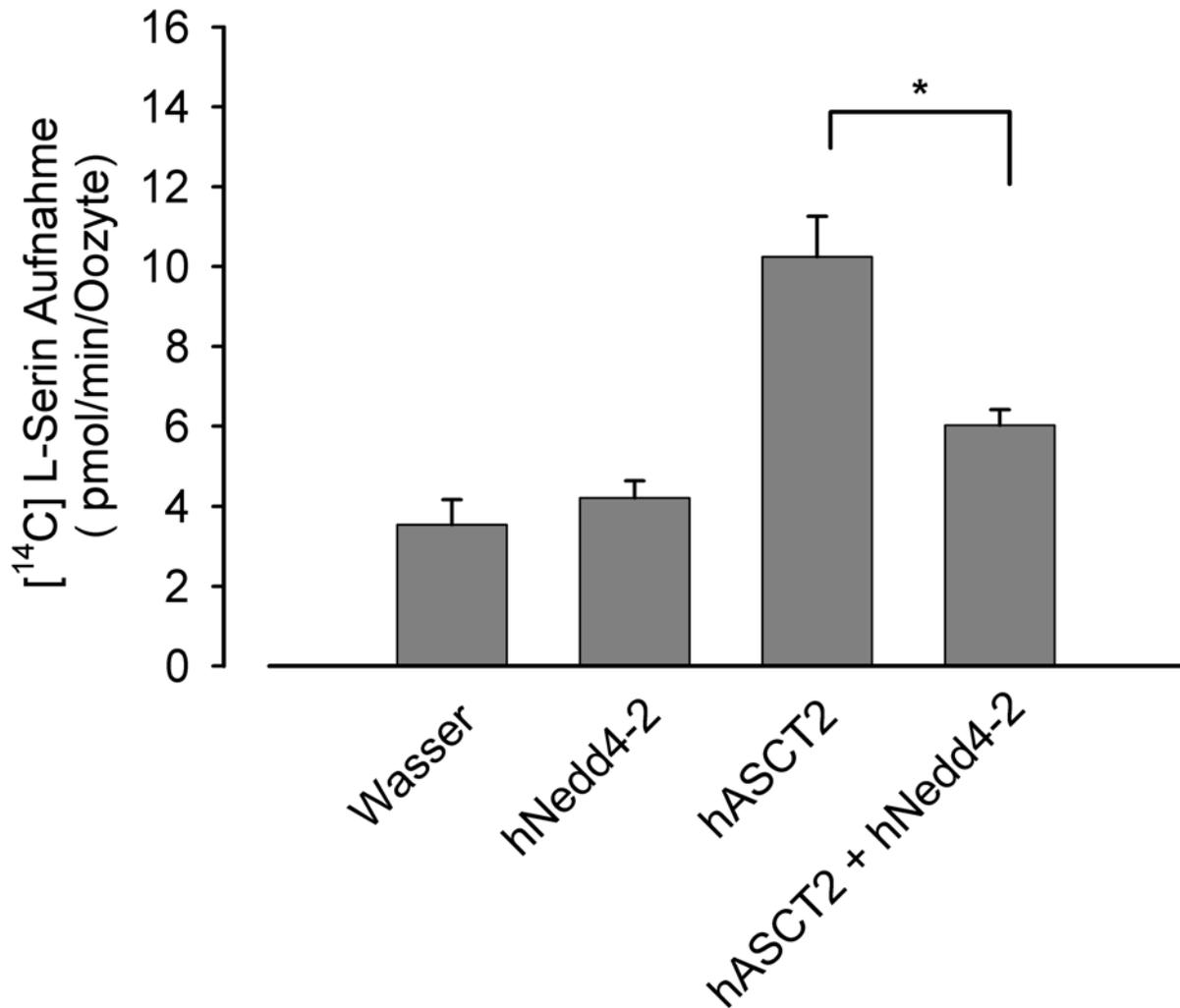


Abbildung 13: Nedd4-2 bewirkt eine signifikante Hemmung der hASCT2 Aktivität. *Xenopus laevis* Oozyten wurden entweder mit hASCT2 cRNA, mit hNedd4-2 cRNA oder mit beiden cRNAs injiziert. Als Kontrollgruppe dienten mit DEPC Wasser injizierte Oozyten. Nach 3 Tagen wurden Flux Messungen durchgeführt. Gemessen wurden die Aktivität des aufgenommenen, radioaktiv markierten L-[¹⁴C]Serin. Balkendiagramm mit dem arithmetischen Mittel \pm Standardabweichung der L-[¹⁴C] Serin Aufnahme. n = 10.

* steht für den statistisch signifikanten Unterschied zwischen der hASCT2 Gruppe und der hASCT2 + hNedd4-2 Gruppe.

4 Diskussion

4.1 Fehlerdiskussion

4.1.1 Oozyten

Die Qualität der Oozyten war von Präparation zu Präparation unterschiedlich. Dies zeigte sich in der Lebensdauer und in der unterschiedlichen Größe der Oozyten. Um diese Unterschiede auszugleichen, wurden nur Oozyten verwendet, die die bereits erwähnten Kriterien erfüllten und von gleicher Größe waren. Weiterhin wurden alle Messungen mit Zellen unterschiedlicher Präparationen wiederholt. Die Injektion einer nicht exakten Menge von cRNA führt zu Unterschieden in der Expression und damit der Aktivität. Da Unterschiede der Aktivität der untersuchten Transporter unter dem Einfluss von Proteinkinasen Gegenstand dieser Arbeit sind, musste auf die Injektion exakter cRNA Mengen mittels hochpräziser Mikroinjektoren besonders geachtet werden. Durch hohe Anzahl der untersuchten Oozyten und durch mehrmalige Wiederholung der Messungen konnte dieser unsystematische Fehler jedoch ausgeglichen werden.

4.1.2 Lösungen

Alle verwendeten Lösungen wurden vor jedem Versuch aus 10- fach Stammlösungen hergestellt. Der pH-Wert sowie die Gesamtosmolarität jeder Lösung wurde dabei vor jedem Versuch kontrolliert und konstant gehalten. Weiterhin wurde alle Lösungen bei gleichbleibenden Temperatur- und Lichtverhältnissen aufbewahrt. Alle Aufbewahrungsbehältnisse wurden vor deren Verwendung autoklaviert.

Da die gemessene Aktivität der Transporter bei den Uptake / „Tracer flux“ - Messungen vom Anteil des radioaktiv markierten Substrates an der Gesamtmenge des angebotenen Substrates abhängt, wurde hierbei durch die Verwendung

hochgenauer Mikropipetten besonders geachtet. Durch hohe Anzahl der untersuchten Oozyten und durch mehrmalige Wiederholung der Messungen wurde dieser unsystematische Fehler jedoch ausgeglichen.

4.1.3 Geräte

Um bei den Tracer-Flux Messungen den chemischen und den optischen *Quench*, also die Fehlbestimmung der Aktivität durch chemische und physikalische Interaktionen im Messansatz zur erfassen, wurde bei jedem Messdurchlauf jeweils 3 mal der Interne Standard bestimmt, der gemittelte Wert wurde herangezogen um die reale Aktivität des zu bestimmenden Nuklids berechnen zu können.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Serum- und Glukortikoid-abhängigen Kinasen und ihrer Isoformem 1-3, sowie der funktionell eng verwandeten Proteinkinase B (PKB) auf den Transporter neutraler Aminosäuren hASCT2 (Genname SLCT1A5) des ASC-Systems zu untersuchen und den Regulationsmechanismus aufzudecken.

Es konnte gezeigt werden, dass im gewählten Expressionssystem, den Oozyten des *Xenopus laevis*, die Aufnahme von L-[¹⁴C] Serin in die Zelle durch die Expression des hASCT2 um den Faktor 5 gesteigert werden kann und die L-[¹⁴C] Serin Aufnahme in die Zelle spezifisch durch den hASCT2 vermittelt wird.

Konsistent mit Ergebnissen vorhergehender Arbeiten anderer Autoren konnte gezeigt werden, dass der durch den hASCT2 vermittelte Transport von L-[¹⁴C]-Serin natriumabhängig ist (Arriza et al., 1993; Kekuda et al., 1996; Shafqat et al., 1993; Utsunomiya-Tate et al., 1996) und bestätigt damit das theoretische Modell der funktionellen Eigenschaften des hASCT2 als obligat Natrium-abhängigen Aminosäuretransporters, welches bereits in Kapitel 1.4.2 ausführlich beschrieben wurde.

