

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen

Abteilung Physiologie I

Direktor: Professor Dr. F. Lang

**Die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase
und ihre Wirkung auf die Membrantransporter SMIT,
PepT2 und B⁰AT**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard Karls Universität

zu Tübingen

vorgelegt von Fabian Klaus

aus Tuttlingen

2011

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichtstatter: Professor Dr. F. Lang

2. Berichtstatter: Professor Dr. C. Korbmacher

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung.....	8
1.1	Stofftransport über die Zellmembran	8
1.2	Die Gruppe der Solute Carrier (SLC)	10
1.2.1	SMIT (SLC5A3).....	11
1.2.2	PepT1 und PepT2 (SLC15A1 und SLC15A2).....	14
1.2.3	B ⁰ AT (SLC6A19)	16
1.3	Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase	17
1.3.1	Einordnung der SGK innerhalb der Proteinkinasen	18
1.3.2	Isoformen und Gewebeverteilung der SGK	18
1.3.3	Stimulation der SGK	19
1.3.4	Halbwertszeit und Abbau der SGK	23
1.3.5	Die physiologische Funktion der SGK.....	24
1.3.6	Pathophysiologie der SGK1	25
1.4	Proteinkinase B	26
1.5	Na ⁺ /H ⁺ exchanger regulatory factor	27
1.6	Nedd4-2.....	28
1.7	Dynamin	29
1.8	Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> als Expressionssystem.....	31
1.9	Fragestellung der Arbeit	33
2	Material und Methoden.....	35
2.1	Oozytenpräparation von <i>Xenopus laevis</i>	35
2.1.1	Oozytengewinnung	35
2.1.2	Aufbereitung der entnommenen Oozyten	37
2.2	Herstellung und Injektion der cRNA.....	38
2.2.1	Amplifizierung der cDNA.....	38

2.2.2	Linearisierung der Plasmid-DNA.....	39
2.2.3	cRNA-Synthese	40
2.2.4	Injektion der cRNA in die Oozyten	41
2.3	Zielgerichtete Mutagenese	42
2.3.1	Herstellung des HA-Tag von SMIT1	42
2.3.2	Herstellung der PepT2-Mutanten ^{S185A} PepT2 und PepT2ΔC	43
2.3.3	Herstellung des B ^O AT-HA-Tag und der Mutanten ^{S100A} B ^O AT	43
2.4	Lösungen und Substrate	44
2.4.1	ND96- und OR2-Lösung	44
2.4.2	Kollagenase-Lösung	45
2.4.3	Voltage-Clamp-Perfusionslösungen.....	45
2.4.4	Brefeldin A Lösung.....	45
2.4.5	DYNASORE-Lösung.....	46
2.5	Elektrophysiologische Messungen	47
2.5.1	Durchführung der elektrophysiologischen Experimente.....	47
2.5.2	Current clamp (Potentialmessung).....	48
2.5.3	Voltage clamp (TEVC)	49
2.5.4	Auswertung und Statistik der Voltage-Clamp-Versuche	50
2.6	Tracer flux Messungen bei SMIT1	52
2.7	Oberflächenexpressions-Messungen von SMIT1 mittels HA-Tag und Chemilumineszenz.....	53
2.8	Oberflächenexpressions-Messungen von PepT2 mittels Membranfraktion-Isolation und Chemilumineszenz	54
2.9	Oberflächenexpressions-Messungen von B ^O AT.....	55
2.10	Western-Blot Experimente für SGK1, NHERF1 und NHERF2	56
2.11	Fehlerdiskussion	57

2.11.1	Präparation der Oozyten.....	57
2.11.2	Lösungen und Geräte.....	57
2.11.3	Auswertung.....	58
3	Versuche und Ergebnisse	59
3.1	Ergebnisse zum Myo-Inositol-Transporter SMIT1 (SLC5A3).....	59
3.1.1	Die SGK1 stimuliert den Myo-Inositol-Transporter SMIT1	59
3.1.2	Die Myo-Inositol Aufnahme wird durch SGK1 stimuliert.....	60
3.1.3	Die SGK-Isoformen und die PKB stimulieren SMIT1	61
3.1.4	Die Stimulation von SMIT1 durch die SGK-Isoformen hängt vom katalytischen Zentrum der jeweiligen Kinase ab.....	62
3.1.5	SMIT1 wird durch die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 reguliert.....	64
3.1.6	Die SGK erhöht die maximale Transportrate von SMIT1 ohne Änderung der Substrat-Affinität	65
3.1.7	Die SGK1 stabilisiert den SMIT1 in der Oozytenmembran	70
3.2	Ergebnisse zum Oligo-Peptid-Transporter PepT2 (SLC15A2)	72
3.2.1	SGK1 und NHERF2, nicht aber NHERF1, stimulieren PepT2	72
3.2.2	Der stimulative Effekt von SGK1 auf PepT2 wird durch Mutation der Phosphorylierungsstelle von PepT2 aufgehoben	76
3.2.3	Die zweite PDZ-Domäne des NHERF2 ist für die Aktivierung des PepT2 erforderlich.....	78
3.2.4	Das PDZ Bindungsmotiv am C-Terminus von PepT2 ist für die Interaktion mit NHERF2 verantwortlich.....	79
3.2.5	^{S422D} SGK1 und NHERF2 erhöhen die maximale Transportrate von PepT2 ohne Änderung der Substrat-Affinität.....	81
3.2.6	Die SGK1 und NHERF2 erhöhen die Transporterdichte von PepT2 in der Oozytenmembran.....	83
3.2.7	Die SGK1 und NHERF2 stabilisieren PepT2 in der Oozytenmembran.....	84

3.2.8	SGK1 und NHERF2 stimulieren PepT2 unabhängig.....	85
3.2.9	Der Natrium-Protonen-Austauscher NHE3 stimuliert PepT2	87
3.3	Ergebnisse zum Aminosäure-Transporter B ^o AT (SLC6A19)	89
3.3.1	Die Isoformen der SGK stimulieren den B ^o AT	89
3.3.2	Der stimulative Effekt von SGK1 auf B ^o AT wird durch Mutation der Phosphorylierungsstelle von B ^o AT aufgehoben	92
3.3.3	Durch die Mutation des B ^o AT verändern sich die kinetischen Eigenschaften des Transporters nicht	94
3.3.4	Die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 spielt in der Regulation von B ^o AT keine Rolle.....	96
3.3.5	Die SGK erhöht die maximale Transportrate von B ^o AT (SLC6A19) ohne Änderung der Substrat-Affinität	97
3.3.6	Die SGK erhöht die Transporterdichte von B ^o AT in der Oozytenmembran.....	100
3.3.7	Die SGK stabilisiert den BoAT in der Oozytenmembran.....	102
4	Diskussion und Interpretation	104
4.1	Regulation des Myo-Inositol-Transporter SMI1 (SLC5A3)	104
4.2	Regulation des Oligo-Peptid-Transporter PepT2 (SLC15A2)	109
4.3	Regulation des Aminosäure-Transporters B ^o AT (SLC6A19)	115
5	Zusammenfassung	120
6	Literatur	122
6.1	Abkürzungen	122
6.2	Literaturverzeichnis	123
7	Anhang	137
7.1	Danksagung	137
7.2	Lebenslauf.....	138
7.3	Publikationsliste.....	139

1 Einleitung

1.1 Stofftransport über die Zellmembran

Zellmembranen sind für lebende Systeme unabdingbare Bestandteile. Sie bilden die schützende Barriere zwischen dem Zytoplasma in dem alle Stoffwechselfvorgänge in geregelter Art und Weise ablaufen und der „chaotischen“ Außenwelt. Zelluläre Membranen bestehen zu einem hohen Prozentsatz aus Lipiden, speziell aus Phosphoglyceriden und Sphingolipiden. Dazu legen sich die hydrophoben Kohlenhydratketten benachbarter Phosphoglyceride aneinander, während sich die hydrophilen Teilabschnitte Richtung wässriger Phase ausrichten. So entsteht die sogenannte „Bilayer“-Struktur biologischer Membranen. Für fettlösliche Substanzen sind Zellmembranen weitestgehend permeabel. Ionen, Aminosäuren, Kohlenhydrate und hydrophile Substanzen können die intakte Zellmembran hingegen nahezu nicht passieren. Hierfür sind integrale Membranproteine und Ionenkanäle in die Zellmembran eingelassen.

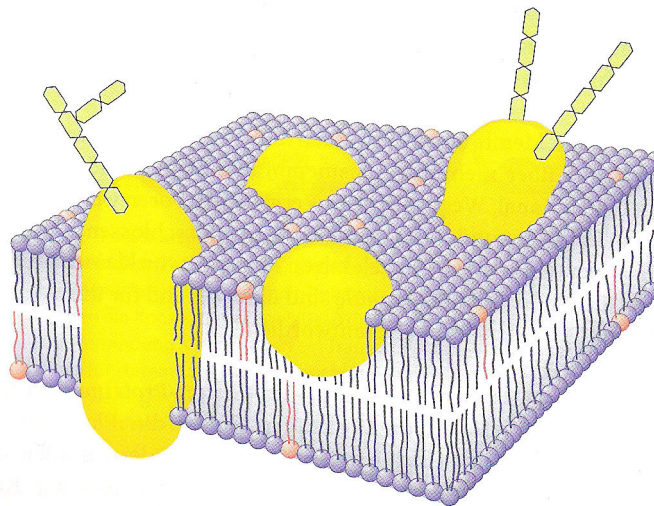


Abbildung 1: Dreidimensionale Struktur einer Zellmembran: Blau imponieren die Phospholipide. Die Membranproteine sind in gelber Farbe dargestellt und durchziehen die Zellmembran. Die Kohlenhydratketten sind nach extrazellulär (oben innerhalb der Abb.) gerichtet. Löffler; Basiswissen Biochemie; Springer Verlag

Prinzipiell sind für den Transport von Stoffen über die Zellmembran drei verschiedene Klassen von Membranproteinen verantwortlich. Zum einen sogenannte Zellporen oder „Gap junctions“. Sie werden durch eine Anordnung

mehrerer Connexine gebildet und ermöglichen einen sehr unspezifischen aber von der Kapazität her gesehenen hohen Stoffaustausch. Die nächste Gruppe bilden die Membrankanäle. Sie bilden einen wassergefüllten Durchgang für Ionen, der sich entweder spannungsabhängig, ligandengesteuert oder spontan öffnet. Membrantransporter bilden die letzte Gruppe. Hier kommt es zu keiner Porenbildung, sondern die Membrantransporter binden ihr Substrat und transportieren das Substrat durch eine Änderung ihrer dreidimensionalen Konformation nach intrazellulär oder extrazellulär. Diese Art des Transports ist sehr viel spezifischer aber auch quantitativ limitierend. Mechanistisch kommen bei Membrantransportern drei verschiedene Typen von Transportvorgängen zum Tragen:

1. Erleichterte Diffusion: Hier wird ein Molekül durch die Membran entlang eines chemischen oder elektrischen Gradienten transportiert. Die Höhe des Gradienten ist für die Transportgeschwindigkeit verantwortlich. Zusätzliche Energie wird nicht benötigt.
2. Primär aktiver Transport: Hier wird das zu transportierende Molekül oder Ion gegen einen chemischen oder elektrischen Gradienten transportiert. Die Energie wird aus der Hydrolyse des ATP (Adenosintriphosphat) gewonnen. Als Beispiel kann die Na^+K^+ -ATPase angeführt werden. Sie transportiert 3 Na^+ -Ionen im Austausch für 2 K^+ -Ionen von intra- nach extrazellulär.
3. Sekundär aktiver Transport: Auch hier wird das zu transportierende Molekül gegen den chemischen oder elektrischen Gradienten transportiert. Die Energie hierfür wird allerdings aus einer anderen Quelle als dem ATP gewonnen. Für diese Transportform kann als Beispiel der Natrium-Protonen-Austauscher NHE3 herangezogen werden. Er transportiert H^+ -Ionen gegen ihren Gradienten im Austausch gegen Natrium-Ionen. Der Natrium-Gradient dient dabei als Energiequelle. Die Na^+K^+ -ATPase hält den Natrium-Gradienten aufrecht und liefert so indirekt die benötigte Energie.

1.2 Die Gruppe der SoLute Carrier (SLC)

Die Gruppe der **SoLute Carrier** umfasst mehr als 300 Mitglieder, die in 47 Familien untergliedert sind (77). Die Einteilung der Transporter in die einzelnen Familien beruht auf einem Vorschlag der „Human Genome Organization“ (HUGO). Per Definition müssen die Transporter innerhalb einer Familie mindestens 20-25 % Sequenzhomologie aufweisen, wohingegen zwischen den einzelnen Familien keine bzw. nur eine mäßige Übereinstimmung zu finden ist (77). Daher ist nicht die evolutionsbedingte Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Familien von Bedeutung, sondern die funktionalen Gemeinsamkeiten der Transporter, wie beispielsweise die Tatsache, dass es sich um transmembranäre Proteine handelt, die den Stofftransport über die Membran bewerkstelligen.

Auf Grund dieser Einschlusskriterien sind die durch SoLute Carrier transportierten Teilchen sehr unterschiedlich und beinhalten sowohl Ionen als auch ungeladene Moleküle. Der Transport folgt grundsätzlich entweder dem elektrochemischen Gradienten oder ist sekundär aktiv (77). Primär aktiver Transport kommt innerhalb der Gruppe der SLC's nicht vor (77).

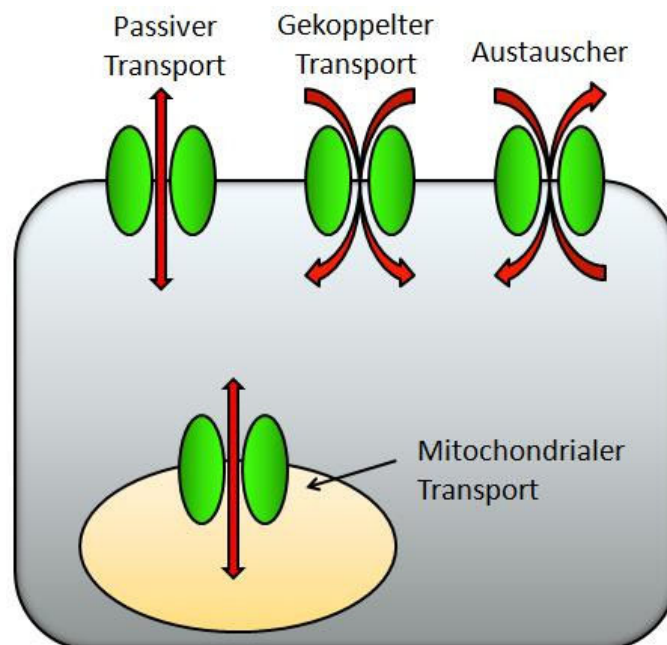


Abbildung 2: Mögliche Transport-Mechanismen der SoLute Carrier: Innerhalb der Gruppe der SoLute Carrier kommen neben Transportern, die als Austauscher fungieren, Membrantransporter vor, die sekundär aktiv oder passiv durch Diffusion entlang des elektrochemischen Gradienten transportieren.

Strukturell weisen die SLCs hydrophobe α -Helices auf, die das Protein in der Zellmembran verankern. Zwischen den einzelnen α -Helices liegen hydrophile extra- oder intrazelluläre Schleifen. Ihre funktionelle Aktivität erlangen sie als Monomere oder als Polymere, wobei polymere Strukturverbände entweder aus einem SLC-Typ bestehen oder wie beim 4F2hc/LAT (SLC7A5/SLC3A2) aus zwei verschiedenen SLCs (167). Neben ihrer hauptsächlichen Lage innerhalb der äußeren Zellmembran kommen einige SoLute Carrier auch in mitochondrialen Membranen (hier wäre vor allem die Gruppe 25 zu nennen) und in intrazellulären Organellen vor (130).

Die Nomenklatur der SLC soll am Beispiel des SLC6A19 erläutert werden.

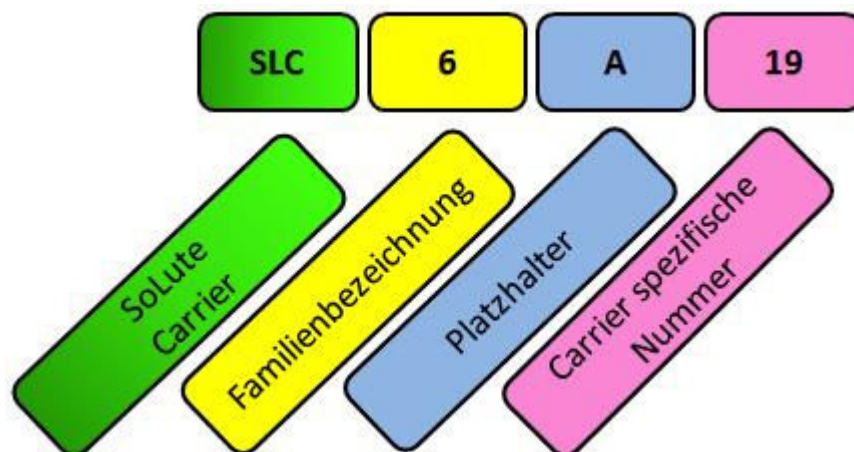


Abbildung 3: Nomenklatur der SLCs: Nach der allgemeinen Bezeichnung als SoLute Carrier (SLC) an erster Stelle folgt an zweiter Stelle die Familie (zwischen 1-47). Das A dient als Platzhalter zwischen der Familienbezeichnung und der an vierter und letzter Stelle stehenden Zahl für den einzelnen Transporter.