Es zeigte sich, dass die L-[¹⁴C] Serin Aufnahme des hASCT2 durch Koexpression der konstitutiv aktiven Muanten der SGK1 (^{S422D}SGK1), SGK3 (^{S419D}SGK3) und der Proteinkinase B (^{T308D}^{S473D}PKB) signifikant gesteigert wird. Diese Beobachtungen ergänzen die bisher bekannten Funktionen der SGK. Bekannt war bislang nur, dass einige strukturell verwandte Transporter der Glutamat-Transporter Superfamilie SLC1 durch die SGK reguliert werden und die SGK damit großen Einfluss auf die Steuerung der Aminosäureaufnahme in die Zelle nimmt.

Durch die Koexpression der im aktiven Zentrum inaktivierten Mutanten ^{K127N}SGK1, ^{K191N}SGK3 und ^{T308AS473A}PKB konnte kein stimulierender Effekt auf die L-[¹⁴C] Serin Aufnahme des hASCT2 gezeigt werden. Die Regulation des hASCT2 durch die SGK scheint also durch Phosphorylierung bewirkt zu werden. Wie bereit erwähnt, konnte jedoch in der Primärsequenz des hASCT2 keine der bekannten Phosphorylierungssequenzen als Zielstruktur der SGK gefunden werden.

Die Transportkinetik des hASCT2 wurde durch den Einfluss der SGK1 und SGK3 nicht verändert. Die maximale Transportgeschwindigkeit V_{\max} stieg zwar an, die Substrataffinität blieb jedoch unverändert.

Durch eine extrazelluläre Hämagglutinin-Markierung der hASCT2-Proteine konnte mittels Chemolumineszens die Oberflächenexpression auf *Xenopus laevis* Oozyten dargestellt und quantifiziert werden. Es zeigte sich, dass bei Koexpression der SGK Isoformen 1 und 3 die Dichte der markierten Transporterproteine auf der Zelloberfläche zunimmt.

Die aktivierende Wirkung der Kinasen SGK1, SGK2 und PKB auf den durch hASCT2 bewirkten Aminosäuretransport wird also offenbar zum großen Teil über die Erhöhung der Dichte der Transportproteine in der Zellmembran bewirkt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten dementsprechend darauf hin, dass die Effekte der Isoformen 1 und 3 der Serum- und Glukokortikoid-abhängigen Kinase am hASCT2 nicht über eine direkte Phosphorylierung des Transporterproteins durch die SGK zustande kommen.

Wie aber bereits in der Einleitung beschrieben, gibt es eine Reihe von Membrankanälen und Transportern, die über keine der bekannten Phosphorylierungssequenzen verfügen, aber dennoch durch die Serum- und Glukokortikoid-abhängigen Kinase reguliert werden. Es gibt demnach Hinweise auf eine Indirekte Regulation. Die Existenz weiterer regulierender Zwischenproteine, ähnlich wie bei Kv1.3, ist wahrscheinlich.

Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass die direkte Phosphorylierung nur einer der möglichen Wege in der Regulation von Membranproteinen durch die SGK ist (Boehmer et al., 2003). Ein weiterer Mechanismus zu der in diesem Fall indirekten Modulation von Membranproteinen ist die Interaktion der SGK mit der Ubiquitinligase Nedd4-2 (Debonneville et al., 2001; Palmada et al., 2004a; Palmada et al., 2004b). Wie bereits beschrieben, werden hierbei Membranproteine durch die Markierung mit Ubiquitin für die Degradation aus der Membran und für den Abbau markiert.

Andere Autoren konnten zeigen, dass die Ubiquitinligase Nedd4-2 durch die SGK gehemmt wird und somit eine Degradation und ein Abbau von Proteinen aus der Plasmamembran verhindert wird (Abriel et al., 2000; Staub et al., 1997a), und dass die SGK über diesen Weg indirekt für eine höhere Konzentration von Transporter-Proteinen in der Membran sorgt.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, benötigt Nedd4-2 eine spezifische Erkennungssequenz, das sog. PY-Motiv, eine im C-Terminus gelegene prolinreiche Aminosäuresequenz, zur Interaktion mit dem Zielprotein. Dennoch konnte bei einigen Membranproteinen eine Regulation durch die Ubiquitinligase Nedd4-2 nachgewiesen werden, obwohl die Zielproteine keine Nedd4-2 Interaktionssequenz (PY-Motiv) besitzen (Henke et al., 2004).

In dieser Arbeit konnte eine Regulation des hASCT2 durch die Ubiquitinligase Nedd4-2 gezeigt werden; bei Koexpression von hASCT2 und hNedd4-2 kam es zu einem signifikanten Rückgang der durch den hASCT2 vermittelten Aminosäuretransport über die Zellmembran.

Allerdings sind auch Transporter bekannt, die auf indirektem Wege durch die SGK stimuliert werden, wobei diese Aktivitätssteigerung jedoch nicht über eine Inaktivierung von Nedd4-2 vermittelt wird (Boehmer et al., 2006), so dass im Rahmen dieser Arbeit kein Rückschluss möglich ist, ob die beschriebene Aktivierung des hASCT2 durch ein noch unbekanntes Zwischenprotein oder die Inaktivierung von Nedd4-2 vermittelt wird.

Bedeutung des Aminosäuretransporters hASCT2 und der Serum- und Glukokortikoid-abhängigen Kinase 1 im Tumormetabolom

Die wahrscheinliche Bedeutung der Serum- und Glukokortikoid-abhängigen Kinase in der Regulation von elementaren physiologischen Funktionen wie Zellzyklus und Zellwachstum und der damit verbundenen wahrscheinlichen Rolle im pathophysiologischen Prozess des Wachstums von Malignomen wurde bereits in Kapitel 1.5.6. geschildert.

Wie bereits in Kapitel 1.4.1 beschrieben, konnte in vielen Malignomen ein stark erhöhtes Expressionsniveau des hASCT2 nachgewiesen werden, so zum Beispiel im kolorektalen Karzinom, dem Prostatakarzinom, dem hepatozellulären Karzinom und einigen hirneigenen Tumoren.

Im Folgenden soll das zunehmende Verständnis der Rolle des hASCT2 im Tumormetabolom näher beleuchtet werden.

Unabhängig von ihrem Ursprung benötigen Tumore eine konstant große Menge an Nährstoffen für ihr charakteristisches schnelles Wachstum. Tatsächlich setzten Tumore mehr Nährstoffe um, als sie für ihren eigenen Metabolismus benötigen (Medina et al., 1992b) und zeigen dabei im Vergleich mit dem normalem Gewebe, aus dem sie abstammen, ein verändertes, aber spezifisches metabolisches Profil. Durch Angiogenese und durch eine starke Expression von Transportern in der Plasmamembran versorgen sich die Malignome mit Nährstoffen.

Die zunehmende Identifikation von Transportern des Tumormetaboloms auf molekularer Ebene führte zu einem neuen Stellenwert dieser Transporter im Verständnis der Karzinogenese und ihrer Funktion im Hinblick auf Chemosensibilität und -Resistenz (Huang et al., 2004). Während zunächst vor allem Glukosetransporter und ihre Rolle im Tumormetabolom beschrieben wurden (Macheda et al., 2005), konnte nun auch die wichtige Funktion der Aminosäuretransporter im Tumormetabolom belegt werden.

Aminosäuren sind die primäre Stickstoffquelle für den zellulären Metabolismus und werden für die Synthese von Nukleotiden, Proteine und Glutathion benötigt. Der ungeheure Aminosäuremetabolismus maligner Tumore ist für die negative Stickstoffbilanz im betroffenen Organismus mitverantwortlich. Darüber hinaus werden Aminosäuren oft zur Deckung des ungeheuren ATP Bedarfs herangezogen und dem Energiestoffwechsel zugeführt, wenn der Bedarf durch Glukose oder Fettsäuren alleine nicht gedeckt werden kann (Baggetto, 1992; Medina et al., 1992a). Im Vergleich mit normalem Gewebe zeigen Malignome eine verstärkte und veränderte Einbindung von Aminosäuren in bestimmte Stoffwechselwege (Baggetto, 1992; Mazurek & Eigenbrodt, 2003). Zusätzlich zu ihrer Rolle als Grundbaustein im Zellmetabolismus erfüllen die Aminosäuren auch regulatorische Aufgaben im Hinblick auf das Zellwachstum, was über eine Signalkaskade geschieht, welche die Kinase mTOR (mammalian target-of-rapamycin) intergriert (Beugnet et al., 2003; Meijer, 2003; Proud, 2002). Im Hinblick auf die metabolischen und regulatorischen Funktionen der Aminosäuren ist es nicht überraschend, dass sie in wachsenden Tumoren im verstärkten Maß in die Zelle aufgenommen werden. Es muss demnach also effiziente Mechanismen geben, um Aminosäuren aus dem Plasma aufzunehmen.