1.2.1 SMIT (SLC5A3)

Der Myo-Inositol Transporter SMIT (SLC5A3) spielt bei der langfristigen Zellvolumenregulation eine entscheidende Rolle (104). Wird eine Zelle einer hyperosmolaren Umgebung ausgesetzt, so wird der Zelle Wasser entzogen und die Zelle schrumpft. Um dem Schrumpfen entgegen zu wirken, nimmt die Zelle Ionen auf, was die Osmolarität des Intrazellularraums erhöht und den Wasserverlust begrenzt. Eine Erhöhung der intrazellulären Elektrolytkonzentration, wie sie bei hyperosmolaren Bedingungen vorkommt, stört mit der Zeit zunehmend die Funktion von Enzymen und

Stoffwechselfvorgängen innerhalb der Zelle (180). Deshalb versucht die Zelle den osmotischen Druck längerfristig nicht über Ionen sondern über kleine osmotisch aktive Teilchen wie Myo-Inositol oder Taurin aufrechtzuerhalten. Taurin und Myo-Inositol verändern im Gegensatz zu Ionen die Funktion von Enzymen nicht (68). Eine Anreicherung von Myo-Inositol und Taurin im Intrazellularraum erfolgt über Membrantransporter wie den SMIT (13) oder den TAUT. Unter hyperosmolaren Bedingungen wie sie beispielsweise im Tubulussystem der Niere vorkommen wird die Transkription von SMIT-RNA in kürzester Zeit aufreguliert (104). Mit Hilfe von klinischen Versuchen an Ratten konnte gezeigt werden, dass eine pharmakologische Blockierung des SMIT zu einem akuten Nierenversagen führt (93). Transkriptionell werden der SMIT und andere Osmolyt-Transporter über das sogenannte „tonicity enhancer binding protein“ (TonEBP), welches als Transkriptionsfaktor fungiert, reguliert (120). Unter hyperosmolaren Bedingungen wird TonEBP aktiviert und bindet innerhalb der SMIT Promotorregion an „tonicity responsive enhancers“ (TonE), was eine erhöhte Rate an mRNA-Transkripten zur Folge hat (137). „Tonicity responsive elements“ wurden des Weiteren in den Promotorregionen der Osmolyt-Transporter BGT1 (156) und TAUT (85) gefunden.

1991 gelang es Kwon et al. den Myo-Inositol-Transporter SMIT zu klonieren. Das SMIT-Gen weist eine Länge von 2870 Basen auf. Daraus resultiert ein Protein der Länge von 718 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 79,5 kDa (104). Das Protein weist dabei in bestimmten Regionen ein hohes Maß an Homologie mit den natriumgekoppelten Glukosetransportern (SGLT) des proximalen Tubulus und Mukosa des Dünndarms auf (76), (78).

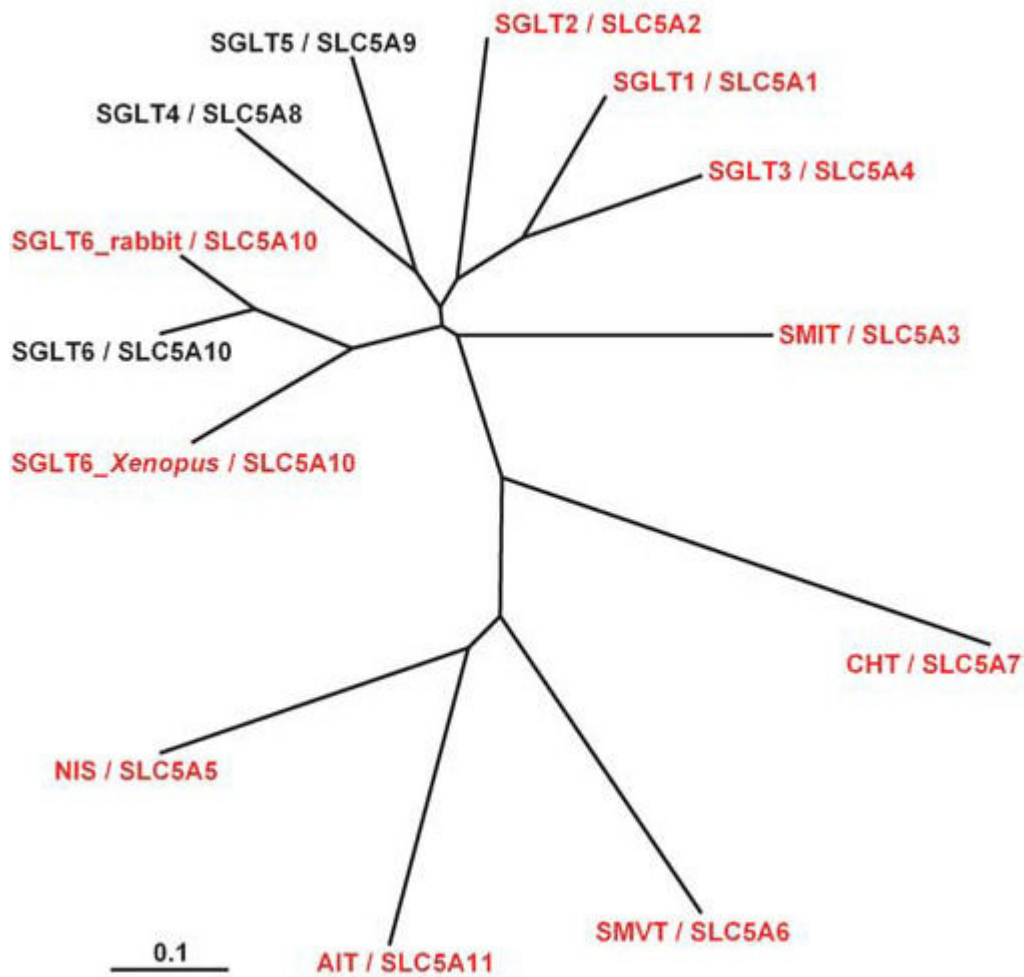


Abbildung 4: Stammbaum der SLC5Axx Familie: Die einzelnen SLC5Axx-Subtypen sind der Ähnlichkeit ihrer Primärstruktur nach angeordnet. Dabei stehen diejenigen Subtypen, die ein hohes Maß an Homologie aufweisen nahe beieinander. Rot (bzw. hellgrau) hinterlegt sind die Subspezies für die der Membrantransport bereits nachgewiesen ist. Abbildung aus Wright et al. (2003)

Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz beträgt 46 %, wobei die ersten 540 Aminosäuren sogar 54 % Homologie aufweisen (104). Das SMIT-Protein enthält insgesamt 12-13 hydrophobe Domänen, mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C und cAMP-abhängige Proteinkinasen. Die größten strukturellen Unterschiede in Bezug auf die natriumgekoppelten Glukosetransporter sind die auf die sechste und elfte Transmembrandomäne folgenden intra- bzw. extrazellulären Schleifen.

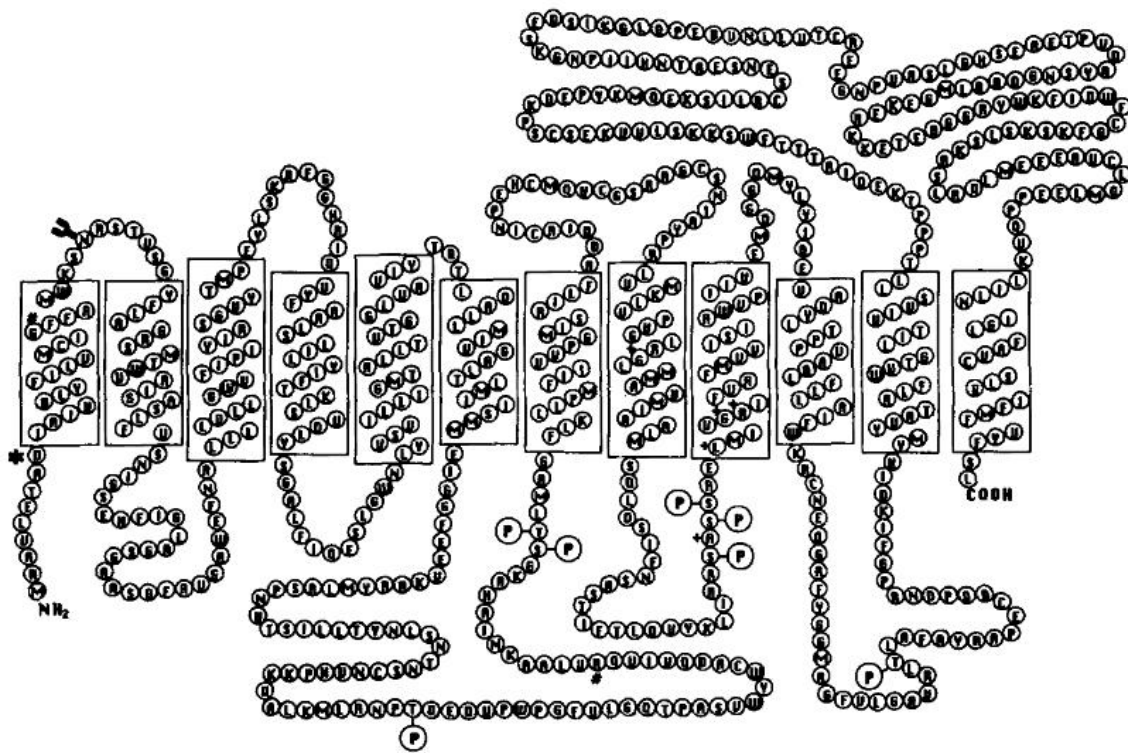


Abbildung 5: Potentielle Sekundärstruktur des SMIT: Die Primärsequenz des SMIT weist 718 Aminosäuren auf. Insgesamt 12-13 hydrophobe Transmembrandomänen verankern den SMIT in der Zellmembran. „P“ kennzeichnet die Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren. Abbildung aus Kwon et al. (1991)

1.2.2 PepT1 und PepT2 (SLC15A1 und SLC15A2)

PepT1 (SLC15A1) und PepT2 (SLC15A2) sind protonenabhängige Oligopeptidtransporter, die über sekundär aktiven Transport Di- und Tripeptide sowie peptidähnliche Substanzen wie Antibiotika über die Zellmembran aufnehmen (44). Über sie wird intestinal der meiste nahrungsbezogene Stickstoff in Form von Di- und Tripeptiden resorbiert. Renal gelegen sorgen PepT1 und PepT2 für eine Reabsorption von Di- und Tripeptiden im Tubulussystem (42), (118). Während PepT1 über eine geringe Affinität und hohe Kapazität ($K_m > 0,1 \text{ mM}$) verfügt, zeigt PepT2 in seinen Transporteigenschaften eine hohe Substrat-Affinität bei reduzierter Kapazität ($K_m \text{ } 10\text{-}250 \text{ }\mu\text{M}$) (43). Entdeckt wurden die beiden Transporter im Dünndarm und in der Niere (25). Mittlerweile konnten aber weitere Gewebetypen identifiziert werden, in denen es zur Expression von PepT1 und PepT2 kommt. PepT1 ist im Epithel des Gallengangs und in Lysosomen des Pankreas exprimiert (16), (98), wohingegen PepT2 in

Astrozyten, dem Epithel des Plexus choroideus und der Brustdrüse sowie der Lunge vorkommt (11), (72), (71). Das Gen für den humanen PepT1 liegt auf Chromosom 13q33-34 (110) und enthält 23 Exons (161). Der humane PepT2 ist auf Chromosom 3q13.3-q21 lokalisiert. Allgemein lässt sich sagen, dass die Oligo-Peptidtransporter dieser Gruppe aus 450 bis 700 Aminosäuren bestehen, wobei die prokaryotischen Varianten kürzere Aminosäuresequenzen ausweisen als die eukaryotischen. In die Zellmembran integrieren sich PepT1 und PepT2 über 12 α -Helices. Der N- und der C-Terminus befinden sich zytoplasmatisch. In der Primärsequenz der beiden Transporter finden sich außerdem zahlreiche potentielle Phosphorylierungsstellen für diverse Proteinkinasen wie z.B. die Proteinkinase A, die Proteinkinase C oder die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase (SGK).

Die stöchiometrischen Transportverhältnisse zwischen den Protonen und den Di- bzw. Tripeptiden unterscheiden sich beim PepT1 und PepT2. Neutrale und kationische Dipeptide transportiert PepT1 mit Hilfe von einem Proton (101), (152). Anionische Dipeptide werden hingegen in ihrer neutralen Variante mit einem und in ihrer geladenen Form mittels zwei Protonen transportiert (101). Bei PepT2 liegt unabhängig vom Ladezustand des Dipeptids immer das stöchiometrische Verhältnis von 2:1 (Protonen:Dipeptid) vor (33). Die durch diesen Mechanismus intrazellulär anfallenden Protonen werden über den apikal gelegenen Natrium-Protonen-Austauscher-3 (NHE3) zurück ins Lumen sezerniert (158). Die basolateral gelegene Na^+K^+ -ATPase sorgt abschließend dafür, dass der als Motor dienende Natrium-Gradient aufrecht erhalten bleibt.

Klinische Relevanz erhalten die beiden PepT-Isoformen durch die Tatsache, dass sie viele peptidähnliche Substanzen transportieren. Dies macht man sich beim Design neuer Medikamente zu Nutze um eine gute orale Resorption und damit verbundene hohe Bioverfügbarkeit zu erreichen. Bei neuen antiviralen Medikamenten wie Valganciclovir oder Valacyclovir wird an das eigentliche Nukleosidanalogen eine Aminosäure (meist Valin) kovalent gebunden um damit die orale Resorption durch den PepT1 zu erhöhen.

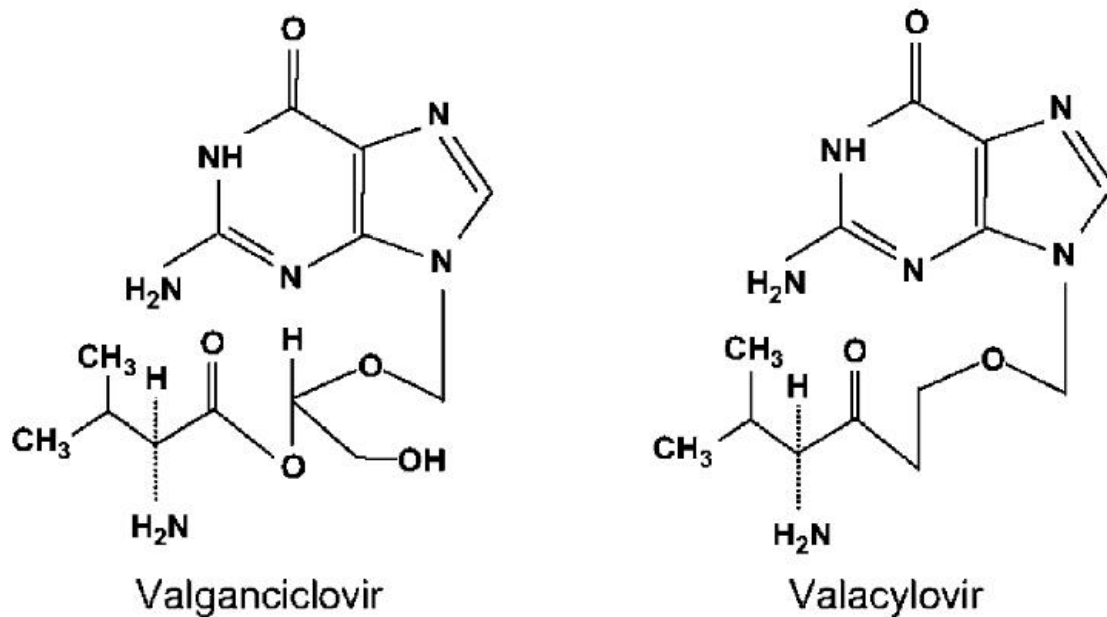


Abbildung 6: Bei einigen Virostatika wird durch kovalente Bindung der Aminosäure Valin an das Nucleosidanaloga deren Resorption über PepT1 möglich.

Weitere Substanzklassen, die über PepT1 resorbiert werden, sind die Antibiotika vom Cephalosporin- und Penicillintyp (67) und „Angiotensin Converting Enzyme“ Inhibitoren (ACE-Hemmer) wie Enalapril oder Captopril (149), (187).

1.2.3 B⁰AT (SLC6A19)

Im Jahre 2004 wurde von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander das für die Hartnup-Krankheit verantwortliche Gen identifiziert (144), (96). Es handelt sich hierbei um den Aminosäure-Transporter SLC6A19 oder auch B⁰AT. Er wird durch den Chromosomenabschnitt 5q15.33 kodiert. Insgesamt sind bis heute sechs Mutationen des SLC6A19 aufgefunden worden, die die Hartnup-Krankheit auslösen. Der Aminosäure-Transporter SLC6A19 transportiert neutrale Aminosäuren im Kotransport mit Natrium, wobei das stöchiometrische Verhältnis bei 1:1 liegt (23). Er ist Chlorid unabhängig und wird vor allem im Tubulussystem der Niere und in der Dünndarmmukosa exprimiert (144). Da der SLC6A19 neben seiner Natrium-Abhängigkeit und seiner elektrogenen Transportweise praktisch alle neutralen Aminosäuren transportiert, erfüllt er die Eigenschaften des sogenannten „Transportsystem B⁰“ und erhält den Eigennamen B⁰AT (53). Das Gen des SLC6A19 enthält 12 Exons und 1905

Basenpaare (96). Das B^oAT-Protein besteht aus 634 Aminosäuren und weist 12 α-helikale Domänen auf mit denen der B^oAT in der Zellmembran verankert ist (96).

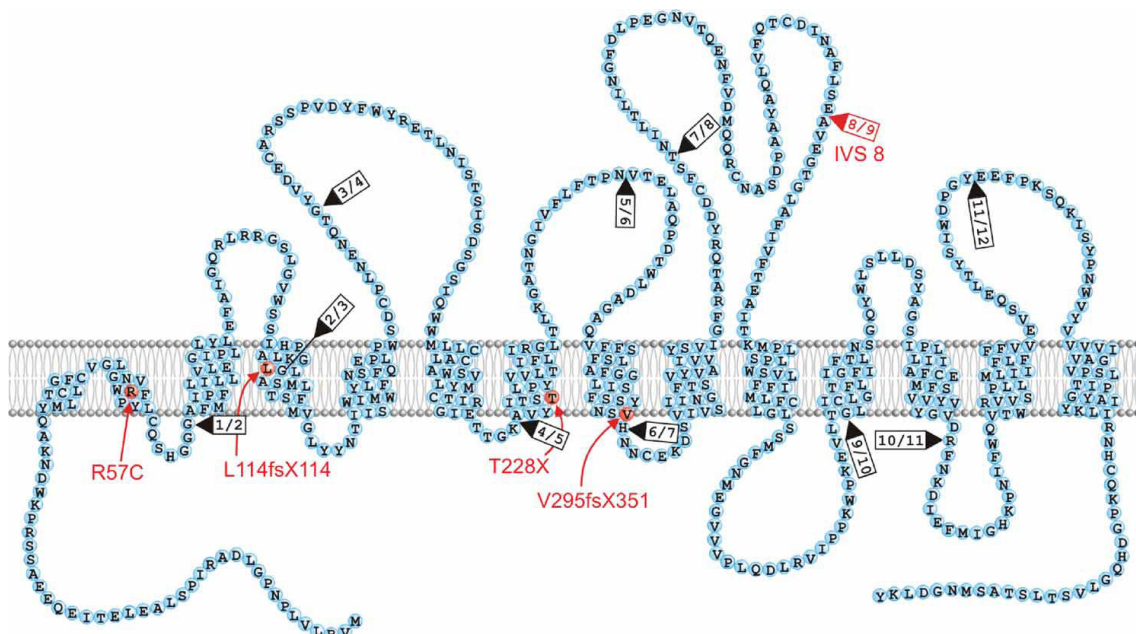


Abbildung 7: Sekundärstruktur des B^oAT (SLC6A19): Es ist die Sekundärstruktur des Aminosäure-Transporters B^oAT dargestellt. Rot markiert sind die Mutationen in der Aminosäuresequenz die zum klinischen Bild der Hartnup-Krankheit führen. Kleita et al. (2004).

Die Hartnup-Krankheit wurde erstmals 1956 bei Geschwistern der Hartnup-Familie beschrieben und erhielt so ihren Namen (7). Die Hartnup-Krankheit ist durch eine erhöhte renale und intestinale Ausscheidung neutraler Aminosäuren gekennzeichnet (142). Während die meisten Patienten asymptotische Verläufe zeigen, kommt es bei manchen Patienten temporär zu Symptomen der Pellagra, zerebellären Ataxie und psychotischen Veränderungen (144). Unter Pellagra versteht man eine Mangelversorgung des Körpers mit Vitamin B3 (Niacin), die mit Diarrhoe, Demenz und Dermatitis einhergeht. Die Hartnup-Krankheit wird autosomal rezessiv vererbt (144).

1.3 Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase

Die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1 (SGK1) konnte 1993 aus Brusttumorzellen der Ratte kloniert werden (62), (173). Die SGK wurde hierbei

als primäres Responsgen („immediate early gene“) beschrieben, wobei der RNA Spiegel des SGK1-Proteins binnen 30 Minuten nach Inkubation mit Serum oder Glukokortikoiden anstieg (174). Die humanen hSGK-Isoformen wurden kurze Zeit später als volumensensitive Gene, die bei der hyperosmolaren Zellschrumpfung in ihrer Expression erhöht werden, identifiziert (169). Mittlerweile konnten neben Serum und Glukokortikoiden weitere Faktoren und Signalwege gefunden werden, die zur Regulation der SGK-Isoformen beitragen.

1.3.1 Einordnung der SGK innerhalb der Proteinkinasen

Allgemein können extrazelluläre Stimuli auf eine Zelle über membranständige und intrazelluläre Signalkaskaden weitergeleitet werden. Bei der Signaltransduktion greifen Proteinkinasen, Phosphatasen und Phospholipasen in einem komplexen Zusammenspiel ineinander. Proteinkinasen bewirken dabei die Bindung eines Phosphatrestes aus ATP (Adenosintriphosphat) an eine Aminosäure (Serin, Threonin oder Tyrosin) des regulierten Proteins. Dies führt durch lokale Ladungsänderung zu Konformationsänderungen, Freigabe von Bindungsstellen oder Änderungen der Affinität für Substrate an dem zu regulierenden Protein. Proteinphosphatasen wirken hingegen antagonistisch zu den Proteinkinasen. Sie vermitteln die Abspaltung eines Phosphatrestes von dem regulierten Protein.

Die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1 (SGK1) ist eine Serin-/Threonin-Kinase. Sie gehört zur Untergruppe der „AGC“-Familie zu der auch die Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase G (PKG), die Proteinkinase C (PKC) und die Proteinkinase B (PKB) gehören. Die katalytische Domäne des SGK1-Proteins weist eine 45-55 %ige Sequenz-Homologie zu PKA, PKB bzw. PKC auf (131), (170), (107). Die extrakatalytischen Proteinsequenzen besitzen hingegen keine Übereinstimmung mit bisher bekannten Proteinkinasen.

1.3.2 Isoformen und Gewebeverteilung der SGK

Außer der SGK1 konnten bisher zwei weitere Isoformen der SGK kloniert werden. Es sind dies die Isoformen SGK2 und SGK3. Die katalytischen Domänen zeigen 80 % Sequenzhomologie, wohingegen die nicht katalytischen Areale lediglich eine 44-68 %ige Übereinstimmung aufweisen. Im Bereich des

N-terminalen Endes des SGK-Proteins findet sich praktisch gar keine Sequenzhomologie (99). Das Molekulargewicht für die SGK1 und die SGK3 beträgt 49 kDa und für die SGK2 41,1 kDa bzw. 47,5 kDa (100).

In Bezug auf ihre Gewebeverteilung unterscheiden sich die SGK-Isoformen. Die SGK1 findet sich im Genom aller bisher untersuchten Eukaryonten. Die Expression der SGK1 kann im Pankreas (97), der Leber (61), der Lunge (165), dem Ovar (2) und dem Gehirn (70), (123), (153) nachgewiesen werden. Außerdem zeigen sich in der Embryonalphase typische Expressionsmuster der SGK1 (83), (39). Für diese Arbeit von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass auch innerhalb des distalen Tubulus (64) und des Dünndarmepithels (172) SGK1 nachgewiesen werden konnte. Die SGK2 ist in ihrer Verteilung stärker eingeschränkt. Sie wird im Pankreas, der Leber und der Niere exprimiert (99). Die Isoform 3 der SGK wird ähnlich der SGK1 ubiquitär exprimiert und ist in besonders hohen Konzentrationen im Herz, der Milz und während der Embryonalentwicklung zu finden (99). Das hSGK1 Gen ist auf Chromosom 6, hSGK2 auf Chromosom 20 und hSGK3 auf Chromosom 8 lokalisiert (41), (170). Evolutionsgeschichtlich hat sich die Struktur der SGK wie auch die Struktur anderer Proteinkinasen als sehr konstant herausgestellt (170).

1.3.3 Stimulation der SGK

Während die katalytische Aktivität der meisten bisher bekannten Proteinkinasen auf posttranskriptioneller Ebene reguliert wird, werden die Serin/Threonin Proteinkinasen hauptsächlich auf der Transkriptionsebene beeinflusst (171). Außer über die transkriptionelle Ebene kann die SGK noch über zwei weitere Mechanismen in ihrer Expression verändert werden.

Transkription:

Außer Serum und Glukokortikoide sind noch weitere Substanzen in der Lage die Transkription der SGK zu verändern. Mineralokortikoide (14), (26), das Follikel stimulierende Hormon (FSH) (34), (126), 1,25 Dihydroxycholecalciferol (Vit. D₃) (1), Wachstumsfaktoren wie TGF- β (103), Interleukin 6 (IL-6) (117) und Thrombin (8) führen zu einer gesteigerten Transkription der SGK.

Des Weiteren konnte die SGK als volumensensitives Gen identifiziert werden (170). Unter hyperosmolaren Bedingungen kommt es zur Zellschrumpfung und zeitgleich zur transkriptionellen Stimulation des SGK (106). Des Weiteren wird die Transkription der SGK durch stark erhöhte Glukosespiegel (140), (108), bei Herzinfarkt, oxidativen Stress und durch ultra-violettes Licht (UV-Licht) erhöht (109).

Heparin (49) und eine Mutation im MECP2-Gen (125), welches für die Entstehung des Rett-Syndroms verantwortlich ist, verringern hingegen die Transkription der SGK.

Reversible Aktivierung durch Phosphorylierung:

Die zweite Ebene der SGK-Regulation findet post-transkriptionell statt. Für die vollständige Aktivierung der SGK1 sind zwei Phosphorylierungen des SGK1-Proteins notwendig. Zunächst wird die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) durch externe Stimuli wie Insulin, IGF-1 („Insulin like growth factor“), cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) oder Glukokortikoide aktiviert (62), (132). Im weiteren Verlauf erfolgt, PI3-Kinase abhängig, die Aktivierung der 3-Phosphoinositidabhängigen Proteinkinasen 1 (PDK1) und 2 (PDK2) (15). Die PDK2 ist auch unter dem Namen „hydrophobic motif“ (H-Motif) Kinase bekannt. Über die PDK2/H-motif Kinase kann nun zunächst die Aminosäure ⁴²²Ser (Serin) innerhalb des C-terminalen Endes des SGK1-Proteins phosphoryliert werden (100). Durch Wortmanin, ein Inhibitor des PI3-Kinase-Weges, kann dieser Aktivierungsschritt der SGK1 unterbunden werden, was Abhängigkeit der SGK1 von der PI3-Kinase untermauert. Im letzten Schritt phosphoryliert die PDK1 das ²⁵⁶Thr (Threonin) innerhalb der Primärsequenz des SGK1-Proteins (99), (131). Dadurch ist die SGK1 vollständig aktiviert.

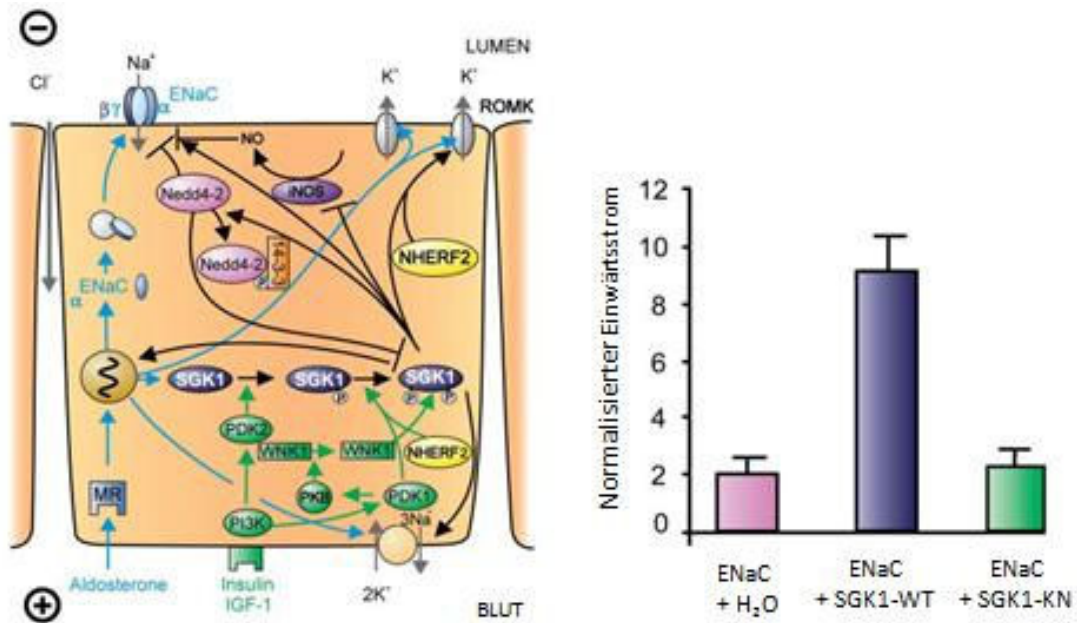


Abbildung 8: Stimulation des epithelialen Natrium Kanals ENaC durch die SGK1. Die SGK wird über den PI3-Kinase Weg durch PDK2 und PDK1 phosphoryliert und aktiviert. Wie dem Balkendiagramm zu entnehmen ist, führt ein Austausch der Aminosäure ¹²⁷Lysin (¹²⁷K) durch Asparagin (N) zu einer ausbleibenden Aktivierung; die Phosphorylierung durch die PDK-Isoformen ist nicht mehr möglich. Lang et al. (2006).

Die Aktivierung der SGK2 bzw. SGK3 kann wie bei der Isoform 1 der SGK über die PDK1 und PDK2/H-motif Kinase erfolgen. Für die SGK2 liegen die beiden Phosphorylierungsstellen am ¹⁹³Thr (Threonin) und am ³⁵⁶Ser (Serin). Die SGK3 kann über Phosphorylierung am ²⁵³Thr und ⁴¹⁹Ser aktiviert werden (131), (99), (100).

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten kamen neben den Wildtyp-Formen der SGK vor allem die konstitutiv aktiven und inaktiven Mutanten zum Einsatz. Ersetzt man das ⁴²²Ser innerhalb der Primärsequenz des SGK1 Proteins durch die Aminosäure Aspartat erhält man die konstitutiv aktive ^{S422D}SGK1. Durch Austausch des ¹²⁷Lys (Lysin) mit Asparagin innerhalb der ATP-bindenden Region erhält man die inaktive Mutante ^{K127N}SGK1, die ihrerseits nicht mehr in der Lage ist andere Proteine zu phosphorylieren. Analog hierzu können die konstitutiv aktiven ^{S356D}SGK2 und ^{S419D}SGK3 Isoformen und die inaktiven ^{K64N}SGK2 und ^{K191N}SGK3 Mutanten erzeugt werden (100).

Eine weitere Möglichkeit die SGK1 zu aktivieren läuft über die „extracellular signal-regulated protein kinase 5“ (ERK5), einem Mitglied der MAP Kinase Familie. Die ERK5 stimuliert die SGK1 unabhängig von der Phosphorylierung am ²⁵⁶Thr. Die Phosphorylierung erfolgt am ⁷⁸Ser, wobei das ⁷⁸Ser außerhalb der katalytischen Domäne liegt (117), (74), (75). Wie diese Phosphorylierung die SGK1 aktiviert ist bisher ungeklärt. Über diese Signalkaskade könnte eine Aktivierung der SGK durch Wachstumsfaktoren vermittelt werden (74).

Regulation der SGK1 über die subzelluläre Lokalisation:

Als dritte Ebene der SGK-Regulation kann die subzelluläre Lokalisation angesehen werden (106). Die subzelluläre Lokalisation der SGK hängt höchstwahrscheinlich vom Funktionsstatus der jeweiligen Zelle ab. Während der Proliferationsphase ist die SGK1 hauptsächlich im Nukleolus lokalisiert. Eine Inkubation von Zellen mit Serum führt zur Importin vermittelten Aufnahme von SGK1 in den Nukleus (114). Durch Inkubation der Zelle mit Glukokortikoiden oder mit hyperosmolaren Lösungen kommt es zum Stop des Zellzyklus in der G1-Phase und zur vorwiegenden zytoplasmatischen Lokalisation der SGK (9), (62).

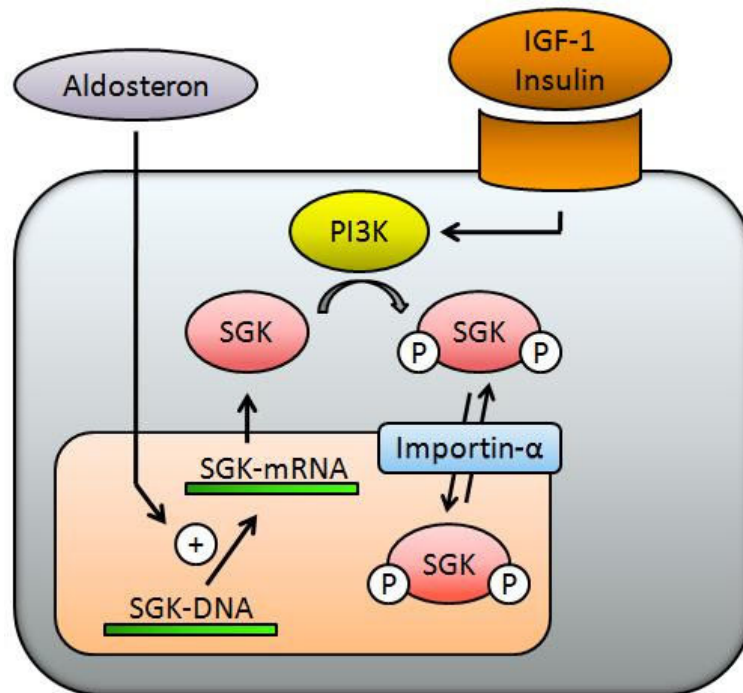


Abbildung 9: Die Abbildung zeigt die drei verschiedenen Regulationsmechanismen: Zum einen kann über extrazelluläre Faktoren direkt im Zellkern die Transkription der mRNA stimuliert werden. Über Aktivierung des PI3-Kinase Weges kommt es posttranslational zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung des SGK-Proteins. Durch Veränderung der subzellulären Lokalisation kann die SGK-Konzentration entweder im Zytoplasma oder im Nukleus erhöht werden.

1.3.4 Halbwertszeit und Abbau der SGK

Als „immediate early gene“ kann die Transkription der SGK1 innerhalb weniger Minuten gesteigert werden. Ebenso schnell wird die SGK1 wieder eliminiert. Die Halbwertszeit des SGK1-Proteins beträgt zirka 30 min (27). Derzeit wird diskutiert, ob der Abbau der SGK1 über die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 („neuronal precursor cells expressed developmentally downregulated“) gesteuert wird. Die Ubiquitierung von Proteinen bereitet diese für den Abbau im Proteasom vor. Die Nedd4-2 ubiquitiert ihre Zielproteine an sogenannten PY-Motive (Prolin-Tyrosin). Die SGK1 weist ein solches PY-Motiv auf. Eine Überexpression von Nedd4-2 führt Dosis abhängig zur Reduktion der SGK1-Spiegel (106). Durch Silencing der Nedd4-2 kann wiederum der Plasmaspiegel an SGK1 erhöht werden. Des Weiteren kann die SGK1 durch Phosphorylierung die Nedd4-2 inaktivieren (106).

1.3.5 Die physiologische Funktion der SGK

Die humane hSGK phosphoryliert, wie auch andere Serin/Threonin-Kinasen, die Aminosäuren Serin und Threonin eines Zielproteins, wenn diese in der Sequenz Arg-Xxx-Arg-Xxx-Xxx-Ser/Thr- Φ vorkommen. Xxx steht für jede beliebige Aminosäure (Arg=Arginin; Ser=Serin; Thr=Threonin; Φ repräsentiert eine beliebige hydrophobe Aminosäure) (99), (100). Diese Aminosäuresequenz innerhalb des Zielproteins wird „SGK-Consensus-Site“ oder auch SGK-Phosphorylierungsstelle genannt. Außer der Stimulation über die „SGK-Consensus-Site“ konnte aber auch beobachtet werden, dass die SGK Proteine ohne eine Arg-Xxx-Arg-Xxx-Xxx-Ser/Thr- Φ Sequenz stimulieren kann.