Die Bedeutung des Glutaminhaushaltes im Stoffwechsel proliferativer Zellen ist mittlerweile gut erforscht (Baggetto, 1992; Mazurek & Eigenbrodt, 2003; Medina et al., 1992a) und könnte für die erhöhte Expression von hASCT2 verantwortlich sein. Obwohl der hASCT2, wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, ein obligater Aminosäuretauscher ist, kann er dennoch für die Netto-Glutaminaufnahme verantwortlich sein, da diese Aminosäure schnell metabolisiert wird und so für den ASCT2 vermittelten Ausstrom nicht mehr zur Verfügung steht, was die verstärkte Expression von ASCT2 in Zellen mit einem schnell wachsenden und kanzerogenen Phänotyp erklärt (Fuchs & Bode, 2005). So konnte eine erhöhte ASCT2 Aktivität in Malignomen nachgewiesen werden, die von Geweben wie zum Beispiel Leber und Gehirn abstammen, welche einen hohen Grundumsatz von

Glutamin aufweisen. In diesen Geweben spielt Glutamin eine wichtige Rolle bei der normalen physiologischen Funktion (Behar & Rothman, 2001; Haussinger, 1990). Gleiches gilt für die Epithelzellen der Darmmukosa, in denen Glutamin die bevorzugte Energiequelle darstellt (Windmueller & Spaeth, 1974).

Das Zusammenspiel von SGK, ASCT2 und mTOR in der Steuerung des Zellwachstums und der Apoptose

Die mTOR (mammalian Target of Rapamycin) ist eine Serin/Threonin-Kinase und gehört zu den Phosphatidylinositol-3-Kinasen. Sie integriert über einen aktuell nur zum Teil aufgeklärten Mechanismus die Signale von Wachstumsfaktoren (über die Kinasen PI3K und Akt/PKB), des Energiehaushaltes und des Versorgungstatus mit Aminosäuren in die zellulären Signalkaskaden. Darüber hinaus koordiniert sie das Zellwachstum und den Zellzyklus (Fingar & Blenis, 2004) durch die Regulation wichtiger Schlüsselproteine der Phosphorylierung, wodurch die Expression bestimmter Proteine stimuliert wird, welche für das Zellwachstum mitverantwortlich sind (Beugnet et al., 2003; Fingar & Blenis, 2004; Proud, 2002).

Die mTOR vermittelt Wachstumssignale und kann durch Rapamycin gehemmt werden, welches als Anti-Tumor Medikament entwickelt wurde (Mita et al., 2003; Sawyers, 2003). Temsirolimus (Torisel®), ein Derivat des Rapamycins wurde im Mai 2007 auf dem US-amerikanischen Markt zur Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms zugelassen.

Rapamycin hemmt in Lymphozyten selektiv die Expression der Gene der Aminosäuretransporter ASCT2, LAT1 und 4F2hc (Peng et al., 2002). Schon länger wird eine reziproke Stimulation zwischen ASCT2, LAT1 und mTOR vermutet (Peng et al., 2002; Wasa et al., 1996). Eine Suppression der ASCT2 Expression inhibiert die durch mTOR vermittelte Signalkaskade; gleichermaßen inhibiert Rapamycin die mTOR Aktivität und vermindert die Expression von ASCT2 und LAT1 (Fuchs et al., 2007).

ASCT2 scheint auf das Zellüberleben zu wirken und damit in die Signalkaskade der Apoptose eingebunden zu sein.

In humanen Hepatom-Zelllinien führt die Blockade des ASCT2 Gens durch antisense-RNA zu einer Reduktion der mRNA im Cytoplasma um 60%, führte aber in 98% zum Zelltod. Gleichzeitig führte die Ausschaltung des Transporters zu einer starken Aktivierung von Caspase 2 und 9 (Fuchs et al., 2004). Welcher genaue funktionelle Zusammenhang zwischen dem Expressionsniveau des hASCT2 und dem Signalweg der Apoptose (vermittelt über die Caspasen 2,3 und 9) besteht, ist bislang unzureichend geklärt und Bestandteil aktueller Studien.

mTOR scheint also auf Wachstumssignale hin die Expression von Aminosäuretransportern zu regulieren. Der Nachweis, dass ASCT2 in vielen humanen Malignomen stark exprimiert wird und dort durch eine direkte oder indirekte Interaktion mit mTOR Einfluss auf das Wachstum von Malignomzellen hat, ist medizinisch hochrelevant.

Aktuell wird angenommen, dass der in vielen Malignomen ebenfalls stark exprimierte Aminosäuretransporter LAT1 für die essentiellen Aminosäuren sorgt, die über eine mTOR vermittelte Signalkaskade das Zellwachstum vorantreiben, während ASCT2 für den zytoplasmatischen Pool an Aminosäuren sorgt, die für die LAT-Funktion notwendig ist, die Apoptose verhindert und durch Glutaminaufnahme zur Versorgung des Energiehaushaltes sorgt.

Konsistent mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte erst kürzlich die enge Kopplung zwischen den Serum- und Glukokortikoid-abhängigen Kinasen und mTOR geklärt werden, welche die vermutete reziproke Stimulation von mTOR und hASCT2 bestätigt. Hong et al. konnten zeigen, dass mTOR die Serum - und Glukokortikoid-abhängige Kinase 1 phosphoryliert und damit aktiviert und damit den Zellzyklus und das Zellwachstum vorantreibt (Hong et al., 2008). Es ist bekannt, dass die SGK1 zwar ubiquitär exprimiert wird, aber unter starker

transkriptioneller Kontrolle steht und ihre relative Aktivität von Faktoren wie Zellvolumen, Glukokortikoiden oder Mineralokortikoiden abhängt und folglich die Anpassung an physiologische und pathophysiologische Prozesse steuert. Durch den in dieser Arbeit erbrachten Nachweis der Aktivierung durch die SGK1 wird das Zusammenspiel der mTOR und des im Tumormetabolom verstärkt exprimierten hASCT2 erklärbar.

Die neuen Erkenntnisse legen nahe, dass mTOR den Zellzyklus zumindest zu einem Teil über eine Aktivierung der SGK 1 vorantreibt und die SGK1 abhängige Phosphorylierung des Proteins p27 zu einer Dysregulation des Zellwachstums führt, während über die SGK1 abhängige Aktivitätssteigerung des hASCT2 die nun maligne Zelle mit Nährstoffen versorgt wird.

Auch im pathophysiologischen Prozess des malignen Zellwachstums scheint die Serum- und Glukokortikoid-abhängige Kinase nicht nur Effektor zu sein, sondern eine zentrale Rolle zu spielen.

Im Hinblick auf die immer noch nur zum Teil geklärten Mechanismen der physiologischen Zellproliferation und der daraus hervorgehenden Pathophysiologie im Sinne von malignem Wachstum, sowie angesichts der Häufigkeit von Malignomerkrankungen wird deutlich, wie wichtig das grundlegende Verständnis der Funktion aller Interaktionspartner intrazellulärer Signalkaskaden und deren Zusammenwirken ist.

5 Zusammenfassung

Der Aminosäuretransporter hASCT2 aus der SLC1 Familie der Glutamattransporter spielt eine wichtige Rolle in der Aufnahme von Aminosäuren in die Zelle und wird in vielen Organen exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass der hASCT2 als Rezeptor für eine große Gruppe von Retroviren fungiert und hierüber Einfluss auf die virale Replikation hat, aber auch die Zellproliferation beeinträchtigt, was als ein Mechanismus der viralen Toxizität und der Immunsuppression vermutet wird.

Das Bakterium *Legionella Pneumophila*, welches sich intrazellulär in phagozytischen Zellen vermehren kann, scheint vom Transportsystem neutraler Aminosäuren hASCT2 der Wirtszelle abzuhängen und eine verstärkte Expression dieses Transporters zu bewirken, um seine intrazelluläre Replikation zu ermöglichen.

Ebenfalls scheint der hASCT2 im Tumormetabolom eine herausragende Rolle zu spielen. Es konnte ein verstärktes Replikationsniveau dieser Transporter in vielen menschlichen Tumoren und Tumorzelllinien wie zum Beispiel dem Kolonkarzinom, dem hepatozellulären Karzinom (HCC), dem Adenokarzinom der Prostata und einigen hirneigenen Tumoren nachgewiesen werden. Der hASCT2 scheint mit mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) zu interagieren und so Einfluss auf das Zellwachstum und die Apoptose von Malignomzellen zu haben. Als Interaktionspartner der mTOR konnte kürzlich die Serum- und Glukokortikoid-abhängige Kinase 1 (SGK1) identifiziert werden.

Die Serum- und Glukokortikoid-abhängige Kinase (SGK) und ihre Isoformen beeinflussen direkt und indirekt eine Vielzahl von Ionenkanälen und Transportern, unter anderem auch Aminosäuretransporter der SLC1 Glutamattransporterfamilie, so zum Beispiel den SLC1A1 und den SLC1A3 die in ihrer Struktur mit dem hASCT2 eng verwandt sind. Weiterhin ist eine durch die SGK vermittelte

Aktivierung von Transkriptionsfaktoren bekannt und untermauert die Bedeutung der SGK bei der Zellproliferation, der Apoptose und wahrscheinlich auch beim Wachstum von Malignomen.

Die mTOR wird durch den PI3-Kinase-Weg über die SGK1 aktiviert, gleiches konnte für strukturell eng verwandte Transporter des hASCT2 nachgewiesen werden, so könnte die Regulation des hASCT2 durch die SGK den *missing link* in der gemeinsamen Regulation von mTOR und hASCT2 im Tumormetabolom darstellen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden ob und wie die SGK und ihre Isoformen bzw. die Proteinkinase B, die der SGK funktionell verwandt ist, an der Regulation des hASCT2 beteiligt ist.

Es wurden *Tracer Flux* Messungen und molekularbiologische Methoden zur Darstellung der Interaktion zwischen den Proteinkinasen und hASCT2 angewandt. Es zeigte sich, dass die SGK Isoformen 1 und 3 sowie die Proteinkinase B die Aktivität des hASCT2 stark aktiviert. Obwohl sich in der hASCT2-Primärsequenz keine SGK-Phosphorylierungssequenz findet, konnte mittels Koexpression von konstitutiv inaktiven Mutanten der SGK und der PKB gezeigt werden, dass die Regulation abhängig von der Phosphorylierungsfähigkeit der Kinasen ist.

Die Transportkinetik des hASCT2 wurde durch den Einfluss der SGK1 und SGK3 nicht verändert, die maximale Transportgeschwindigkeit V_{\max} stieg zwar an, die Substrataffinität blieb jedoch unverändert.

Durch eine extrazelluläre Hämagglutinin-Markierung der hASCT2-Proteine konnte mittels Chemolumineszenz die Oberflächenexpression auf *Xenopus laevis* Oozyten dargestellt und quantifiziert werden. Es zeigte sich, dass bei Koexpression der SGK Isoformen 1 und 3 die Dichte der markierten Transporterproteine auf der Zelloberfläche zunimmt.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass die SGK viele Proteine reguliert, indem sie deren Degradation durch Hemmung der Ubiquitinligase Nedd4-2 verhindert, wurden Messungen unter Koexpression dieser Ubiquitinligase durchgeführt. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der Aktivität des hASCT2.

Zusammengefasst modulieren die Isoformen der Serum- und Glukokortikoid-abhängigen Kinase (SGK) 1 und 3 sowie die Proteinkinase B die Aktivität des Aminosäuretransporter hASCT2 durch eine Erhöhung der Transporterdichte in der Zellmembran, ohne dabei die Transportkinetik zu verändern. Eine Koexpression von Nedd4-2 führte zu einer deutlichen Minderung der Aminosäureaufnahmeaktivität.

Dementsprechend ist eine gemeinsame Regulation von hASCT2 und mTOR über die SGK unter physiologischen wie auch unter pathologischen Bedingungen wie zum Beispiel im Tumormetabolom wahrscheinlich.

Weiterhin bleiben jedoch viele Fragen über das genaue Interaktionsmuster des hASCT2 und der SGK Isoformen offen. Das Ziel weiterführender Arbeiten ist es nun, die Mechanismen der Interaktion weiter zu erforschen und wahrscheinlich vorhandene weitere Proteine, die in diese Regulationsmechanismen involviert sind, zu identifizieren und zu charakterisieren.

6 Literaturverzeichnis

- Abriel, H., Kamynina, E., Horisberger, J. D. und Staub, O. (2000)
Regulation of the cardiac voltage-gated Na⁺ channel (H1) by the ubiquitin-protein ligase Nedd4
FEBS Lett. 466 2-3, 377-380
- Akutsu, N., Lin, R., Bastien, Y., Bestawros, A., Enepekides, D. J., Black, M. J. und White, J. H. (2001)
Regulation of gene Expression by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and Its analog EB1089 under growth-inhibitory conditions in squamous carcinoma Cells
Mol.Endocrinol. 15 7, 1127-1139
- Alliston, T. N., Gonzalez-Robayna, I. J., Buse, P., Firestone, G. L. und Richards, J. S. (2000)
Expression and localization of serum/glucocorticoid-induced kinase in the rat ovary: relation to follicular growth and differentiation
Endocrinology 141 1, 385-395
- Alvarez, d. I. R., Zhang, P., Naray-Fejes-Toth, A., Fejes-Toth, G. und Canessa, C. M. (1999)
The serum and glucocorticoid kinase sgk increases the abundance of epithelial sodium channels in the plasma membrane of Xenopus oocytes
J.Biol.Chem. 274 53, 37834-37839
- Armstrong, C. M. (2003)
Voltage-gated K channels
Sci.STKE. 2003 188, re10
- Arriza, J. L., Eliasof, S., Kavanaugh, M. P. und Amara, S. G. (1997)
Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 94 8, 4155-4160
- Arriza, J. L., Kavanaugh, M. P., Fairman, W. A., Wu, Y. N., Murdoch, G. H., North, R. A. und Amara, S. G. (1993)
Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family
J.Biol.Chem. 268 21, 15329-15332

-
- Avissar, N. E., Ryan, C. K., Ganapathy, V. und Sax, H. C. (2001)
Na(+)-dependent neutral amino acid transporter ATB(0) is a rabbit epithelial cell brush-border protein
Am J Physiol Cell Physiol 281 3, C963-C971
- Baggetto, L. G. (1992)
Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells
Biochimie 74 11, 959-974
- Behar, K. L. & Rothman, D. L. (2001)
In vivo nuclear magnetic resonance studies of glutamate-gamma-aminobutyric acid-glutamine cycling in rodent and human cortex: the central role of glutamine
J.Nutr. 131 9 Suppl, 2498S-2504S
- Bell, L. M., Leong, M. L., Kim, B., Wang, E., Park, J., Hemmings, B. A. und 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, 25262-25272
- Beugnet, A., Tee, A. R., Taylor, P. M. und Proud, C. G. (2003)
Regulation of targets of mTOR (mammalian target of rapamycin) signalling by intracellular amino acid availability
Biochem.J. 372 Pt 2, 555-566
- Biondi, R. M., Kieloch, A., Currie, R. A., Deak, M. und Alessi, D. R. (2001)
The PIF-binding pocket in PDK1 is essential for activation of S6K and SGK, but not PKB
EMBO J. 20 16, 4380-4390
- Bode, B. P., Fuchs, B. C., Hurley, B. P., Conroy, J. L., Suetterlin, J. E., Tanabe, K. K., Rhoads, D. B., Abcouwer, S. F. und 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-G1073
- Bode, B. P., Reuter, N., Conroy, J. L. und Souba, W. W. (1998)
Protein kinase C regulates nutrient uptake and growth in hepatoma cells
Surgery 124 2, 260-267

-
- Boehmer, C., Embark, H. M., Bauer, A., Palmada, M., Yun, C. H., Weinman, E. J., Endou, H., Cohen, P., Lahme, S., Bichler, K. H. und Lang, F. (2004)
Stimulation of renal Na⁺ dicarboxylate cotransporter 1 by Na⁺/H⁺ exchanger regulating factor 2, serum and glucocorticoid inducible kinase isoforms, and protein kinase B
Biochem.Biophys.Res.Comm. 313 4, 998-1003
- Boehmer, C., Henke, G., Schniepp, R., Palmada, M., Rothstein, J. D., Broer, S. und Lang, F. (2003)
Regulation of the glutamate transporter EAAT1 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid-inducible kinase isoforms SGK1/3 and protein kinase B
J.Neurochem. 86 5, 1181-1188
- Boehmer, C., Palmada, M., Rajamanickam, J., Schniepp, R., Amara, S. und Lang, F. (2006)
Post-translational regulation of EAAT2 function by co-expressed ubiquitin ligase Nedd4-2 is impacted by SGK kinases
J.Neurochem. 97 4, 911-921
- Borst, P. & Elferink, R. O. (2002)
Mammalian ABC transporters in health and disease
Annu.Rev.Biochem. 71, 537-592
- Brickley, D. R., Mikosz, C. A., Hagan, C. R. und Conzen, S. D. (2002)
Ubiquitin modification of serum and glucocorticoid-induced protein kinase-1 (SGK-1)
J.Biol.Chem. 277 45, 43064-43070
- Broer, A., Brookes, N., Ganapathy, V., Dimmer, K. S., Wagner, C. A., Lang, F. und Broer, S. (1999)
The astroglial ASCT2 amino acid transporter as a mediator of glutamine efflux
J.Neurochem. 73 5, 2184-2194
- Broer, A., Wagner, C., Lang, F. und Broer, S. (2000)
Neutral amino acid transporter ASCT2 displays substrate-induced Na⁺ exchange and a substrate-gated anion conductance
Biochem.J. 346 Pt 3, 705-710
- Broer, S. (2002)
Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands
Pflugers Arch. 444 4, 457-466