Der SGK1 kommt eine bedeutende Rolle in der Regulation von Membrantransportern und -kanälen zu. Die SGK1 stimuliert den epithelialen Natrium Kanal ENaC vor allem durch direkte Phosphorylierung (50). Eine direkte Wirkung der SGK1 auf den Kalium-Kanal ROMK konnte nicht nachgewiesen werden. Eine Interaktion zwischen SGK1 und ROMK ist über das Gerüst-Protein NHERF2 möglich. Die Koexpression aller drei Proteine führt zur Stimulation des ROMK (128), (183). Derselbe Mechanismus gilt auch für die Regulation des renalen Kalziumkanals TRPV5 durch die SGK1 (57), (129). Die Regulation des Chloridkanales CLC2 durch die SGK1 ist auf eine Hemmung der Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 zurückzuführen (127). Des Weiteren reguliert die SGK1 den kardialen Natrium Kanal SCN5A (22), den im Herzen vorkommenden epithelialen Kaliumkanal KCNQ1(56), den im Innenohr exprimierten Kaliumkanal KCNQ4 (143) und die Kaliumkanäle KV1.3 (66), (65), (79) und Kv1.5 (159). Beispiele für Membrantransporter, die durch die SGK1 stimuliert werden, wären der natriumabhängige Glukosetransporter SGLT1 (51), der Insulin sensitive Glukosetransporter GLUT4 (87), die exzitatorischen Aminosäuretransporter EAAT1-5 (20), (21), (17), (24), (141) und der Kreatinintransporter CreaT (148). Außerdem wird die Na⁺-K⁺-ATPase durch die SGK1 in ihrer Aktivität gesteigert (185).

Durch die Regulation von Transportern und Kanälen beteiligt sich die SGK1 an vielen Prozessen im Körper. Unter physiologischen Bedingungen wird die

SGK1 in pankreatischen β -Zellen nur rudimentär exprimiert (97). Die Gabe von Glukokortikoiden bewirkt eine starke Hochregulation der SGK1 (159). Die SGK1 wiederum stimuliert den Kaliumkanal KV1.5. Dieser Kanal führt zu einer rascheren Repolarisation der depolarisierten β -Zelle, was mit verminderten Ca^{2+} -Einströmen nach intrazellulär verbunden ist (159). Es resultiert eine verringerte Insulinausschüttung. Über diesen Mechanismus könnte die SGK1 an der akuten Inhibition der Insulinausschüttung durch Glukokortikoide beteiligt sein. Außerdem ist die SGK1 an der Zellvolumenregulation (169) und an der Zellproliferation (145), (29) beteiligt. Nicht zuletzt wirkt sie auch anti-apoptotisch (112).

1.3.6 Pathophysiologie der SGK1

Tumorwachstum:

Bei verschiedenen Tumoridentitäten wie dem Prostata-Karzinom (135), dem hepatozellulären Karzinom (35) oder dem Ovarial-Karzinom (34) ist die Expression der Serum- und Glukokortikoid induzierbaren Kinase verringert. Andererseits konnte beobachtet werden, dass die SGK1 über Interleukin-6 (IL-6) eine protektive Wirkung auf cholangiozelluläre Karzinomzellen hat (117).

Hypertonie:

Eine bestimmte Mutation im Bereich des SGK1-Gens (kombinierter Polymorphismus im Intron 6 und Exon 8) führt zu einem milden Hypertonus (31), (32). Individuen mit dieser Mutation weisen des Weiteren eine erhöhte Expression des epithelialen Natrium-Kanals ENaC auf. Allgemein kann festgehalten werden, dass zirka 3-5 % aller Kaukasier diesen Polymorphismus aufweisen (31).

Des Weiteren ist die SGK1 bei fibrosierenden Erkrankungen wie dem Morbus Crohn (172) und der Leberzirrhose (61), bei Erkrankungen des ZNS und bei Ischämie (123) in ihrer Expression verändert.

1.4 Proteinkinase B

Die Proteinkinase B (PKB) gehört wie die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase (SGK) zur Gruppe der Serin/Threonin Kinasen und wurde 1991 entdeckt (10, 89). Ein Synonym für PKB ist Akt. Die PKB/Akt weist in ihren katalytischen Domänen gegenüber der PKA und der PKC 68 % bzw. 73 % Sequenzhomologie auf (89). Bisher konnten drei Isoformen der PKB/Akt identifiziert werden. Die Gewebeverteilung ist je nach Isoform spezifisch. Die erste Isoform PKB α /Akt1 ist die vorherrschende; sie kommt vor allem im Gehirn vor und ist dort in sich regenerierenden Neuronen stark erhöht. Die Isoform PKB β /Akt2 ist in Insulin sensiblen Geweben und in sich entwickelnden Embryonen in erhöhter Konzentration exprimiert. Im Gegensatz zu den ersten beiden Isoformen kommt die PKB γ /Akt3 nur in wenigen Geweben wie Hoden und Gehirn vor (89), (121), (3).

Die PKB/Akt wird durch den auf Thrombozyten wirkenden Wachstumsfaktor PDGF („platelet derived growth factor“) aktiviert (40). Der Mechanismus läuft über die PI3-Kinase, indem PDGF an den PDGF-Rezeptor bindet und dadurch die PI3-Kinase aktiviert. Die Aktivierung der PKB/Akt durch die PI3-Kinase kann durch den PI3-Kinase-Inhibitor Wortmanin gehemmt werden (30). Die Aktivierung der PKB/Akt erfolgt über zwei Phosphorylierungsstellen in der Primärsequenz der Kinase. Es sind dies die am C-Terminus gelegene Aminosäure ⁴⁷³Ser und die im Aktivierungs-Loop gelegene Aminosäure ³⁰⁸Tyr. Die PI3-Kinase aktiviert die PDK2/H-motif-Kinase und die PDK1, die anschließend die PKB/Akt aktivieren (90).

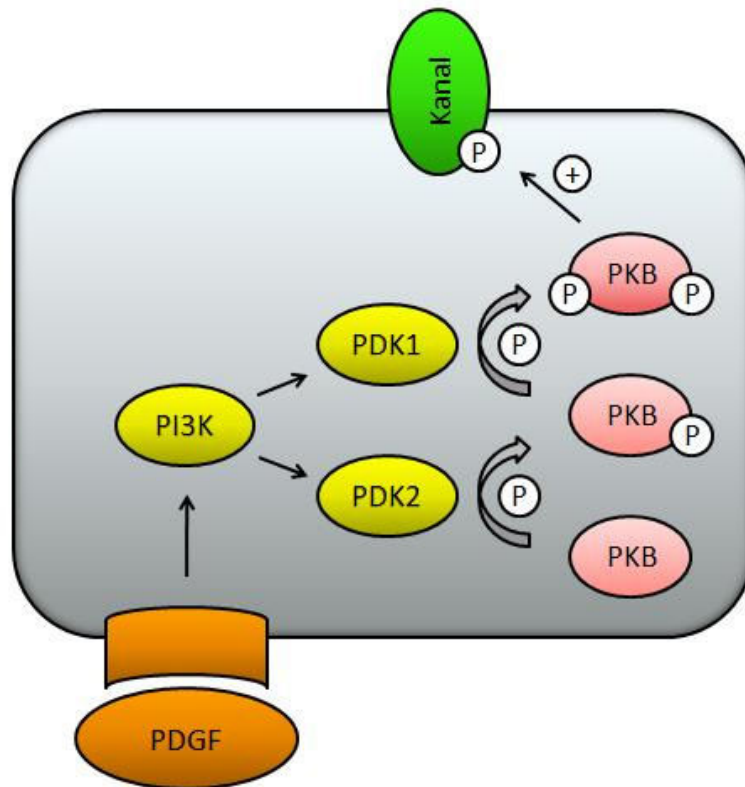


Abbildung 10: Aktivierung der PKB: Die Proteinkinase B wird ähnlich wie die SGK durch die PI3-Kinase aktiviert. Zwischengeschaltet sind die PDK2/H-Motif und die PDK1. Der PI3-Kinase-Inhibitor Wortmanin verhindert die Aktivierung der PKB/Akt. PDGF steht für „platelet derived growth factor“.

Die PI3-Kinase abhängige Stimulation der PKB/Akt durch PDGF könnte ein Hinweis darauf sein, dass die PKB/Akt eine Rolle bei Zellwachstum einnimmt und protektiv auf bereits differenzierte Zellen wirkt (102).

1.5 Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor

Bei der Fragestellung über welchen Mechanismus die Proteinkinase A (PKA) den NHE (**N**atrium-**H**ydrogen-**E**xchanger) stimuliert, wurde das Interaktionsprotein NHERF (**N**atrium-**H**ydrogen-**E**xchanger **R**egulatory **F**actor) identifiziert (175). Bisher konnten zwei Isoformen des NHERF nachgewiesen werden; sie besitzen 63 % Sequenzhomologie. Funktionell ist das NHERF-Protein durch zwei PDZ-Bindungsdomänen gekennzeichnet. PDZ-Domänen sind Protein-Protein-Interaktionsdomänen. PDZ steht hierbei für die drei Strukturen, an denen diese Interaktionsdomäne das erste Mal nachgewiesen werden konnte. Zum einen handelt es sich um das Protein PSD-95/SAP90,

welches innerhalb der „postsynaptic density“ (eine zirka 250-500 nm große Einheit in der postsynaptischen Membran von Neuronen) zu finden ist und dort für die neuronale Plastizität mitverantwortlich gemacht wird (92). Die weiteren beiden Proteine wurden zum einen bei *Drosophila melanogaster* (*Drosophila* septate junction protein disc-large) und zum anderen im Bereich von „tight junctions“ (ZO1 = Zonula Occludentes 1) nachgewiesen. PDZ-Domänen enthaltende Proteine haben als Gerüstproteine die Aufgabe Membrantransporter und –kanäle in ihrer zellulären Lokalisation und Aktivität zu modulieren (60), (58), (59), (69), (84). Neben den beiden PDZ-Domänen weist das Strukturprotein NHERF noch eine ERM-Domäne am C-Terminus auf. ERM steht für „**E**zrin-**R**adixin-**M**oesin-**M**erlin“-Domäne über die das NHERF mit dem Zytoskelett der Zelle Kontakt aufnehmen kann. Damit ist es dem Strukturprotein NHERF möglich innerhalb einer Zelle durch gerichtete Lokalisation Polarität zu schaffen (184). Des Weiteren kann NHERF Proteine, die PDZ-Bindungsmotive enthalten, nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip räumlich zueinander positionieren. Dadurch wird eine Interaktion der beiden zueinander positionierten Proteine wahrscheinlicher.

Für diese Arbeit von Bedeutung ist die Tatsache, dass sowohl die SGK1 als auch der Peptid-Transporter PepT2 ein solches PDZ-Bindungsmotiv aufweisen und dadurch die Möglichkeit der Stimulation des PepT2 durch die SGK1 besteht. Bereits publizierte Daten zu NHE3 und SGK1 stützen diese Vermutung (182).

1.6 Nedd4-2

Die Ubiquitierung von Proteinen ist ein elementarer Bestandteil im Abbau von zellulären Proteinen in eukaryotischen Zellen. Dabei kommt es zur kovalenten Bindung von Ubiquitin-Molekülen an Lysin-Resten des Zielproteins (36), (37), (38). Allgemein lässt sich sagen, dass zwei Isoformen der Ubiquitin-Ligase vorkommen: Die Nedd4-1 und die Nedd4-2, wobei in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die Nedd4-2 zur Expression gebracht wird. Für den Ubiquitierungsvorgang muss die Nedd4-2 an das Zielprotein binden. Die eigentliche Ubiquitierung des Zielproteins erfolgt am PY-Motiv des Zielproteins, welches eine Prolin reiche Aminosäure-Sequenz repräsentiert. Das PY-Motiv

besteht aus Pro-Pro-Xxx-Tyr (Xxx steht für eine beliebige Aminosäure) (5). Inzwischen konnten jedoch noch weitere Sequenzen identifiziert werden, über die eine Ubiquitierung zu Stande kommen kann (Pro-Xxx-Pro-Pro-Tyr) (88), (91). Ubiquitin ist ein aus 76 Aminosäuren bestehendes Polypeptid. Nach erfolgreicher Ubiquitierung werden die Zielproteine in einem 26S-Protease-Komplex, besser bekannt als Proteasom, abgebaut (82), (86).

Der molekulare Mechanismus der Ubiquitierung soll nun im Folgenden näher erläutert werden. Im ersten Schritt bindet Ubiquitin über eine hochenergetische Thiol-Ester-Bindung an das „Ubiquitin-Aktivierungsenzym“ E1, wobei die Bindung durch die am Carboxylende des Ubiquitin liegende Aminosäure Glycin und den Thiolrest eines Cysteins innerhalb des E1 zu Stande kommt. Im zweiten Schritt erfolgt die Übertragung des Ubiquitins auf das „Ubiquitin-Konjugationenzym“ E2. Das E2 katalysiert entweder die direkte Übertragung des Ubiquitins auf ein Zielprotein oder die Übertragung auf das „Ubiquitin-Ligaseenzym“ E3. Das E3 verbindet das am C-Terminus des Ubiquitin gelegene Glycin mit Lysinresten von Zielproteinen (5), (36). Die Nedd4-2 fungiert also als E3-Enzym.

Im experimentellen Teil dieser Arbeit werden zwei verschiedene Nedd4-2 Isoformen verwendet. Zum einen der Nedd4-2-Wildtyp und zum anderen die Nedd4-2-Mutante ^{C962S}Nedd4-2. Ersetzt man das Cystein (Cys) an Stelle 962 innerhalb der Primärsequenz der Nedd4-2 gegen Serin (Ser), so erhält man die inaktive Mutante ^{C962S}Nedd4-2. Diese Mutante ist außer Stande Zielproteine zu ubiquitieren und damit in ihrer Expression zu verringern.

1.7 Dynamamin

Dynamine sind 100 kDa schwere GTPasen in eukaryotischen Zellen (80). Dynamine wurden bei der Suche nach Mikrotubuli assoziierten Motorproteinen im Gehirn von Rindern entdeckt (160). Bisher sind drei Isoformen 1-3 bekannt, die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden. Die Aufgabe der Dynamine besteht in der Abschnürung neu gebildeter Vesikel aus der Membran

von Zellkompartimenten. Des Weiteren spielen Dynamine eine Rolle beim Transport des gebildeten Vesikels zur Zielmembran und der dortigen Integration des Vesikels in die Membran (81). Innerhalb der eukaryotischen Zelle geschieht dies vor allem an zwei verschiedenen Stellen.

Zum einen bei der Verschmelzung von Vesikeln mit der Membran des Golgi-Apparates. Hier ist die Isoform 2 des Dynamin bzw. bei Abschnürvorgängen von Vesikeln aus dem selbigen von entscheidender Bedeutung (81). Zum anderen bei der Clathrin vermittelten Endozytose von Rezeptoren an Zellmembranen (80).

Beiden Vorgängen gemeinsam ist, dass sich das Dynamin während der Ausstülpung eines Vesikels als spiralförmige Struktur um den Hals des Vesikels legt. Angetrieben durch die GTP Hydrolyse dehnt sich die Dynamin-Spirale der Länge nach weiter aus. Hierbei legt sie sich immer enger um den Hals des Vesikels was schließlich zur Abschnürung des Vesikels von der Ursprungsmembran führt. Die Verengung der Dynaminspirale geht zum Teil auf eine Drehbewegung des Dynamins zurück, die streng von der GTPase-Aktivität abhängig ist (138).

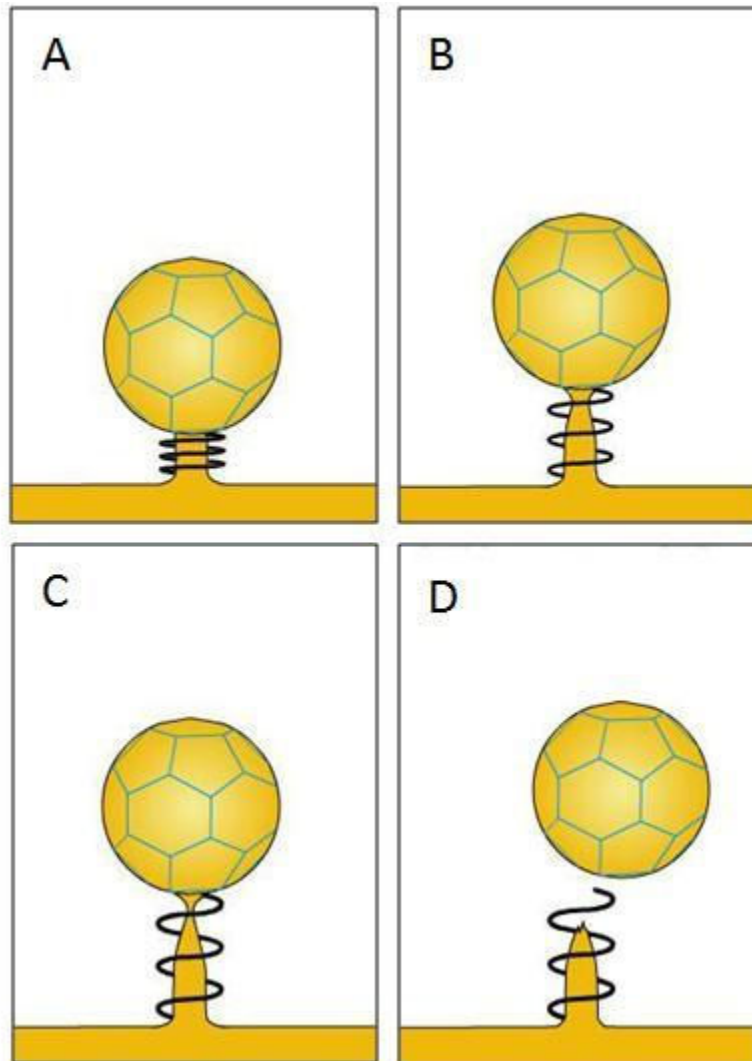


Abbildung 11: Abschnürung eines Vesikels: Dynamin legt sich als Spirale um den Hals des Vesikels und führt durch Längenveränderung zu dessen Abschnürung.

Der in dieser Arbeit benutzte Dynamin-Inhibitor DYNASORE (SIGMA, USA) hemmt reversibel und nicht kompetitiv die GTPase-Aktivität der Isoformen 1 und 2 des Dynamins. DYNASORE ist Zellmembran permeabel (113). Durch Inkubation von Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* mit DYNASORE besteht die Möglichkeit Aussagen über das Trafficking von Membrantransportern zu treffen.

1.8 Oozyten von *Xenopus laevis* als Expressionssystem

Die Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* werden seit vielen Jahren in Laboratorien zu Forschungszwecken verwendet. Ursprünglich

kamen die *Xenopus laevis* bei der Schwangerschaftsdiagnostik zum Einsatz (73). Mittlerweile dienen die Oozyten von *Xenopus laevis* als Expressionssystem heterologer RNA (47), (46), (73).

Neben der Eigenschaft heterologe RNA zu exprimieren, weisen die Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* eine Reihe von positiven Eigenschaften auf. *Xenopus laevis* ist einfach zu halten, die Narkotisierung der Tiere ist technisch unkompliziert und die Oozytenentnahme erfordert keinen besonderen Anspruch in Bezug auf Sterilität oder spezielle operative Methoden. Durch die anti-mikrobiellen Faktoren auf der Haut des *Xenopus laevis* kommt es praktisch zu keinen postoperativen Wundinfektionen (12). Ein weiterer Vorteil der *Xenopus* Oozyten liegt darin, dass auf der Zellmembran nur in spärlichem Umfang Kanäle und Membrantransporter lokalisiert sind, was das Detektieren von exogen exprimierten Transportern und Kanälen erleichtert. Der Umgang mit den präparierten Oozyten ist auf Grund ihrer Größe (1,3 mm) ebenfalls unkompliziert. Allein mit bloßem Auge erkennt man die beiden unterschiedlichen Hemisphären der Oozyte. Die animalische Hemisphäre, durch Melanineinlagerungen dunkel gefärbt, enthält eine große Anzahl an Mikrovilli, den größten Teil des endoplasmatischen Retikulums und viel Zytoskelett. Die Dichte an Kalziumkanälen und Ca^{2+} -abhängigen Chloridkanälen ist in animalischen Hemisphäre ebenfalls höher. Die vegetative Hemisphäre ist im Gegensatz zur animalischen hell gefärbt, enthält mehr RNA und dient als Eintrittspforte des Spermiums (45).

Als großer Nachteil des Oozytenexpressionssystems ist die Tatsache anzusehen, dass es sich bei den *Xenopus laevis* Oozyten nicht um mammalische Zellen handelt. Posttranslatorische Regulationsmechanismen in *Xenopus* Oozyten müssen nicht zwangsläufig gleich verlaufen wie in mammalischen Zellen. Dies liegt daran, dass es in mammalischen Zellen nach der Translation noch zu Glycosylierungen und Phosphorylierungen der entstanden Proteine kommt. Für viele Kanäle und Membrantransporter konnte jedoch gezeigt werden, dass sie ihre physiologischen Eigenschaften auch bei der Expression in *Xenopus* Oozyten beibehalten (45).

1.9 Fragestellung der Arbeit

Über die posttranslatorischen Regulationsmechanismen des Myo-Inositol-Transporters SMIT1, des Dipeptid-Transporter PepT2 und des Aminosäure-Transporter B^oAT ist aktuell wenig bekannt. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1 (SGK1) an der Regulation von Membrantransportern und Membrankanälen beteiligt ist. Als Beispiele können hierfür der epitheliale Natriumkanal ENaC (48), die exzitatorischen Aminosäure-Transporter EAAT1-5 (17), (20), (21), (22, 24), (141) und der Glucose-Transporter SGLT1 (51) genannt werden.

Der Myo-Inositol-Transporter SMIT1:

Der Myo-Inositol-Transporter SMIT1 ist an der Zellvolumenregulation beteiligt (137), (120). Ebenso wird die SGK1 bei Hyperosmolarität verstärkt exprimiert (169), (170). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die SGK1 in der Regulation des SMIT1 eine Rolle spielen könnte.

Der Oligo-Peptid-Transporter PepT2:

Der Oligo-Peptid-Transporter PepT2 und die SGK1 werden vor allem intestinal und renal exprimiert. Die gemeinsame Expression und der Nachweis von SGK-Phosphorylierungsstellen innerhalb der Primärsequenz des PepT2 (131) machen eine Regulation des PepT2 durch die SGK1 wahrscheinlich.

Der Aminosäure-Transporter B^oAT:

Der Aminosäure-Transporter B^oAT weist wie der PepT2 eine SGK-Phosphorylierungsstelle innerhalb seiner Primärsequenz auf. Des Weiteren konnte nicht nur für die exzitatorischen Aminosäure-Transporter EAAT1-5 sondern auch für andere Transporter wie den SN1 (18) gezeigt werden, dass die SGK1 posttranslatorisch an der Stimulation beteiligt ist.

Aus diesen Überlegungen können folgende Fragen konkretisiert werden:

1. Ist die SGK1 in der Lage den SMI1, den PepT2 und den B⁰AT zu stimulieren?
2. Erfolgt eine potentielle Stimulation direkt durch Phosphorylierung des Transporters oder sind weitere Interaktionsproteine wie das NHERF oder die Nedd4-2 notwendig?
3. Ändert die SGK1 die Transporterkinetiken oder das Trafficking der Membrantransporter?

2 Material und Methoden

2.1 Oozytenpräparation von *Xenopus laevis*

2.1.1 Oozytengewinnung

Zur Gewinnung der Oozyten wurden *Xenopus laevis* Weibchen von mindestens 12-15 cm Rumpflänge ausgewählt. Weibchen in dieser Größe besitzen bis zu 30.000 Oozyten und können bis zu viermal zur Eientnahme herangezogen werden. Mehr als vier Eingriffe wurden jedoch auf Grund der sinkenden Oozytenqualität bei steigender Anzahl an Operationen nicht vorgenommen. Für die Oozytenentnahme wurden die *Xenopus laevis* für 30 min in einer 0,1 %igen 3-Aminobenzoessäure-Ethylester-Lösung (Sigma, St Louis, MO, USA) anästhesiert. Eine ausreichende Anästhesie-Tiefe wurde durch die Überprüfung des ausgefallenen Schluckreflexes sichergestellt. Anschließend legte man die *Xenopus laevis* auf den Rücken in eine mit Eis gefüllte Schale (94). Die Bauchhaut wurde jetzt mit Jodlösung (BBraun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Unter semisterilen Bedingungen führte man nun mit dem Skalpell eine circa 5-10 mm lange Stichinzision 1 cm oberhalb und parallel zur Inguinalfalte durch. Anschließend erfolgte die Durchtrennung des Bauchmuskels und des Peritoneums mit der Schere. Das aus mehreren Bindegewebs-Säckchen bestehende Ovar wurde mit der Pinzette im jetzt eröffneten Abdominalraum mobilisiert und nach extrakorporal verlagert. Mit der Schere setzte man entlang des Mesovars so viele Oozyten ab, wie für die anstehenden Versuche benötigt wurden. Die abgesetzten Oozyten gab man umgehend in OR2-Lösung. Es erfolgte die Rückverlagerung des bindegewebigen Restovars nach intrakorporal. Der Wundverschluss erfolgte durch Naht des Muskels und der Haut mit 5,0 Ethicon Vicryl (resorbierbar; Johnson&Johnson, Belgien) in Einzelknopftechnik.

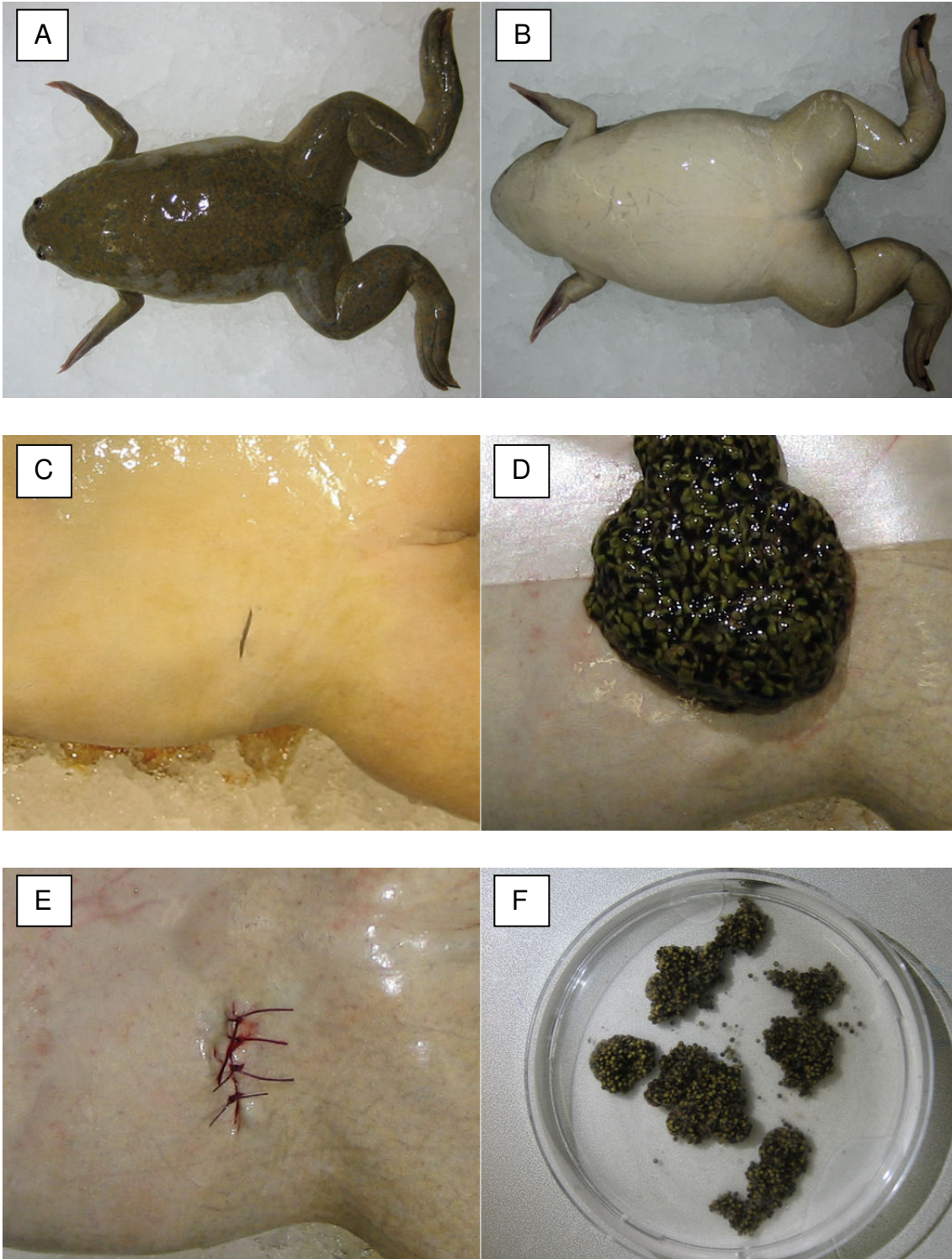


Abbildung 12: Oozytengewinnung: Die Abbildung A zeigt ein *Xenopus laevis* Weibchen nach erfolgreicher Anästhesierung auf dem Bauch liegend. Vor der Operation wird das *Xenopus laevis* Weibchen auf dem Rücken auf Eis gelagert (B). Abbildung C zeigt die Schnittführung und D die Mobilisierung des Ovars nach extrakorporal. In der Abbildung E ist die verschlossene Stichinzision zu sehen. Die Abbildung F zeigt die in OR2-Lösung schwimmenden Ovarialsäckchen.

Bis zum völligen Wiedererwachen aus der Narkose wurden die *Xenopus laevis* in einen Behälter gesetzt, der nur so weit mit Wasser gefüllt war, dass ein Ertrinken verhindert werden konnte. Anschließend überführte man die operierten Weibchen in 60 Liter Aquarien, wo sie bis zur abgeschlossenen Wundheilung verblieben. Erst dann konnte ein weiterer Eingriff zur Oozytengewinnung erfolgen. Wundinfektionen beobachtete man im Verlauf praktisch nie, was auf anti-mikrobielle Faktoren auf der Hautoberfläche der *Xenopus laevis* zurück zu führen war (12). Nach Entnahme der letzten Oozyten wurden die *Xenopus laevis* nach der vierten Operation mittels Dekapitation getötet.

2.1.2 Aufbereitung der entnommenen Oozyten

Die entnommenen Ovarialsäckchen zerkleinerte man mit zwei Pinzetten durch vorsichtiges Auseinanderziehen in OR2-Lösung. Die dadurch entstandenen Oozyten-Konvolute überführte man jetzt in die bereit stehende Kollagenase-Lösung. Unter ständiger Bewegung erfolgte der Verdau der Kollagen haltigen Bindegewebssepten und der perioozytären Membranen. Dieser Vorgang dauerte bei Raumtemperatur insgesamt 1,5-2 Stunden, wobei nach einer Stunde die Kollagenase-Lösung gewechselt werden musste. Eine erfolgreiche Inkubation war dann erfolgt, wenn unter der Stereolupe keine Membranen und keine Gefäßzeichnung auf der Oozytenoberfläche mehr zu erkennen waren. Die Oozyten konnten nach mehrmaligem Spülen mit ND96 in Petrischalen (Durchmesser 10 cm), die mit ND96-Aufbewahrungslösung gefüllt waren, überführt werden.

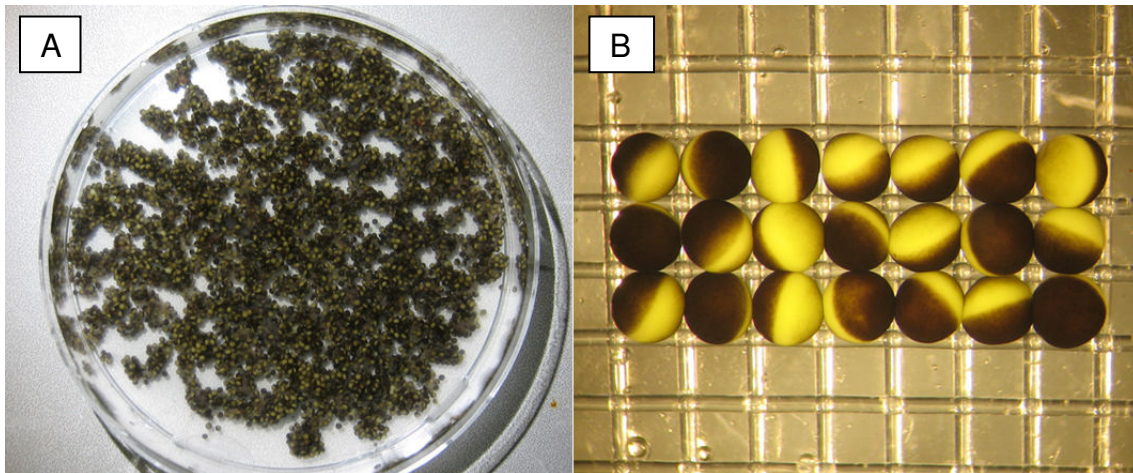


Abbildung 13: Oozyten: Die Abbildung A zeigt die mit der Pinzette vereinzelt Oozyten. Die erfolgreiche Kollagenase-Behandlung ist in Abbildung B zu sehen. Die Oozyten in Abbildung B repräsentieren das Stadium V bzw. VI nach Dumont.

Für Injektionszwecke konnten nur Oozyten verwendet werden, die den Stadien V und VI nach Dumont zugeordnet werden konnten (54), keine Aufhellung am Animalpol zeigten, keine dunklen Flecken aufwiesen und eine klare Trennung zwischen Animal- und Vegetalpol ersichtlich war. Bis zur Injektion verblieben die selektierten Oozyten in Petrischalen (Durchmesser 3 cm; ND96-Aufbewahrungs-Lösung) bei 19 °C.

2.2 Herstellung und Injektion der cRNA

2.2.1 Amplifizierung der cDNA

Um eine ausreichende Menge an cDNA synthetisieren zu können, mussten in einem ersten Schritt kompetente Bakterien (*E. coli*, Stamm DH5a, Stratagene, Heidelberg, Deutschland) mit der gewünschten cDNA transformiert werden. Hierfür wurden 50 µl *E. coli* Lösung in ein auf Eis liegendes „Falcon-Tube“ gegeben. Nun gab man 1 µl der zu amplifizierenden cDNA zu und inkubierte unter ständiger Durchmischung des Ansatzes für 30 min. Anschließend wurden die „Falcon-Tubes“ für 45 sec in 42 °C warmes Wasser gestellt. Dies hatte zur Folge, dass die Zellmembranen der *E. coli* für die cDNA permeabel wurden. Es kam zur Aufnahme von cDNA in den Intrazellulär-Raum der *E. coli*. Nach Ablauf der 45 sec konnten die „Falcon-Tubes“ wieder rasch auf Eis gelegt werden, was

ein Verschließen der Membranporen bewirkte. Die so transformierten *E. coli* wurden auf Agar-Platten aufgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag konnten einzelne Kolonien zur weiteren Vermehrung in Flüssigmedium gegeben werden. Eine erfolgreiche Transformation wurde nach weiteren 24 Stunden durch Minipräparation überprüft und anschließend durch Maxipräparation die Plasmid-DNA gewonnen.

2.2.2 Linearisierung der Plasmid-DNA

Zur Linearisierung der Plasmid-DNA wurde ein Ansatz aus 5 µl 10xPuffer, 20 µl Plasmid-DNA (10 µg), 2 µl Restriktionsenzym (20U) und 23 µl H₂O in ein „Falcon-Tube“ pipettiert und bei 37 °C für zwei Stunden inkubiert. Die Überprüfung der korrekten Linearisierung erfolgte durch Gelelektrophorese. Zur Ausfällung der cDNA fügte man Isopropanol und Natrium-Acetat zu und zentrifugierte die Lösung nach 10 min Inkubationszeit bei 17.000 rpm für 15 min. Die DNA-Phase wurde abpipettiert und mit Eis gekühltem, 70 %igem Alkohol gewaschen. Nach mehrmaligem Wiederholen des Waschvorgangs, konnte die DNA-Phase luftgetrocknet und mit DNase freiem Wasser resuspendiert werden. Zuletzt folgte die photometrische Messung der DNA-Konzentration bei 260 nm Wellenlänge. Alle spezifisch verwendeten Restriktionsenzyme schnitten am 3'-Ende des Inserts und können der unten stehenden Tabelle entnommen werden.

Protein	Plasmid	Restriktionsenzym
SMIT	pSport	Not I
PepT2, ^{S185A} PepT2, PepT2ΔC	pSport	Not I
B ^O AT, ^{S100A} B ^O AT	pGHJ	Sal I
SGK1, SGK2, SGK3	pGHJ	Not I
PKB	pGHJ	Sal I
NHERF2	pET30a	Sal I
hNedd 4-2	POTB7	Bgl II
^{C962S} hNedd 4-2	pGHJ	Hind III
NHE3	Bluescript	Bgl III / Xba I / Not I

Tabelle 1: Verwendete Plasmide und Restriktionsenzyme

2.2.3 cRNA-Synthese

Der cRNA-Synthese lag der in der unten stehenden Tabelle beschriebene Lösungsansatz zu Grunde.