-
- Bruce, M. C., Kanelis, V., Fouladkou, F., Debonneville, A., Staub, O. und Rotin, D. (2008)
Regulation of Nedd4-2 self-ubiquitination and stability by a PY motif located within its HECT-domain
Biochem.J. 415 1, 155-163
- Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L. S., Hemmings, B. A. und Greenberg, M. E. (2001)
Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a)
Mol.Cell Biol. 21 3, 952-965
- Brunet, J. F., Grollmund, L., Chatton, J. Y., Lengacher, S., Magistretti, P. J., Villemure, J. G. und Pellerin, L. (2004)
Early acquisition of typical metabolic features upon differentiation of mouse neural stem cells into astrocytes
Glia 46 1, 8-17
- Bungard, C. I. & McGivan, J. D. (2004)
Glutamine availability up-regulates expression of the amino acid transporter protein ASCT2 in HepG2 cells and stimulates the ASCT2 promoter
Biochem J 382 Pt 1, 27-32
- Bungard, C. I. & McGivan, J. D. (2005)
Identification of the promoter elements involved in the stimulation of ASCT2 expression by glutamine availability in HepG2 cells and the probable involvement of FXR/RXR dimers
Arch.Biochem.Biophys. 443 1-2, 53-59
- Chen, C. P., Wang, K. G., Chen, C. Y., Yu, C., Chuang, H. C. und Chen, H. (2006)
Altered placental syncytin and its receptor ASCT2 expression in placental development and pre-eclampsia
BJOG. 113 2, 152-158
- Chen, S. Y., Bhargava, A., Mastroberardino, L., Meijer, O. C., Wang, J., Buse, P., Firestone, G. L., Verrey, F. und Pearce, D. (1999)
Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96 5, 2514-2519
- Chen, T. Y. (2003)
Coupling gating with ion permeation in CIC channels
Sci.STKE. 2003 188, e23

-
- Christensen, H. N. (1990)
Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism
Physiol Rev. 70 1, 43-77
- Christensen, H. N., Liang, M. und Archer, E. G. (1967)
A distinct Na⁺-requiring transport system for alanine, serine, cysteine, and similar amino acids
J.Biol.Chem. 242 22, 5237-5246
- Cox, D. W. & Moore, S. D. (2002)
Copper transporting P-type ATPases and human disease
J.Bioenerg.Biomembr. 34 5, 333-338
- Dascal, N. (1987)
The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels
CRC Crit Rev.Biochem. 22 4, 317-387
- Dawid, I. B., Haynes, S. R., Jamrich, M., Jonas, E., Miyatani, S., Sargent, T. D. und Winkles, J. A. (1985)
Gene expression in *Xenopus* embryogenesis
J.Embryol.Exp.Morphol. 89 Suppl, 113-124
- Dawid, I. B. & Sargent, T. D. (1988)
Xenopus laevis in developmental and molecular biology
Science 240 4858, 1443-1448
- Debonneville, C., Flores, S. Y., Kamynina, E., Plant, P. J., Tauxe, C., Thomas, M. A., Munster, C., Chraïbi, A., Pratt, J. H., Horisberger, J. D., Pearce, D., Loffing, J. und Staub, O. (2001)
Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression
EMBO J. 20 24, 7052-7059
- DeCoursey, T. E. (2003)
Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways
Physiol Rev. 83 2, 475-579
- Delmolino, L. M. & Castellot, J. J., Jr. (1997)
Heparin suppresses sgk, an early response gene in proliferating vascular smooth muscle cells
J.Cell Physiol 173 3, 371-379

-
- Dieter, M., Palmada, M., Rajamanickam, J., Aydin, A., Busjahn, A., Boehmer, C., Luft, F. C. und Lang, F. (2004)
Regulation of glucose transporter SGLT1 by ubiquitin ligase Nedd4-2 and kinases SGK1, SGK3, and PKB
Obes.Res. 12 5, 862-870
- Dolinska, M., Dybel, A., Zablocka, B. und Albrecht, J. (2003)
Glutamine transport in C6 glioma cells shows ASCT2 system characteristics
Neurochem.Int. 43 4-5, 501-507
- Dolinska, M., Zablocka, B., Sonnewald, U. und Albrecht, J. (2004)
Glutamine uptake and expression of mRNA's of glutamine transporting proteins in mouse cerebellar and cerebral cortical astrocytes and neurons
Neurochem.Int. 44 2, 75-81
- Dumont, J. N. (1972)
Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals
J.Morphol. 136 2, 153-179
- Dunbar, L. A. & Caplan, M. J. (2000)
The cell biology of ion pumps: sorting and regulation
Eur.J.Cell Biol. 79 8, 557-563
- Embark, H. M., Bohmer, C., Palmada, M., Rajamanickam, J., Wyatt, A. W., Wallisch, S., Capasso, G., Waldegger, P., Seyberth, H. W., Waldegger, S. und Lang, F. (2004a)
Regulation of CLC-Ka/barttin by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum- and glucocorticoid-dependent kinases
Kidney Int. 66 5, 1918-1925
- Embark, H. M., Bohmer, C., Vallon, V., Luft, F. und Lang, F. (2003)
Regulation of KCNE1-dependent K(+) current by the serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) isoforms
Pflugers Arch. 445 5, 601-606
- Embark, H. M., Setiawan, I., Poppendieck, S., van de Graaf, S. F., Boehmer, C., Palmada, M., Wieder, T., Gerstberger, R., Cohen, P., Yun, C. C., Bindels, R. J. und Lang, F. (2004b)
Regulation of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 by the NHE regulating factor NHERF2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase isoforms SGK1 and SGK3 expressed in *Xenopus* oocytes
Cell Physiol Biochem. 14 4-6, 203-212

-
- Faletti, C. J., Perrotti, N., Taylor, S. I. und Blazer-Yost, B. L. (2002)
sgk: an essential convergence point for peptide and steroid hormone
regulation of ENaC-mediated Na⁺ transport
Am.J.Physiol Cell Physiol 282 3, C494-C500
- Fillon, S., Klingel, K., Warntges, S., Sauter, M., Gabrysch, S., Pestel, S., Tanneur,
V., Waldegger, S., Zipfel, A., Viebahn, R., Haussinger, D., Broer, S.,
Kandolf, R. und Lang, F. (2002)
Expression of the serine/threonine kinase hSGK1 in chronic viral hepatitis
Cell Physiol Biochem. 12 1, 47-54
- Fingar, D. C. & Blenis, J. (2004)
Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor
signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression
Oncogene 23 18, 3151-3171
- Firestone, G. L., Giampaolo, J. R. und O'Keeffe, B. A. (2003)
Stimulus-dependent regulation of serum and glucocorticoid inducible protein
kinase (SGK) transcription, subcellular localization and enzymatic activity
Cell Physiol Biochem. 13 1, 1-12
- Fuchs, B. C. & Bode, B. P. (2005)
Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime?
Semin.Cancer Biol. 15 4, 254-266
- Fuchs, B. C., Finger, R. E., Onan, M. C. und Bode, B. P. (2007)
ASCT2 silencing regulates mammalian target-of-rapamycin growth and
survival signaling in human hepatoma cells
Am.J.Physiol Cell Physiol 293 1, C55-C63
- Fuchs, B. C., Perez, J. C., Suetterlin, J. E., Chaudhry, S. B. und Bode, B. P. (2004)
Inducible antisense RNA targeting amino acid transporter ATB0/ASCT2
elicits apoptosis in human hepatoma cells
Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol 286 3, G467-G478
- Gao, J., Cohen, I. S., Mathias, R. T. und Baldo, G. J. (1994)
Regulation of the beta-stimulation of the Na(+)-K⁺ pump current in guinea-
pig ventricular myocytes by a cAMP-dependent PKA pathway
J.Physiol 477 (Pt 3), 373-380
- Gegelashvili, M., Rodriguez-Kern, A., Pirozhkova, I., Zhang, J., Sung, L. und
Gegelashvili, G. (2006)
High-affinity glutamate transporter GLAST/EAAT1 regulates cell surface
expression of glutamine/neutral amino acid transporter ASCT2 in human
fetal astrocytes
Neurochem.Int. 48 6-7, 611-615

-
- Gonzalez-Robayna, I. J., Alliston, T. N., Buse, P., Firestone, G. L. und Richards, J. S. (1999)
Functional and subcellular changes in the A-kinase-signaling pathway:
relation to aromatase and Sgk expression during the transition of granulosa
cells to luteal cells
Mol.Endocrinol. 13 8, 1318-1337
- Gonzalez-Robayna, I. J., Falender, A. E., Ochsner, S., Firestone, G. L. und
Richards, J. S. (2000)
Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and
activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-
Induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH
in granulosa cells
Mol.Endocrinol. 14 8, 1283-1300
- Grewer, C. & Grabsch, E. (2004)
New inhibitors for the neutral amino acid transporter ASCT2 reveal its Na⁺-
dependent anion leak
J.Physiol 557 Pt 3, 747-759
- Gunther, W., Piwon, N. und Jentsch, T. J. (2003)
The CIC-5 chloride channel knock-out mouse - an animal model for Dent's
disease
Pflugers Arch. 445 4, 456-462
- Gurdon, J. B., Lane, C. D., Woodland, H. R. und Marbaix, G. (1971)
Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its
translation in living cells
Nature 233 5316, 177-182
- Haussinger, D. (1990)
Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and
physiological relevance
Biochem.J. 267 2, 281-290
- Heckel, T., Broer, A., Wiesinger, H., Lang, F. und Broer, S. (2003)
Asymmetry of glutamine transporters in cultured neural cells
Neurochem.Int. 43 4-5, 289-298
- Hediger, M. A., Romero, M. F., Peng, J. B., Rolfs, A., Takanaga, H. und Bruford, E.
A. (2004)
The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic
implications of human membrane transport proteinsIntroduction
Pflugers Arch. 447 5, 465-468

-
- Henke, G., Maier, G., Wallisch, S., Boehmer, C. und Lang, F. (2004)
Regulation of the voltage gated K⁺ channel Kv1.3 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1
J.Cell Physiol 199 2, 194-199
- Hollister, R. D., Page, K. J. und Hyman, B. T. (1997)
Distribution of the messenger RNA for the extracellularly regulated kinases 1, 2 and 3 in rat brain: effects of excitotoxic hippocampal lesions
Neuroscience 79 4, 1111-1119
- Hong, F., Larrea, M. D., Doughty, C., Kwiatkowski, D. J., Squillace, R. und Slingerland, J. M. (2008)
mTOR-raptor binds and activates SGK1 to regulate p27 phosphorylation
Mol.Cell 30 6, 701-711
- Huang, Y., Anderle, P., Bussey, K. J., Barbacioru, C., Shankavaram, U., Dai, Z., Reinhold, W. C., Papp, A., Weinstein, J. N. und Sadee, W. (2004)
Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance
Cancer Res. 64 12, 4294-4301
- Imaizumi, K., Tsuda, M., Wanaka, A., Tohyama, M. und Takagi, T. (1994)
Differential expression of sgk mRNA, a member of the Ser/Thr protein kinase gene family, in rat brain after CNS injury
Brain Res.Mol.Brain Res. 26 1-2, 189-196
- Iyer, V. R., Eisen, M. B., Ross, D. T., Schuler, G., Moore, T., Lee, J. C., Trent, J. M., Staudt, L. M., Hudson, J., Jr., Boguski, M. S., Lashkari, D., Shalon, D., Botstein, D. und Brown, P. O. (1999)
The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum
Science 283 5398, 83-87
- Kanai, Y. & Hediger, M. A. (1992)
Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter
Nature 360 6403, 467-471
- Kanai, Y. & Hediger, M. A. (2003)
The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications
Eur.J.Pharmacol. 479 1-3, 237-247
- Kanai, Y. & Hediger, M. A. (2004)
The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects
Pflugers Arch. 447 5, 469-479

-
- Karlsen, T. V. & Serck-Hanssen, G. (2002)
Acute stimulation by IGF-I of amino acid transport system A in chromaffin cells depends on PI3 kinase activation and the electrochemical gradient of Na⁺
Ann.N.Y.Acad.Sci. 971, 573-575
- Kavanaugh, M. P., Bendahan, A., Zerangue, N., Zhang, Y. und Kanner, B. I. (1997)
Mutation of an amino acid residue influencing potassium coupling in the glutamate transporter GLT-1 induces obligate exchange
J.Biol.Chem. 272 3, 1703-1708
- Kekuda, R., Prasad, P. D., Fei, Y. J., Torres-Zamorano, V., Sinha, S., Yang-Feng, T. L., Leibach, F. H. und Ganapathy, V. (1996)
Cloning of the sodium-dependent, broad-scope, neutral amino acid transporter Bo from a human placental choriocarcinoma cell line
J Biol Chem. 271 31, 18657-18661
- Khan, A. H. & Pessin, J. E. (2002)
Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways
Diabetologia 45 11, 1475-1483
- Klingel, K., Warntges, S., Bock, J., Wagner, C. A., Sauter, M., Waldegger, S., Kandolf, R. und Lang, F. (2000)
Expression of cell volume-regulated kinase h-sgk in pancreatic tissue
Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol 279 5, G998-G1002
- Knerr, I., Weigel, C., Linnemann, K., Dotsch, J., Meissner, U., Fusch, C. und Rascher, W. (2003)
Transcriptional effects of hypoxia on fusigenic syncytin and its receptor ASCT2 in human cytotrophoblast BeWo cells and in ex vivo perfused placental cotyledons
Am.J.Obstet.Gynecol. 189 2, 583-588
- Kobayashi, T. & Cohen, P. (1999)
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 (Pt 2), 319-328
- Kobayashi, T., Deak, M., Morrice, N. und Cohen, P. (1999b)
Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase
Biochem.J. 344 Pt 1, 189-197

-
- Kobayashi, T., Deak, M., Morrice, N. und Cohen, P. (1999a)
Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase
Biochem J. 344, 189-197
- Kumar, J. M., Brooks, D. P., Olson, B. A. und Laping, N. J. (1999)
Sgk, a putative serine/threonine kinase, is differentially expressed in the kidney of diabetic mice and humans
J.Am.Soc.Nephrol. 10 12, 2488-2494
- Lang, F., Bohmer, C., Palmada, M., Seebohm, G., Strutz-Seebohm, N. und Vallon, V. (2006a)
(Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms
Physiol Rev. 86 4, 1151-1178
- Lang, F., Bohmer, C., Palmada, M., Seebohm, G., Strutz-Seebohm, N. und Vallon, V. (2006b)
(Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms
Physiol Rev. 86 4, 1151-1178
- Lang, F. & Cohen, P. (2001)
Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms
Sci.STKE. 2001 108, RE17
- 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., Hebert, S. C., Massry, S. G. und Broer, S. (2000)
Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 97 14, 8157-8162
- Lavillette, D., Marin, M., Ruggieri, A., Mallet, F., Cosset, F. L. und Kabat, D. (2002)
The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus type W uses a divergent family of amino acid transporters/cell surface receptors
J Virol. 76 13, 6442-6452
- Leong, M. L., Maiyar, A. C., Kim, B., O'Keeffe, B. A. und Firestone, G. L. (2003)
Expression of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells
J.Biol.Chem. 278 8, 5871-5882

-
- Li, R., Younes, M., Frolov, A., Wheeler, T. M., Scardino, P., Otori, M. und Ayala, G. (2003)
Expression of neutral amino acid transporter ASCT2 in human prostate
Anticancer Res. 23 4, 3413-3418
- Liu, D., Yang, X. und Songyang, Z. (2000)
Identification of CISK, a new member of the SGK kinase family that promotes IL-3-dependent survival
Curr.Biol. 10 19, 1233-1236
- Loffing, J., Zecevic, M., Feraille, E., Kaissling, B., Asher, C., Rossier, B. C., Firestone, G. L., Pearce, D. und Verrey, F. (2001)
Aldosterone induces rapid apical translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK
Am.J.Physiol Renal Physiol 280 4, F675-F682
- Macheda, M. L., Rogers, S. und Best, J. D. (2005)
Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer
J.Cell Physiol 202 3, 654-662
- Maiyar, A. C., Huang, A. J., Phu, P. T., Cha, H. H. und Firestone, G. L. (1996)
p53 stimulates promoter activity of the sgk. serum/glucocorticoid-inducible serine/threonine protein kinase gene in rodent mammary epithelial cells
J.Biol.Chem. 271 21, 12414-12422
- Maiyar, A. C., Phu, P. T., Huang, A. J. und Firestone, G. L. (1997)
Repression of glucocorticoid receptor transactivation and DNA binding of a glucocorticoid response element within the serum/glucocorticoid-inducible protein kinase (sgk) gene promoter by the p53 tumor suppressor protein
Mol.Endocrinol. 11 3, 312-329
- Marin, M., Lavillette, D., Kelly, S. M. und Kabat, D. (2003)
N-linked glycosylation and sequence changes in a critical negative control region of the ASCT1 and ASCT2 neutral amino acid transporters determine their retroviral receptor functions
J Virol. 77 5, 2936-2945
- Mazurek, S. & Eigenbrodt, E. (2003)
The tumor metabolome
Anticancer Res. 23 2A, 1149-1154
- Medina, M. A., Marquez, J. und Nunez, d. C., I (1992a)
Interchange of amino acids between tumor and host
Biochem.Med.Metab Biol. 48 1, 1-7