Lösungsansatz	Volumen in μl
Linearisierte DNA (1 μg)	10
10xPuffer	2.5
rATP, rCTP, rUTP, rGTP	1
RNase Inhibitor	1
Cap-Analoga	2.5
H ₂ O	8

Tabelle 2: Reaktionsansatz für cRNA-Synthese

Nach Durchmischung des Lösungsansatzes in einem „Falcon-Tube“ wurde je nach verwendeter DNA entweder 1 μl T3/T7 RNA-Polymerase (37 °C Inkubationstemperatur) oder 1 μl SP6 RNA-Polymerase (40 °C Inkubationstemperatur) zugegeben. Nach 60 min konnte 1 μl DNase zugegeben und der Ansatz für 15 min bei 37 °C inkubiert werden. Die entstandene cRNA musste nun durch mehrmalige Zugabe von 100 μl DEPC-Wasser (DiethylenePyrocarbonate, DEPC inaktiviert RNAsen) und 125 μl Phenol-Chloroform bei 17.000 rpm für 2 min abzentrifugiert werden. Es folgte die Überführung der cRNA-Phase in 12,5 μl 3 molarer Natrium-Acetat-Lösung (pH 5,2) und 375 μl 100 %igem Ethanol. Der Ansatz wurde bei -70 °C über Nacht inkubiert. Anschließend zentrifugierte man den Ansatz mit 17.000 rpm bei 4 °C für 15 min. Jetzt wurde der Überstand in 200 μl 70 %igem Alkohol gewaschen. Diesen Vorgang wiederholte man zweimal. Im weiteren Verlauf wurde die cRNA eingetrocknet und abschließend mit 25 μl DEPC-Wasser resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung der cRNA erfolgte photometrisch. Hierzu pipettierte man 1 μl der cRNA in 69 μl DEPC-Wasser. Die Qualität der cRNA wurde durch Gel-Elektrophorese bestätigt.

2.2.4 Injektion der cRNA in die Oozyten

Für die Injektion der selektierten Oozyten benötigte man Glaskapillaren (WPI, Sarasota, FL, USA) mit einem Außendurchmesser von 1,2 mm. Diese wurden in einem elektrischen Kapillarziehgerät (DMZ-Universal-Puller, ZEITZ Instruments, Deutschland) spitz zugezogen und anschließend unter der Stereolupe auf einen Außendurchmesser von 10-20 µm gekürzt. Nun füllte man die Kapillaren mit Paraffinöl, wodurch die Luft entfernt wurde und arretierte sie im NANOLITER-2000 (WPI, Sarasota, FL, USA). Die cRNA wurde durch Unterdruck in die Glaskapillare eingesaugt und konnte dann unter der Stereolupe in die Oozyten injiziert werden. Für die Injektion überführte man die Oozyten in eine mit ND96 gefüllte Petrischale, in der sich ein feinporiges Netz befand. Dieses Netz verhinderte ein Wegrutschen der Oozyten in der Einstichphase. Während der Injektion war darauf zu achten, dass bei jeder injizierten Oozyte eine Volumenzunahme zu beobachten war. Oozyten bei denen ein Anschwellen im Moment der Injektion nicht beobachtet werden konnte, mussten aussortiert werden. Zwischen zwei Injektionen derselben Oozyten sollte ein Regenerations-Intervall von mindestens einer Stunde eingehalten werden. Je nach Versuchsanordnung injizierte man zwischen 25 und 42 nl je Oozyte. In Oozyten, die nur mit der cRNA des Membrantransporters injiziert wurden, erfolgte im Anschluss eine zweite Injektion mit DEPC-Wasser. Dadurch war sicher gestellt, dass alle Oozyten mindestens zweimal dem Stress einer Injektion ausgesetzt waren. Die elektrophysiologischen bzw. biochemischen Experimente konnten je nach untersuchtem Membran-Transporter nach drei bis sechs Tagen erfolgen.

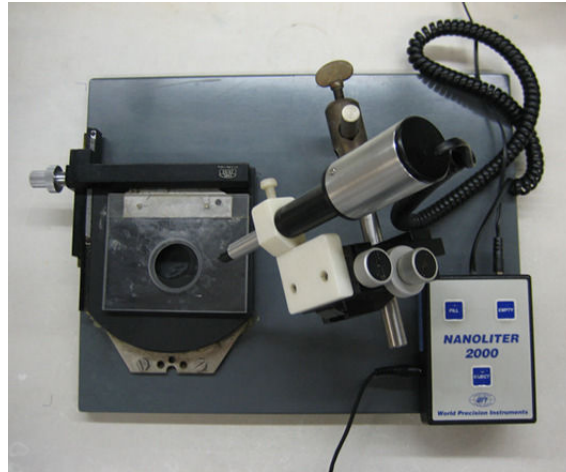


Abbildung 14: Injektion der Oozyten mit Hilfe des NANOLITER-2000: Die Oozyten wurden auf einem feinporigen Netz aufgelegt und unter Sicht mit cRNA injiziert.

2.3 Zielgerichtete Mutagenese

Die einzelnen Mutanten wurden durch die Methode der zielgerichteten Mutagenese („site-directed-mutagenesis“) erzeugt. Hierfür kam das „QuikChange site-directed mutagenesis kit“ (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) zum Einsatz, wobei während der Herstellung der Mutanten streng nach den Herstellervorgaben verfahren wurde. Die Konstrukte der ^{S422D}SGK1, ^{T308DS473}PKB und der ^{K127N}SGK1 stellte dankenswerterweise Sir Philip Cohen (University of Dundee, Dundee, Schottland) zur Verfügung.

2.3.1 Herstellung des HA-Tag von SMIT1

Der Haemagglutinin-Tag wurde in einer extrazellulären Schleife (Loop) des SMIT1 durch die Methode der „Zwei-Schritt-Mutagenese“ eingefügt und ermöglichte so über Antikörper-Bindung die luminometrische Messung der SMIT1-Dichte in der Oozytenmembran.

Protein	SMIT1-HA,s	SMIT1-HA,as
SMIT1-HA	5'-GAATGGGCAGCAGGCCTAC GACGTACCAGATTACGCTTGTC CCTAGCCATCC-3'	5'GGATGGCTAGGGACATAGCGTA ATCTGGTACGTCGTAGCCTGC TGCCCATTC-3'

Tabelle 3: Primer für die SMIT1-HA Tag Synthese

2.3.2 Herstellung der PepT2-Mutanten ^{S185A}PepT2 und PepT2ΔC

In der Aminosäuresequenz der ^{S185A}PepT2-Mutante wurde die Aminosäure Serin gegen Alanin ersetzt, was mit einem Verlust der „Consensus-site“ (Phosphorylierungs-Stelle) einher ging.

Protein	^{S185A} PepT2,s	^{S185A} PepT2,as
^{S185A} PepT2	5'-CGGACTAGATACTTCGC TGGCTTCTACCTCGCC-3'	5'-GGCGAGGTAGAAGCCAGC GAAGTATCTAGTCCG-3'

Tabelle 4: Primer für die ^{S185A}PepT2 Synthese

Bei der PepT2ΔC-Mutante wurde das PDZ-Bindungs-Motiv am C-Terminus entfernt.

Protein	PepT2□C,s	PepT2□C,as
PepT2□C	5'-CTTAGAGACCAAGAAGTG ATGACTCCCAGGAC-3'	5'-GTCCTGGGAGTCATCACT TCTTGGTCTCTAAG-3'

Tabelle 5: Primer für die PepT2ΔC Synthese

2.3.3 Herstellung des B^OAT-HA-Tag und der Mutanten ^{S100A}B^OAT

Der Haemagglutinin-Tag wurde in einer extrazellulären Schleife (Loop) des B^OAT durch die Methode der „Zwei-Schritt-Mutagenese“ eingefügt und ermöglichte so über Antikörper-Bindung die luminometrische Messung der B^OAT-Dichte in der Oozytenmembran.

Protein	B ^O AT-HA,s	B ^O AT-HA,as
B ^O AT-HA	5' -TGGAAGAGTGTTACGAC GTACCAGATTACGCTGCCAA GAGCTC-3'	5'-GAGCTCTTGGCAGCGTAAT CTGGTACGTCGTAACACTC TTCCAC-3'

Tabelle 6: Primer für die B^OAT-HA Tag Synthese

In der Aminosäuresequenz der ^{S100A}B^OAT-Mutante wurde die Aminosäure Serin gegen Alanin ersetzt, was mit einem Verlust der „Consensus-site“ (Phosphorylierungs-Stelle) für die SGK einher ging.

Protein	^{S100A} B ^O AT,s	^{S100A} B ^O AT,as
^{S100A} B ^O AT	5'-GAGGCTACGCAAGGGCGC CATGGGTGTGTGGAGC-3'	5'-GCTCCACACACCCATGG CGCCCTTGCGTAGCCTC-3'

Tabelle 7: Primer für die ^{S100A}B^OAT Synthese

2.4 Lösungen und Substrate

2.4.1 ND96- und OR2-Lösung

Die ND96-Lösung kann als Grundlösung für die Oozyten-Experimente verstanden werden.

Der ND96-Aufbewahrungslösung wurden zusätzlich noch Pyruvat (zur Energiebereitstellung), Theophyllin (weitere Reifung wird verhindert) (166) und Gentamicin (Aminoglykosid-Antibiotikum) zugesetzt. In dieser Lösung konnten die Oozyten bei 19°C gelagert werden.

Bei der OR2-Lösung handelt es sich um eine Ca²⁺-freie Lösung. Da Ca²⁺-Ionen die Kollagenase-Aktivität verringern, mussten die Oozyten vor dem Kollagenase-Verdau in OR2-Lösung gelagert werden.

Zur Herstellung der Lösungen wurden die Stoffe laut Tabelle in destilliertem Wasser gelöst und anschließend mit HCl auf einen pH-Wert von 7,4 titriert. Abschließend folgte die Messung der Osmolarität (VAPOR 5520, Wescor, USA). Bei Lösungen auf Basis von ND96 lag der Zielwert bei 200 mosmol.

Um die Arbeitsabläufe zu straffen, stellte man die Lösungen in sogenannten „10xStock-Lösungen“ her. Hierbei handelte es sich um Lösungen, die 10fach höher konzentriert waren als die eigentlich verwendeten Lösungen. Ausgehend von diesen Lösungen verdünnte man am Beginn eines Arbeitstages einen Teil der „10xStock-Lösung“ im Verhältnis 1:10 und erhielt so die Arbeitslösungen.

Substanz in (mmol/l)	ND96-Lösung	ND96- Aufbewahrungs- lösung	OR2-Lösung
NaCl	96	96	82.5
KCl	2	2	2
CaCl ₂	1.8	1.8	-
MgCl ₂	1	1	1
Hepes	5	5	5
Natriumpyruvat	-	2.5	-
Theophyllin	-	0.5	-
Gentamicin	-	50	-

Tabelle 8: ND96-Lösung, Aufbewahrungslösung und OR2-Lösung, pH 7,4

2.4.2 Kollagenase-Lösung

Zur Herstellung der Kollagenase-Lösung wurde der OR2-Lösung Kollagenase A von *Clostridium histolyticum* (BIOCHROM AG, Berlin, Deutschland) der Konzentration 2 g/l zugesetzt (166).

2.4.3 Voltage-Clamp-Perfusionslösungen

Zur Herstellung der Perfusionslösungen kam für Messungen mit dem SMIT Myo-Inositol, für BOAT die Aminosäure Leucin und für PepT2 das Dipeptide Glycin-Glycin zum Einsatz. Die eingesetzten Konzentrationen sind den Experimenten direkt zu entnehmen. Alle drei Reagenzien stammten von SIGMA, St. Louis, MO, USA. Auch hier wurde ein pH von 7,4 mittels HCl-Titration eingestellt.

2.4.4 Brefeldin A Lösung

Das Makrolid-Antibiotikum Brefeldin A (BFA) wird von Pilzen wie *Eupenicillium brefeldianum* synthetisiert und besitzt antivirale Aktivität (157). BFA wird aber nicht therapeutisch beim Menschen, sondern in der Biochemie eingesetzt. BFA hemmt den Transport von Proteinen vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat (95), (122). Wichtige Voraussetzung für die Durchführbarkeit der BFA-Versuche war, dass BFA die allgemeine Überlebensfähigkeit der Oozyten nicht veränderte (182), (183).

Für die Versuche wurden die Oozyten in ND96-Lösung, die mit 5 μM BFA (SIGMA, USA) versetzt war, überführt. Die Zeitpunkte der elektrophysiologischen Messungen können dem experimentellen Teil dieser Arbeit entnommen werden.

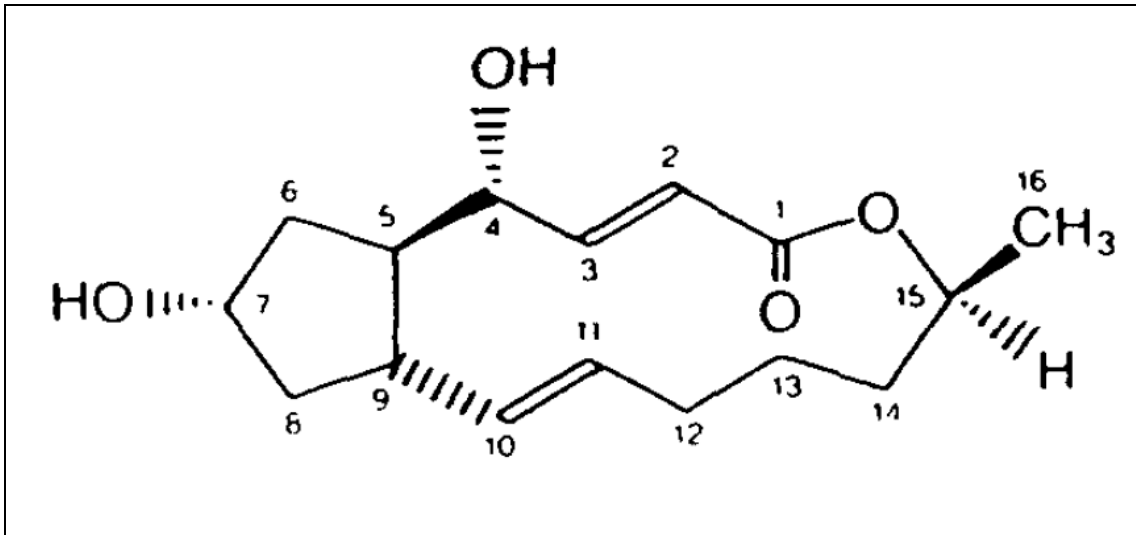


Abbildung 15: Struktur des Brefeldin A (BFA) (Klausner D (1992))

2.4.5 DYNASORE-Lösung

Der Dynamin-Inhibitor DYNASORE (SIGMA, St. Louis, MO, USA) wurde in der Konzentration von 1 μM verwendet. Man löste hierfür die entsprechende Menge an DYNASORE in ND96-Lösung und inkubierte die *Xenopus laevis* Oozyten für 12 bzw. 24 Stunden bei 19 °C. Im Anschluss erfolgten die elektrophysiologischen Messungen.

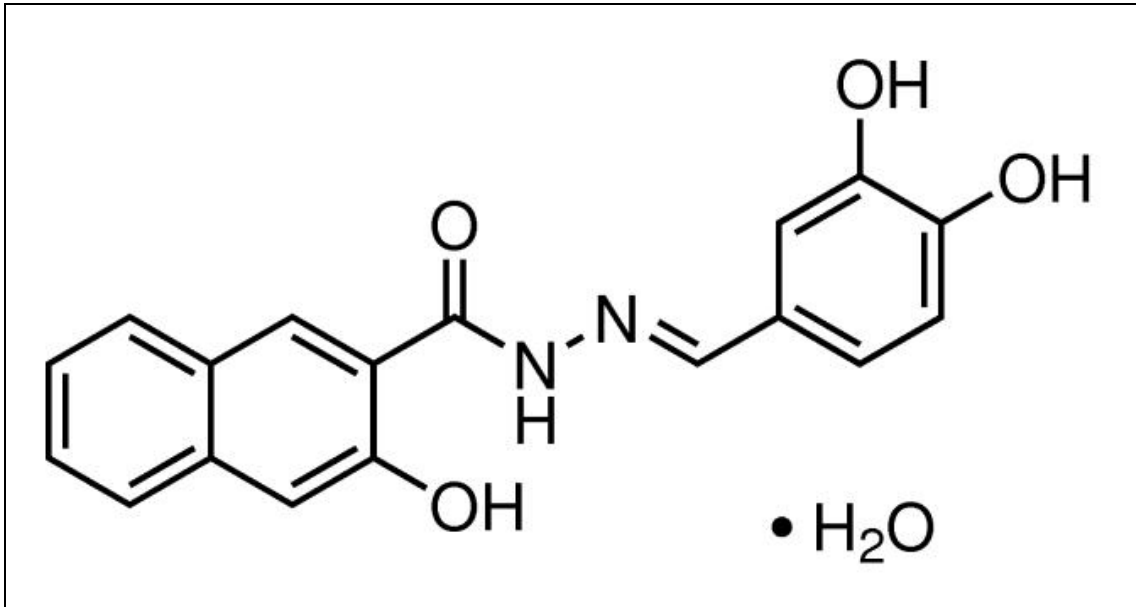


Abbildung 16: Struktur des Dynamin-Inhibitors DYNASORE

2.5 Elektrophysiologische Messungen

2.5.1 Durchführung der elektrophysiologischen Experimente

Die elektrophysiologischen Messungen konnten je nach injiziertem Membrantransporter bei Raumtemperatur nach 3-5 Tagen Inkubationszeit durchgeführt werden. Hierfür legte man jeweils eine Oozyte in die Messkammer von 3,5 ml Fassungsvermögen, die über einen Schwerkraftperfusor mit 20 ml/min ND96-Lösung durchströmt wurde. Dadurch war der vollständige Austausch der Messlösung in der Kammer innerhalb von zirka 10 sec sichergestellt. Ein rascher Wechsel auf die Substratlösungen war durch Dreiwege-Hähne im Zuleitungsschlauch des Schwerkraftperfusors sichergestellt. Die Aufzeichnung der Messungen erfolgte über das Software-Programm pCLAMP9 (Axon Instruments, Sunnyvale, CA, USA). Das Analogsignal wurde bei 10 Hz gefiltert und dann mit 10 Datenpunkten pro Sekunde digitalisiert.

Die gesamte Messapparatur war von einem Faraday'schen Käfig umgeben, was sie bestmöglich von elektromagnetischen Störfaktoren abschirmte. Alle Experimente mussten mit Oozyten von mindestens drei verschiedenen

Fröschen durchgeführt werden, wobei normalerweise fünf Oozyten pro Gruppe zu messen waren.