-
- Medina, M. A., Sanchez-Jimenez, F., Marquez, J., Rodriguez, Q. A. und Nunez, d. C., I (1992b)
Relevance of glutamine metabolism to tumor cell growth
Mol.Cell Biochem. 113 1, 1-15
- Meier, C., Ristic, Z., Klauser, S. und Verrey, F. (2002)
Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates
EMBO J. 21 4, 580-589
- Meijer, A. J. (2003)
Amino acids as regulators and components of nonproteinogenic pathways
J.Nutr. 133 6 Suppl 1, 2057S-2062S
- Mikosz, C. A., Brickley, D. R., Sharkey, M. S., Moran, T. W. und Conzen, S. D. (2001)
Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, sgk-1
J.Biol.Chem. 276 20, 16649-16654
- Mita, M. M., Mita, A. und Rowinsky, E. K. (2003)
The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer
Cancer Biol.Ther. 2 4 Suppl 1, S169-S177
- Mizuno, H. & Nishida, E. (2001)
The ERK MAP kinase pathway mediates induction of SGK (serum- and glucocorticoid-inducible kinase) by growth factors
Genes Cells 6 3, 261-268
- Muller, V. & Gruber, G. (2003)
ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters
Cell Mol.Life Sci. 60 3, 474-494
- Naray-Fejes-Toth, A. (1999)
Sgk: A New Player (Star?) in the Early Action of Aldosterone
News Physiol Sci. 14, 274-275
- Naray-Fejes-Toth, A., Canessa, C., Cleaveland, E. S., Aldrich, G. und Fejes-Toth, G. (1999)
sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial na⁺ channels
J.Biol.Chem. 274 24, 16973-16978

-
- Naray-Fejes-Toth, A. & Fejes-Toth, G. (2000)
The sgk, an aldosterone-induced gene in mineralocorticoid target cells, regulates the epithelial sodium channel
Kidney Int. 57 4, 1290-1294
- Naray-Fejes-Toth, A., Helms, M. N., Stokes, J. B. und Fejes-Toth, G. (2004)
Regulation of sodium transport in mammalian collecting duct cells by aldosterone-induced kinase, SGK1: structure/function studies
Mol.Cell Endocrinol. 217 1-2, 197-202
- Oppedisano, F., Pochini, L., Galluccio, M. und Indiveri, C. (2007)
The glutamine/amino acid transporter (ASCT2) reconstituted in liposomes: transport mechanism, regulation by ATP and characterization of the glutamine/glutamate antiport
Biochim.Biophys.Acta 1768 2, 291-298
- Oxender, D. L. & Christensen, H. N. (1963)
Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell
DISTINCT MEDIATING SYSTEMS FOR THE TRANSPORT OF NEUTRAL AMINO ACIDS BY THE EHRlich CELL
J.Biol.Chem. 238, 3686-3699
- Palmada, M., Dieter, M., Boehmer, C., Waldegger, S. und Lang, F. (2004a)
Serum and glucocorticoid inducible kinases functionally regulate CIC-2 channels
Biochem.Biophys.Res.Comm. 321 4, 1001-1006
- Palmada, M., Dieter, M., Speil, A., Bohmer, C., Mack, A. F., Wagner, H. J., Klingel, K., Kandolf, R., Murer, H., Biber, J., Closs, E. I. und Lang, F. (2004b)
Regulation of intestinal phosphate cotransporter NaPi IIb by ubiquitin ligase Nedd4-2 and by serum- and glucocorticoid-dependent kinase 1
Am J Physiol Gastrointest.Liver Physiol 287 1, G143-G150
- Palmada, M., Embark, H. M., Wyatt, A. W., Bohmer, C. und Lang, F. (2003a)
Negative charge at the consensus sequence for the serum- and glucocorticoid-inducible kinase, SGK1, determines pH sensitivity of the renal outer medullary K⁺ channel, ROMK1
Biochem Biophys.Res.Comm. 307 4, 967-972
- Palmada, M., Embark, H. M., Yun, C., Bohmer, C. und Lang, F. (2003b)
Molecular requirements for the regulation of the renal outer medullary K⁽⁺⁾ channel ROMK1 by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1
Biochem.Biophys.Res.Comm. 311 3, 629-634

-
- Park, J., Leong, M. L., Buse, P., Maiyar, A. C., Firestone, G. L. und Hemmings, B. A. (1999)
Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway
EMBO J. 18 11, 3024-3033
- Pawlik, T. M., Souba, W. W., Sweeney, T. J. und Bode, B. P. (2000)
Phorbol esters rapidly attenuate glutamine uptake and growth in human colon carcinoma cells
J.Surg.Res. 90 2, 149-155
- Pearce, D. (2003)
SGK1 Regulation of Epithelial Sodium Transport
Cell Physiol Biochem 13, 013-020
- Peng, T., Golub, T. R. und Sabatini, D. M. (2002)
The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation
Mol.Cell Biol. 22 15, 5575-5584
- Pines, G., Danbolt, N. C., Bjoras, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E. und Kanner, B. I. (1992)
Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter
Nature 360 6403, 464-467
- Pollard TD & Earnshaw WC (2002)
Cell Biology
- Proud, C. G. (2002)
Regulation of mammalian translation factors by nutrients
Eur.J.Biochem. 269 22, 5338-5349
- Rasko, J. E., Battini, J. L., Gottschalk, R. J., Mazo, I. und Miller, A. D. (1999)
The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96 5, 2129-2134
- Sawyers, C. L. (2003)
Will mTOR inhibitors make it as cancer drugs?
Cancer Cell 4 5, 343-348
- Schniepp, R., Kohler, K., Ladewig, T., Guenther, E., Henke, G., Palmada, M., Boehmer, C., Rothstein, J. D., Broer, S. und Lang, F. (2004)

-
- Retinal colocalization and in vitro interaction of the glutamate transporter EAAT3 and the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 [correction]
Invest Ophthalmol.Vis.Sci. 45 5, 1442-1449
- Shafqat, S., Tamarappoo, B. K., Kilberg, M. S., Puranam, R. S., McNamara, J. O., Guadano-Ferraz, A. und Fremeau, R. T., Jr. (1993)
Cloning and expression of a novel Na(+)-dependent neutral amino acid transporter structurally related to mammalian Na+/glutamate cotransporters
J.Biol.Chem. 268 21, 15351-15355
- Sidoryk, M., Matyja, E., Dybel, A., Zielinska, M., Bogucki, J., Jaskolski, D. J., Liberski, P. P., Kowalczyk, P. und Albrecht, J. (2004)
Increased expression of a glutamine transporter SNAT3 is a marker of malignant gliomas
Neuroreport 15 4, 575-578
- Sims, K. D., Straff, D. J. und Robinson, M. B. (2000)
Platelet-derived growth factor rapidly increases activity and cell surface expression of the EAAC1 subtype of glutamate transporter through activation of phosphatidylinositol 3-kinase
J.Biol.Chem. 275 7, 5228-5237
- Staub, O., Gautschi, I., Ishikawa, T., Breitschopf, K., Ciechanover, A., Schild, L. und Rotin, D. (1997a)
Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination
EMBO J. 16 21, 6325-6336
- Staub, O., Yeger, H., Plant, P. J., Kim, H., Ernst, S. A. und Rotin, D. (1997b)
Immunolocalization of the ubiquitin-protein ligase Nedd4 in tissues expressing the epithelial Na⁺ channel (ENaC)
Am.J.Physiol 272 6 Pt 1, C1871-C1880
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K. und Stoffel, W. (1992)
Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 89 22, 10955-10959
- Susa, M., Hacker, J. und Marre, R. (1996)
De novo synthesis of Legionella pneumophila antigens during intracellular growth in phagocytic cells
Infect.Immun. 64 5, 1679-1684