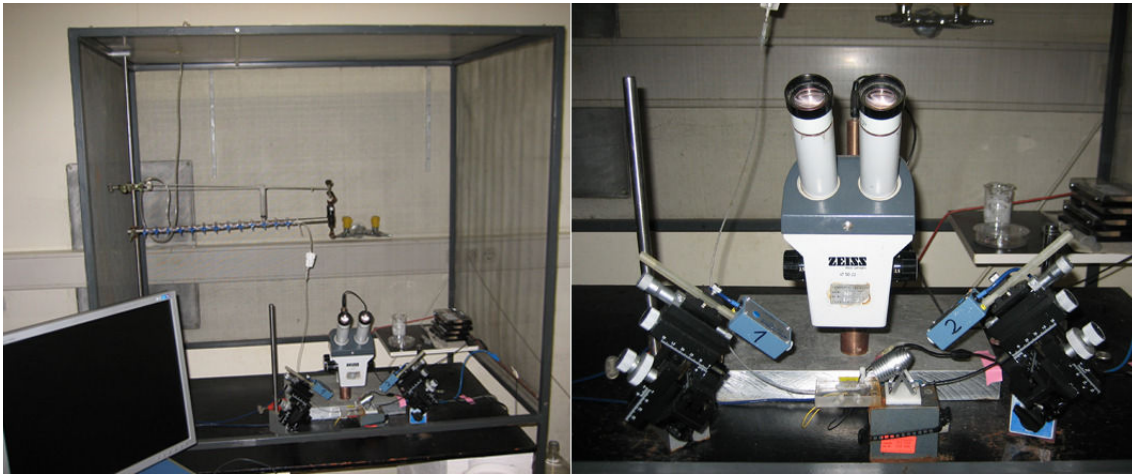


Abbildung 17: Der Voltage-Clamp-Messplatz: Im linken Bild ist der Faraday'sche Käfig mit der darin befindlichen Messapparatur zu sehen. Der rechte Bildausschnitt zeigt die Manipulatoren, die Stereolupe und die unter der Stereolupe befindliche Messkammer.

2.5.2 Current clamp (Potentialmessung)

Im „Current-Clamp“-Modus kann das Membranpotential (V_m) der Oozyten gemessen werden. Hierzu wurde die Potentialdifferenz zwischen der intrazellulären und einer geerdeten Badelektrode, die sich am Rand in der Messkammer befand, ermittelt. Die elektrische Verbindung war durch Ag/AgCl gegeben. Die benutzten Borosilikat-Messelektroden (Typ. GC150-7.5, Außendurchmesser 1.5 mm, Innendurchmesser 0.86 mm, Clark Elektromedical Instruments, Pangbourne, GB) wurden mit Hilfe eines elektrischen Kapillarziehgerät (DMZ-Universal-Puller, ZEITZ Instruments, Deutschland) spitz zugezogen, mit 3 mmolarer Kalium-Chlorid-Lösung luftfrei gefüllt und über einen Adapter am Vorverstärker (HS-2A HEADSTAGE, Axon Instruments, USA) angebracht. Die Verbindung zwischen Vorverstärker und der KCl-Lösung in der Kapillare wurde durch chlorierte Silberdrähte im Adapter sichergestellt.

Unter visueller Kontrolle erfolgte das Einbringen der Kapillaren mittels Mikromanipulatoren (MM33-Micromanipulator, FST, Deutschland) in die Messkammer. Jetzt führte man über den Rückkopplungsverstärker (GeneClamp 500 Amplifier, Axon Instruments, USA) einen Nullabgleich durch und überprüfte den Widerstand der Elektroden. Bei Werten außerhalb des

Referenzbereiches (0,2-2,0 M Ω) mussten die Elektroden gewechselt werden um die Ströme ableiten zu können. Unter Sicht wurden die Oozyten jetzt im „Current-Clamp“-Modus angestochen. Ein Potentialsprung von 0 mV auf zirka 30-50 mV zeigte einen korrekt durchgeführten Anstich der Oozyten an.

2.5.3 Voltage clamp (TEVC)

Im „TEVC“-Modus (Two-Electrode-Voltage-Clamp) wird unter Verwendung einer zweiten intrazellulären Messelektrode das Einstellen des vom Untersucher gewünschten Membranpotentials der *Xenopus laevis* Oozyte möglich. Die erste Elektrode dient der Messung des aktuellen Membranpotentials (V_M); die zweite der Induktion eines Stroms (I_{hold}). Zu Beginn einer jeden Messung gab der Untersucher über ein Software-Programm (pCLAMP9.0, Axon Instruments, Sunnyvale, CA, USA) ein gewünschtes Haltemembranpotential (V_{hold}) ein. Bei den Messungen zu SMIT, B^OAT und PepT2 wurde $V_{hold} = -60$ mV gewählt (94), (19). Um V_{hold} zu erreichen verglich der Rückkopplungsverstärker das aktuelle Membranpotential (V_M) mit V_{hold} . Aus der Berechnung der Differenz $V_M - V_{hold}$ ergab sich ein Strom (I_{hold}), der über die zweite Elektrode in die Oozyte injiziert wurde, um V_{hold} zu erreichen bzw. zu halten (20). I_{hold} entsprach bei dieser Versuchsanordnung dem Strom über die Oozytenmembran mit dem Membranwiderstand (R_M) bei einem entsprechenden V_{hold} .

Wurde nun der Zufluss über den Schwerkraftperfusor von ND96-Lösung auf die jeweilige Substratlösung gewechselt, transportieren die Oozyten das Substrat im Kotransport mit Na⁺- oder H⁺-Ionen nach intrazellulär. Dies führte zur Abnahme des Membranpotentials (V_M). Da der Untersucher V_{hold} jedoch auf -60 mV festgelegt hatte, wurde nun I_{hold} vom Rückkopplungsverstärker derart verändert, dass V_{hold} konstant blieb. Hierbei war der veränderte I_{hold} der gesteigerten Transportrate über die Oozytenmembran gleichzusetzen und damit die indirekte Messgröße für die Transporteraktivität.

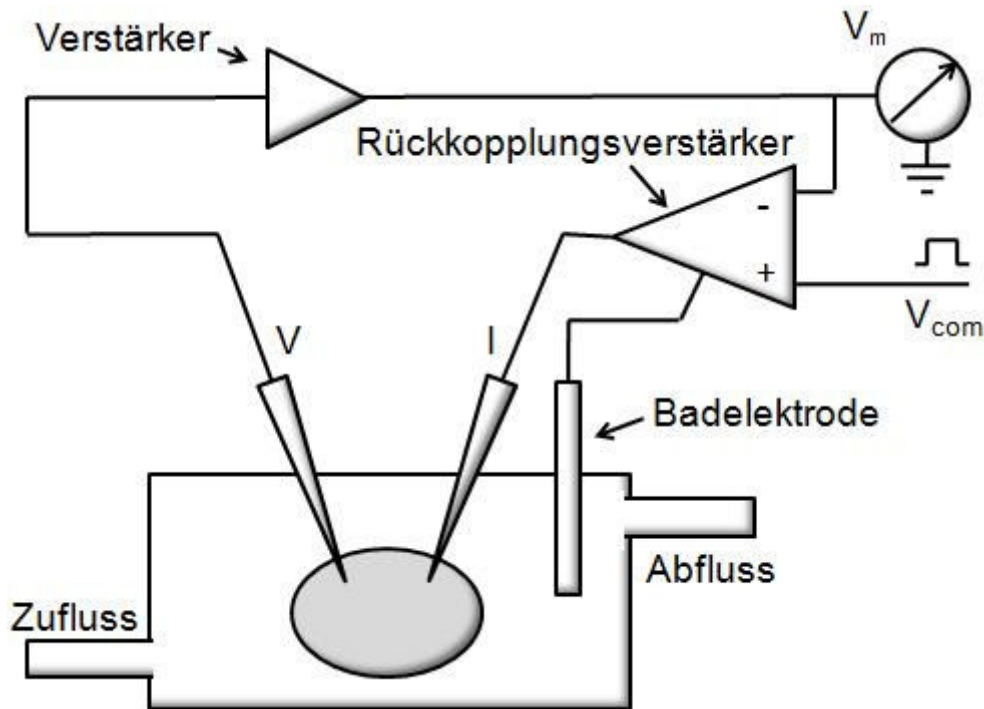


Abbildung 18: Schematischer Aufbau der TEVC: Die Oozyte liegt in der Messkammer. I symbolisiert die Stromelektrode, über die I_{hold} in die Oozyte injiziert wird, und V die Spannungselektrode, die das aktuelle Membranpotential (V_m) abgreift. Über V_{com} wird die vom Untersucher vorgegebene Spannung von -60 mV eingespeißt (V_{hold}).

2.5.4 Auswertung und Statistik der Voltage-Clamp-Versuche

Für die Auswertung der Voltage-Clamp-Messungen kam das Software-Programm Clampfit (Axon Instruments, USA) zum Einsatz. Durch Anlage des Cursors-I an den Beginn des Substrateinstroms und Anlage des Cursors-II in den Bereich des maximalen Substrateinstroms, berechnete Clampfit den Einwärtsstrom (I_E). Hierfür bildete Clampfit die Differenz aus dem Haltestrom (I_{hold}) bei Perfusion der Messkammer mit ND96-Lösung und bei Perfusion mit der substrathaltigen ND96-Lösung.

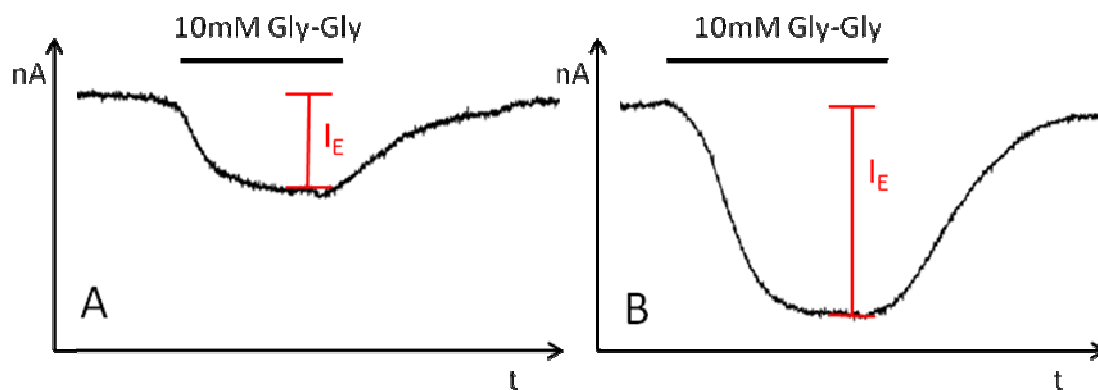


Abbildung 19: Elektrophysiologische Aufzeichnung einer PepT2 Messung: Die Abbildung zeigt den Gly-Gly induzierten Einstrom und damit verbundene Negativierung des Haltestroms (I_{hold}). A entspricht einer Oozyte, die PepT2 exprimiert. Der abgebildete Einwärtsstrom in B wurde bei einer Oozyte, die PepT2 und SGK1 exprimiert, detektiert.

Die Einwärtsströme der einzelnen Messungen wurden abschließend aus Clampfit in die Statistik-Software SIGMA-PLOT (Systat Software, San Jose, CA, USA) überspielt. Mit SIGMA-PLOT bestimmte man, wenn nicht anders beschrieben, den arithmetischen Mittelwert und den Standardfehler (SEM) der jeweiligen gemessenen Gruppen. Wurden die Mittelwerte von zwei Gruppen zueinander auf Signifikanz geprüft, so wurde zuerst ermittelt, ob eine Normalverteilung der Messdaten vorlag. War dies der Fall verwendete man den ungepaarten, zweiseitigen t-Test nach STUDENT. Wenn mehr als zwei Gruppen auf Signifikanz geprüft werden sollten, wurde der ANOVA-Test herangezogen. Es wurden nur p-Werte $< 0,05$ als signifikant angesehen und mit einem Sonderzeichen (*, #) versehen. Die Anzahl der gemessenen Oozyten pro Gruppe gibt „n“ an. Es wurden Oozyten von mindestens drei verschiedenen *Xenopus laevis* zur Messung herangezogen.

Alle kinetischen Messdaten, die eine Konzentrations-Transport-Kurve ergeben, mussten mit der Hill-Gleichung gefittet werden. Die Hill-Gleichung leitet sich, wie dem unten stehenden Formeln zu entnehmen ist, von der Michaelis-Menten-Gleichung ab.

(1) Michaelis-Menten-Gleichung:

$$I = I_{\max} \times C / K_m + C$$

(2) Hill-Gleichung:

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

I spiegelt den gemessenen Strom, **I_{max}** den maximalen Strom, **C** die Substratkonzentration, **K_m** die Substratkonzentration bei halbmaximalem Strom und **n** den Hillkoeffizienten wider.

2.6 Tracer flux Messungen bei SMIT1

Die Aktivität des SMIT1 wurde nicht nur durch Voltage-Clamp-Messungen, sondern auch durch Flux-Messungen mit [3H]Myo-Inositol quantifiziert. Hierfür injizierte man die Oozyten mit SMIT1-cRNA, ^{S422D}SGK1-cRNA und/oder mit DEPC-Wasser (Kontrollgruppe). Nach 4 bis 5 Tagen Inkubationszeit führte man die Tracer-Flux-Messungen durch. Die [3H]Myo-Inositol-Aufnahme wurde durch Überführung der Oozyten in eine spezielle, [3H]Myo-Inositol haltige ND96-Lösung gestartet (94) und nach 30 min durch mehrmaliges Waschen mit Cholin haltiger ND96-Lösung beendet. Die Cholin-Lösung enthielt statt 96 mM Na⁺-Ionen 96 mM Cholin. Die Zugabe von 200 µl 10 %iger SDS („Sodiumdodecylsulfate“) bewirkte ein Auflösen der Oozytenmembranen. Jetzt konnte die intrazelluläre [3H]Myo-Inositol-Konzentration in einem Szintillationszähler gemessen werden.

2.7 Oberflächenexpressions-Messungen von SMIT1 mittels HA-Tag und Chemilumineszenz

Für diesen Versuch wurden die Oozyten mit SMIT1-HA-Tag-cRNA, ^{S422D}SGK1-cRNA und/oder mit DEPC-Wasser injiziert und nach 4 bis 5 Tagen Inkubationszeit nacheinander mit zwei Antikörpern versetzt. Beim ersten Antikörper, der direkt gegen den HA-Tag gerichtet war, handelte es sich um einen primären, monoklonalen Antikörper der Ratte in der Konzentration von 1 µg/ml (clone 3F10, Boehringer, Biberach, Deutschland). Der zweite Antikörper (anti-rat IgG antibody) besaß Peroxidase-Aktivität (HRP = engl. "Horse-Radish-Peroxidase") und band an ein Epitop auf dem Fc-Teil des ersten Antikörper (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA). Nach Abschluss beider Reaktionsschritte überführte man immer einzelne Oozyten in Messschalen, die mit 100 µl ND96-Lösung und 20 µl „SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate“ (Pierce, Rockford, USA) gefüllt waren. Nun konnte über ein Luminometer (Victor, Perkin Elmer, Wellesley, USA) das emittierte Licht der Oozyten-Oberfläche über einen Zeitraum von einer Sekunde aufgezeichnet werden. Zum Schluss fand eine Umrechnung mit dem Software-Paket „Quantity One® Analysis software“ (Biorad, München, Deutschland) in relative Lichteinheiten (RLU) statt.

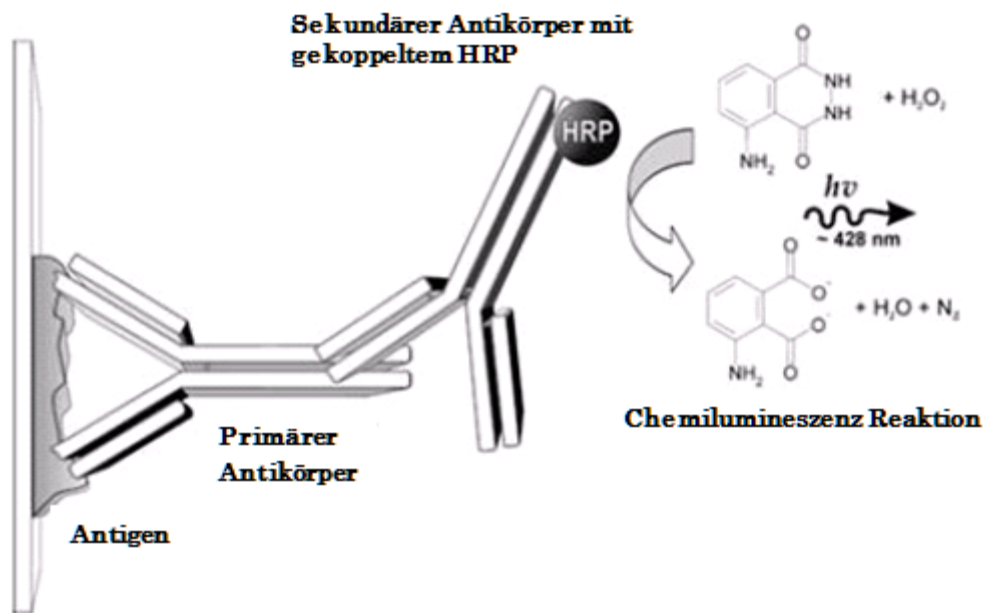


Abbildung 20: Primäre und sekundäre Antikörper-Bindung, HRP (Meerrettich-Peroxidase)

2.8 Oberflächenexpressions-Messungen von PepT2 mittels Membranfraktion-Isolation und Chemilumineszenz

Zum Nachweis von PepT2 in der Oozytenmembran wurden die einzelnen Oozyten mit 30 ng PepT2-cRNA injiziert. Anschließend eliminierte man die Membranfraktion (6). Die so erhaltenen Bruchstücke wurden in SDS-Puffer gelöst und auf ein 8 %iges Polyacrylamid-Gel transferiert und bei 100 V für 60min aufgetrennt. Es folgte die Übertragung auf das Nitrozellulose-Papier und das Blocken mit 5 %iger fettfreier Milch für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Zugabe des ersten Antikörpers vom Typ eines Kaninchen-Anti-PepT2-Antikörpers (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) folgte im Anschluss daran. Die Inkubationszeit betrug 12 Stunden bei 4 °C. Beim zweiten Antikörper handelte es sich um einen „sheep anti-rabbit“ IgG-Antikörper (Amersham, Freiburg, Deutschland), der Peroxidase-Aktivität (HRP) besaß. Im letzten Schritt wurde über ein Luminometer (Victor, Perkin Elmer, Wellesley, USA) das emittierte Licht aufgezeichnet und über das Software-Paket „Quantity One® Analysis software“ (Biorad, München, Deutschland) in relative Lichteinheiten (RLU) umgerechnet.