-
- Sutherland, E. W., Jr. & Wosilait, W. D. (1955)
Inactivation and activation of liver phosphorylase
Nature 175 4447, 169-170
- Taylor, C. S., Marin, M., Nouri, A., Kavanaugh, M. P., und Kabat, D. (2001)
Truncated forms of the dual function human ASCT2 neutral amino acid transporter/retroviral receptor are translationally initiated at multiple alternative CUG and GUG codons
J.Biol.Chem. 276 29, 27221-27230
- Taylor, C. S., Nouri, A., Zhao, Y., Takeuchi, Y. und Kabat, D. (1999)
A sodium-dependent neutral-amino-acid transporter mediates infections of feline and baboon endogenous retroviruses and simian type D retroviruses
J.Virol. 73 5, 4470-4474
- Torres-Zamorano, V., Leibach, F. H. und Ganapathy, V. (1998)
Sodium-dependent homo- and hetero-exchange of neutral amino acids mediated by the amino acid transporter ATB degree
Biochem.Biophys.Res.Comm. 245 3, 824-829
- Utsunomiya-Tate, N., Endou, H. und Kanai, Y. (1996)
Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter
J Biol Chem. 271 25, 14883-14890
- Vereninov, A. A., Vasil'eva, I. O., Iurinskaia, V. E., Matveev, V. V. und Glushankova, L. N. (2001)
[Study of "group" expression of mRNA of the ion transporters ATP1B1, NHE1 and NKCC1, beta-actin, glycerophosphosphate dehydrogenase, proteins regulating proliferation and apoptosis of p53, Bcl-2, IL-2 and hSGK kinase at the prereplicative stage of human lymphocyte activation]
Tsitologija 43 6, 613-618
- Verrey, F. (1999)
Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport
Am.J.Physiol 277 3 Pt 2, F319-F327
- Verrey, F. (2003)
System L: heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport
Pflugers Arch. 445 5, 529-533

-
- Virkkamaki, A., Ueki, K. und Kahn, C. R. (1999)
Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance
J Clin. Invest 103 7, 931-943
- Wagner, C. A., Friedrich, B., Setiawan, I., Lang, F. und Broer, S. (2000)
The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins
Cell Physiol Biochem. 10 1-2, 1-12
- Wagner, C. A., Ott, M., Klingel, K., Beck, S., Melzig, J., Friedrich, B., Wild, K. N., Broer, S., Moschen, I., Albers, A., Waldegger, S., Tummler, B., Egan, M. E., Geibel, J. P., Kandolf, R. und Lang, F. (2001)
Effects of the serine/threonine kinase SGK1 on the epithelial Na(+) channel (ENaC) and CFTR: implications for cystic fibrosis
Cell Physiol Biochem. 11 4, 209-218
- Waldegger, S., Barth, P., Forrest, J. N., Jr., Greger, R. und Lang, F. (1998a)
Cloning of sgk serine-threonine protein kinase from shark rectal gland - a gene induced by hypertonicity and secretagogues
Pflugers Arch. 436 4, 575-580
- Waldegger, S., Barth, P., Raber, G. und Lang, F. (1997)
Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 94 9, 4440-4445
- Waldegger, S., Erdel, M., Nagl, U. O., Barth, P., Raber, G., Steuer, S., Utermann, G., Paulmichl, M. und Lang, F. (1998b)
Genomic organization and chromosomal localization of the human SGK protein kinase gene
Genomics 51 2, 299-302
- Waldegger, S., Gabrysch, S., Barth, P., Fillon, S. und 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 4, 203-208
- Waldegger, S., Klingel, K., Barth, P., Sauter, M., Rfer, M. L., Kandolf, R. und Lang, F. (1999)
h-sgk serine-threonine protein kinase gene as transcriptional target of transforming growth factor beta in human intestine
Gastroenterology 116 5, 1081-1088

-
- Wang, J., Barbry, P., Maiyar, A. C., Rozansky, D. J., Bhargava, A., Leong, M., Firestone, G. L. und Pearce, D. (2001)
SGK integrates insulin and mineralocorticoid regulation of epithelial sodium transport
Am.J.Physiol Renal Physiol 280 2, F303-F313
- Wang, W. & Malcolm, B. A. (1999)
Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis
Biotechniques 26 4, 680-682
- Warntges, S., Friedrich, B., Henke, G., Duranton, C., Lang, P. A., Waldegger, S., Meyermann, R., Kuhl, D., Speckmann, E. J., Obermuller, N., Witzgall, R., Mack, A. F., Wagner, H. J., Wagner, A., Broer, S. und Lang, F. (2002)
Cerebral localization and regulation of the cell volume-sensitive serum- and glucocorticoid-dependent kinase SGK1
Pflugers Arch. 443 4, 617-624
- Wasa, M., Bode, B. P. und Souba, W. W. (1996)
Adaptive regulation of amino acid transport in nutrient-deprived human hepatomas
Am.J.Surg. 171 1, 163-169
- Wasa, M., Wang, H. S. und Okada, A. (2002)
Characterization of L-glutamine transport by a human neuroblastoma cell line
Am.J.Physiol Cell Physiol 282 6, C1246-C1253
- Webster, M. K., Goya, L. und Firestone, G. L. (1993a)
Immediate-early transcriptional regulation and rapid mRNA turnover of a putative serine/threonine protein kinase
J.Biol.Chem. 268 16, 11482-11485
- Webster, M. K., Goya, L., Ge, Y., Maiyar, A. C. und Firestone, G. L. (1993b)
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 4, 2031-2040
- Wieland, H., Ullrich, S., Lang, F. und Neumeister, B. (2005)
Intracellular multiplication of Legionella pneumophila depends on host cell amino acid transporter SLC1A5
Mol.Microbiol. 55 5, 1528-1537

-
- Windmueller, H. G. & Spaeth, A. E. (1974)
Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine
J.Biol.Chem. 249 16, 5070-5079
- Witte, D., Ali, N., Carlson, N. und Younes, M. (2002)
Overexpression of the neutral amino acid transporter ASCT2 in human
colorectal adenocarcinoma
Anticancer Res. 22 5, 2555-2557
- Wolfgang, C. L., Lin, C., Meng, Q., Karinch, A. M., Vary, T. C. und Pan, M. (2003)
Epidermal growth factor activation of intestinal glutamine transport is
mediated by mitogen-activated protein kinases
J Gastrointest.Surg 7 1, 149-156
- Yamamoto, T., Nishizaki, I., Furuya, S., Hirabayashi, Y., Takahashi, K., Okuyama,
S. und Yamamoto, H. (2003)
Characterization of rapid and high-affinity uptake of L-serine in neurons and
astrocytes in primary culture
FEBS Lett. 548 1-3, 69-73
- Yun, C. C., Palmada, M., Embark, H. M., Fedorenko, O., Feng, Y., Henke, G.,
Setiawan, I., Boehmer, C., Weinman, E. J., Sandrasagra, S., Korbmacher,
C., Cohen, P., Pearce, D. und Lang, F. (2002)
The serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 and the Na⁺/H⁺
exchange regulating factor NHERF2 synergize to stimulate the renal outer
medullary K⁺ channel ROMK1
J.Am.Soc.Nephrol. 13 12, 2823-2830
- Zerangue, N. & Kavanaugh, M. P. (1996a)
ASCT-1 is a neutral amino acid exchanger with chloride channel activity
J.Biol.Chem. 271 45, 27991-27994
- Zerangue, N. & Kavanaugh, M. P. (1996b)
Interaction of L-cysteine with a human excitatory amino acid transporter
J.Physiol 493 (Pt 2), 419-423
- Zhang, Y., Bendahan, A., Zerbiv, R., Kavanaugh, M. P. und Kanner, B. I. (1998)
Molecular determinant of ion selectivity of a (Na⁺ + K⁺)-coupled rat brain
glutamate transporter
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 95 2, 751-755
- Zhang, Y. & Kanner, B. I. (1999)
Two serine residues of the glutamate transporter GLT-1 are crucial for
coupling the fluxes of sodium and the neurotransmitter
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96 4, 1710-1715

Zhou, R. & Snyder, P. M. (2005)
Nedd4-2 phosphorylation induces serum and glucocorticoid-regulated
kinase (SGK) ubiquitination and degradation
J.Biol.Chem. 280 6, 4518-4523.

Anhang

6.1 Danksagung

Viele Menschen haben an der Entstehung die Arbeit mitgewirkt, Ihnen allen möchte ich an dieser Stelle danken.

Besonders gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Florian Lang. Seine Begeisterung für die Physiologie und die Forschung motivierte mich und ließ die Arbeit in dieser Form erst entstehen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Christoph Böhmer, der mich als Laborleiter in die Elektrophysiologie einführte und mir vom ersten Tag an immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Gleichermäßen gilt mein Dank Monica Palmada für ihre Arbeit an den Transportern und ihre geduldige Anleitung und Hilfe im Isotopenlabor.

Mein ganz besonderer Dank gilt selbstverständlich auch allen Mitarbeitern im Oozyten-Labor, allen voran Birgitta Noll für ihre molekularbiologischen Arbeiten und ihre Hilfsbereitschaft.

Alexandra Niskios danke ich für ihre Unterstützung und ihre unerschöpfliche Geduld.