2.9 Oberflächenexpressions-Messungen von B^oAT

Für die Biotinylierungs-Versuche injizierte man 25-30 ng B^oAT-cRNA, die jeweils benötigten Kinasen-cRNA und/oder DEPC-Wasser und inkubierte die Oozyten anschließend bei 19 °C für 4-5 Tage. Da für Biotinylierungs-Versuche sehr viele Oozyten benötigt wurden, mussten pro Gruppe 200 Oozyten vorliegen.

Zu Beginn spülte man die Oozyten dreimal mit Eis gekühltem PBS-Puffer (engl. „Phosphate-Buffered-Saline“, 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 12mM Phosphat). Anschließend überführte man die Oozyten für 30 min bei 4 °C in eine 0.25 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin (Pierce, Rockford, IL, USA) haltige auf PBS-Puffer-Basis bestehende Lösung, was zur Anheftung des Biotins an extrazelluläre Loops von Membranproteinen führte. Es folgte das erneute viermalige Waschen mit Eis gekühltem PBS-Puffer. Jetzt konnten die Oozyten mittels Lyse-Puffer (bestehend aus 50 mM Tris (pH 7,5), 0,5 mM EDTA (pH 8,0), 0,5 mM EGTA, 120 mM NaCl, 1 % Triton X-100 und einem Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Penzberg, Germany)) aufgespalten werden. Das Zellysate zentrifugierte man für 15 min bei 14.000 rpm und gab den Überstand auf eine NeutrAvidinTM-Säule (Pierce, Rockford, IL, USA). Nach dreimaligem Waschen der Säule wurden die immobilisierten, biotinylierten Proteine mit SDS-PAGE-Puffer (50 mM Dithiothreitol, kurz DTT) aus der Säule gelöst und mittels 10 %iger SDS-PAGE (engl. **S**odium **d**odecyl**s**ulfate **p**oly**a**crylamide **g**el **e**lectrophoresis) aufgetrennt. Nach Übertragung auf Nitrozellulose-Papier folgte das Blocken der Membran mit Hilfe von 5 % fettfreier Milch in TBS (pH 7,4) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend konnte der primäre Antikörper („mouse anti-SLC6A19 antibody“) (Abnova, Taipei, Taiwan) zugegeben werden. Hier betrug die Inkubationszeit 12 Stunden bei 4 °C. Nach Abwaschen der Membranen detektierte man den primären Antikörper mit einem sekundären „horse anti-mouse IgG“ Antikörper (Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA), der Peroxidase-Aktivität besaß (HRP). Der Vorgang dauerte eine Stunde bei Raumtemperatur. Zuletzt konnte die Bandenintensität mittels Densitometrie und der Bild-Software ImageJ (NIH) ermittelt werden.

2.10 Western-Blot Experimente für SGK1, NHERF1 und NHERF2

Bei allen drei Projekten wurde die Expression des SGK1-, des NHERF1- und NHERF2-Proteins mit dem im Nachfolgenden näher beschriebenen Western-Blot und anschließender Chemilumineszenz-Messung überprüft.

Bei den elektrophysiologischen Messungen konnte die SGK1, NHERF1 und NHERF2 nicht direkt nachgewiesen werden. Um sicher zustellen, dass die Translation der cRNA zu den jeweiligen Proteinen regelrecht erfolgt war, wurden diesbezüglich Western-Blot Experimente durchgeführt. Hierzu wurden die Oozyten nach erfolgreicher elektrophysiologischer Messung lysiert. Der verwendete Lyse-Puffer bestand aus 50 mM Tris (pH 7,5), 0,5 mM EDTA (pH 8,0), 0,5 mM EGTA, 100 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 100 µM Natrium-Orthovanadat und einem Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim, Deutschland), der in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration verwendet wurde. Das Proteingemisch wurde über ein 10 %iges Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Papier übertragen. Es folgte das Blocken mit 5 %iger fettfreier Milch für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend inkubierte man die Oozyten, die SGK1 exprimierten, bei 4 °C über Nacht mit einem „rabbit-anti-SGK1“-Antikörper (Upstate, Waltham, MA, USA). Die Oozyten bei denen NHERF1 oder NHERF2 nachgewiesen werden sollte, erfolgte die Inkubation ebenfalls bei 4 °C über Nacht. Hier kamen ein „rabbit-anti-NHERF1“-Antikörper (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) oder für NHERF2 ein „rabbit-anti-S-Tag-HRP“-Antikörper (Merck, Darmstadt, Deutschland) zum Einsatz. Für den SGK1-, NHERF1- und NHERF2-Nachweis wurde jeweils derselbe zweite Antikörper mit Peroxidase-Aktivität verwendet. Es handelte sich hierbei wieder um den bereits bekannten „sheep-anti-rabbit“-IgG-Antikörper (Amersham, Freiburg, Deutschland) mit Peroxidase-Aktivität. Der Fluoreszenz-Nachweis erfolgte analog zum Nachweis von PepT2 oder der SGK1 mit der „Quantity One® Analysis software“ (Biorad, München, Deutschland).

2.11 Fehlerdiskussion

2.11.1 Präparation der Oozyten

Die Qualität der Oozyten war trotz optimaler Präparation unter den einzelnen *Xenopus laevis* Weibchen nicht immer in gleichem Maße gegeben. Die mangelnde Qualität zeigte sich mikroskopisch durch eine unklare Trennung zwischen Animal- und Vegetalpol beziehungsweise durch ein fleckiges Muster der Oozytenmembranen. Elektrophysiologisch fielen bei diesen Oozyten erhöhte basale Leckströme auf. Derart veränderte Oozyten wurden nicht für die Versuche herangezogen.

Die genaue Kontrolle der Injektionsmenge der cRNA wurde einerseits durch Verwendung hochpräziser Injektomatens wie der NANOLITER-2000 (WPI, Sarasota, FL, USA) sichergestellt und andererseits durch visuelle Kontrolle der Volumenänderung der Oozyte unter der Injektion. Oozyten, bei denen keine Volumenzunahme zu erkennen war, wurden sofort aussortiert. Dies war besonders deshalb wichtig, da sonst stimulative Effekte durch die SGK, PKB oder NHERF1 bzw. 2 nicht eindeutig hätten detektiert werden können. Durch die Injektion von mindestens drei verschiedenen *Xenopus* Oozyten war gewährleistet, dass unsystematische Fehler ausgeglichen wurden.

Die Injektion der cRNA stellte für die Oozyten einen Stressfaktor dar. Die verwendeten Injektionsnadeln wurden im Durchmesser so dünn wie möglich gewählt. Jede Oozyte wurde mindestens zweimal injiziert. Bei den Oozyten, die als Referenzgruppe nur cRNA des Membrantransporters enthielten, wurde eine weitere Injektion mit DEPC-Wasser vorgenommen. Dadurch war sichergestellt, dass alle Oozyten den gleichen Injektions-Volumina ausgesetzt waren.

2.11.2 Lösungen und Geräte

Die Abschirmung der gegenüber elektromagnetischen Störgrößen anfälligen Messungen wurde durch die Anbringung eines Faraday'schen Käfigs auf ein Minimum reduziert.

Der Widerstand der Messelektroden wurde vor Beginn einer Messreihe und unter regelmäßigen Abständen während der Messungen kontrolliert. Stieg der

Widerstand über 2,0 M Ω , wurde die Elektrode gewechselt. Für eine ausreichende Beschichtung der Elektroden mit AgCl wurde durch regelmäßiges Chlorieren des Silberdrahtes gesorgt.

Alle verwendeten Lösungen wurden vor jeder Messreihe aus einer 10fachen Stammlösung neu hergestellt. Die Kontrolle des pH-Wert (7,4) und der Osmolarität (200 mosmol) war obligat.

Um Infektionen während der Messungen oder der Inkubationszeiten vorzubeugen, wurden alle benutzten Pipetten, Gefäße und Leitungen am Messplatz mit 70 %iger Alkohol-Lösung regelmäßig gereinigt.

2.11.3 Auswertung

Bei der Auswertung der elektrophysiologischen Messungen kam es besonders auf das korrekte Anlegen der Cursor im Clampfit an. Bei manchen Oozyten stellte sich nur nach langem Warten ein gleichbleibender Haltestrom (I_{hold}) ein. Einige Oozyten oszillierten zu stark, andere stiegen in ihrem Haltestrom kontinuierlich an bzw. fielen ab. Wichtig war hierbei, so lange mit der Substratgabe zu warten, bis ein gleichmäßiger Haltestrom vorlag. Mit dem Auswaschen der Substratlösung durfte erst begonnen werden, nachdem sich unter Substratgabe ein kontinuierlich gleichmäßig verlaufender Haltestrom eingestellt hatte.

3 Versuche und Ergebnisse

3.1 Ergebnisse zum Myo-Inositol-Transporter SMIT1 (SLC5A3)

3.1.1 Die SGK1 stimuliert den Myo-Inositol-Transporter SMIT1

Um überprüfen zu können, ob die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1 (SGK1) eine Rolle in der posttranslatorischen Regulation des Natrium abhängigen Myo-Inositol Transporters (SMIT1) spielt, wurden vier Gruppen an Oozyten von *Xenopus laevis* zur Injektion vorbereitet. Die einzelnen Gruppen können der nachfolgenden Abbildung entnommen werden. Die injizierte cRNA Menge betrug für SMIT1 25 ng/Oozyte und für SGK1 7,5 ng/Oozyte. Der bei der Voltage-Clamp gemessene Myo-Inositol induzierte Strom wurde als Maß für die SMIT Aktivität herangezogen. Die Gruppe von Oozyten, in die nur cRNA von SMIT1 injiziert wurde, zeigte bei Perfusion mit 2 mM Myo-Inositol einen Strom von 16 ± 2 nA (n=136). Wurde zur cRNA von SMIT1 zusätzlich noch cRNA von SGK1 injiziert, steigerte sich der Strom auf 220 ± 13 % (n=153). Wurde nur cRNA der SGK1 ($0,4 \pm 0,1$ nA, n=3) oder nur DEPC-Wasser ($0,1 \pm 0,2$ nA, n=29) injiziert, konnten keine Myo-Inositol induzierten Ströme abgeleitet werden.

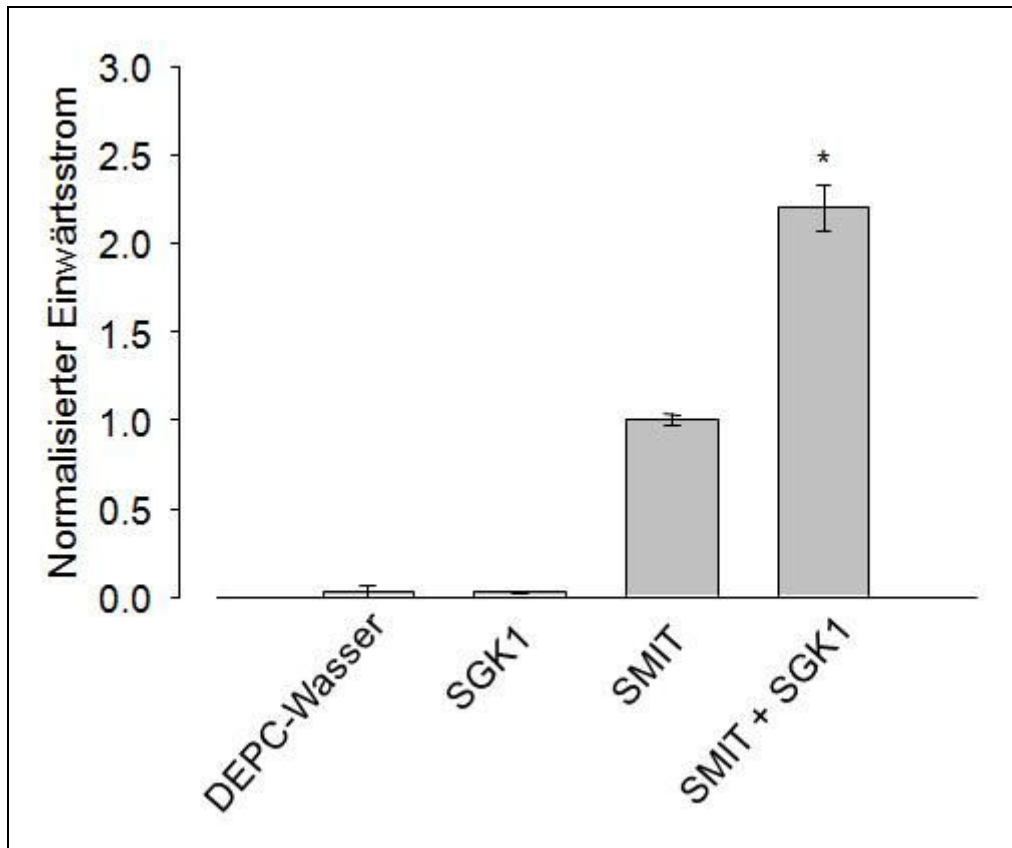


Abbildung 21: Die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase SGK1 stimuliert SMIT1: Oozyten, die nur mit DEPC-Wasser oder mit cRNA von SGK1 injiziert wurden, zeigten keinen Myo-Inositol induzierten Strom. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zur Gruppe mit der alleinigen Expression von SMIT1.

3.1.2 Die Myo-Inositol Aufnahme wird durch SGK1 stimuliert

Um nachzuweisen, dass der stimulative Effekt durch SGK1 auf SMIT1 durch eine gesteigerte Natrium abhängige Aufnahme von Myo-Inositol in den Intrazellularraum der Oozyten zu Stande kam, wurden mit den Oozyten Tracer-Flux-Messungen durchgeführt. Die injizierte cRNA Menge unterschied sich nicht vom voran gegangenen Versuch. Die Aufnahme von radioaktivem [^3H]-Myo-Inositol in die Oozyten wurde durch Koexpression der SGK1 mit SMIT1, gegenüber der alleinigen Expression von SMIT1, auf $186 \pm 6\%$ ($n=39$) erhöht. In Natrium freier ND96-Lösung, die zum Osmolaritätsausgleich anstelle von Natrium Cholin enthielt, war die [^3H]-Myo-Inositol Aufnahme in allen Gruppen gleich groß wie in der Gruppe mit DEPC-Wasser injizierten Oozyten.

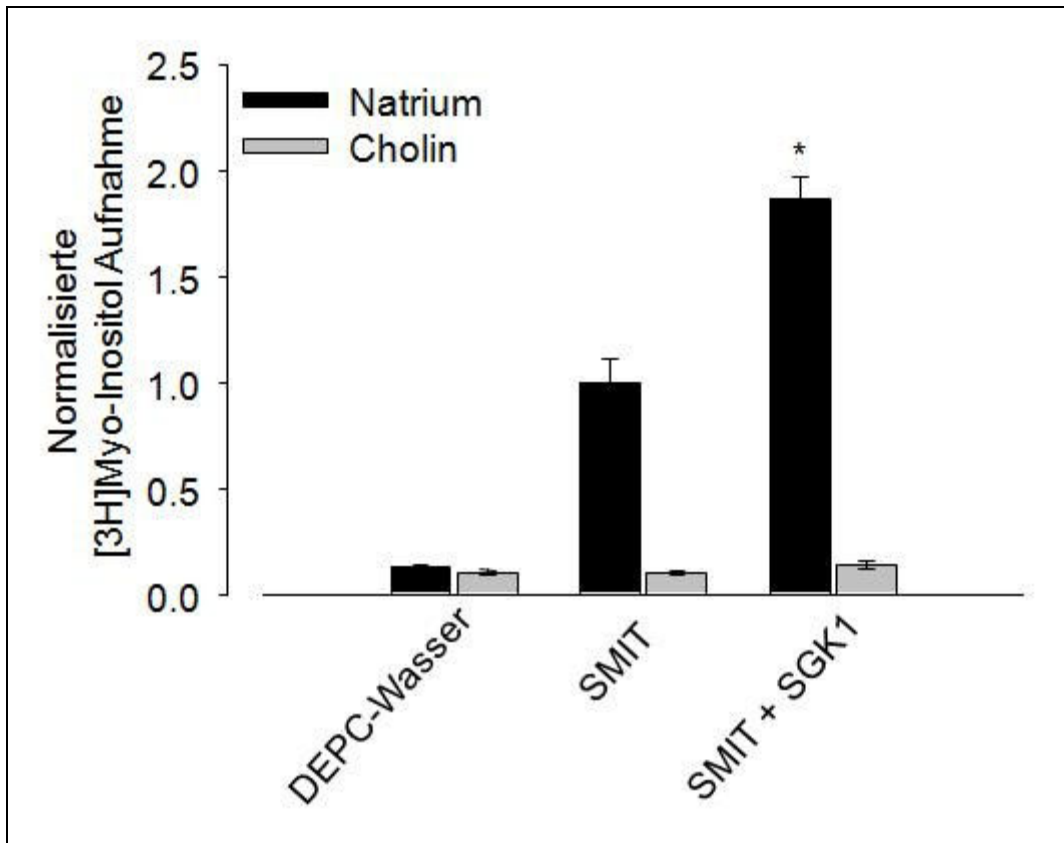


Abbildung 22: Die Myo-Inositol Aufnahme in die Oozyten wird durch die SGK1 stimuliert: Die Aufnahme von [³H]-Myo-Inositol wurde durch Koexpression von SGK1 mit SMIT1 erhöht. Bei Einsatz Natrium freier Myo-Inositol Lösung war kein Strom ableitbar. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler der Tracer-Flux-Messungen abgebildet. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied (P<0,05) zur Gruppe mit der alleinigen Expression von SMIT1.

3.1.3 Die SGK-Isoformen und die PKB stimulieren SMIT1

Die Primärstruktur der SGK1 zeigt über 80 % Übereinstimmung mit den Primärsequenzen von SGK2, SGK3 und der PKB. Diese Tatsache legt nahe, dass auch die Isoformen 2 und 3 der SGK und die verwandte PKB den Myo-Inositol-Transporter SMIT1 stimulieren können. Es wurden 7,5 ng/Oozyte an cRNA von SGK2, SGK3 und PKB injiziert. Die SMIT1 cRNA wurde erneut mit 25 ng/Oozyte injiziert. Bei Koexpression dieser drei Kinasen mit SMIT1 konnte jeweils ein erhöhter Myo-Inositol induzierter Strom detektiert werden. Verglichen mit der Gruppe an Oozyten, die nur cRNA von SMIT1 enthielten, erhöhte die SGK2 den Myo-Inositol induzierten Strom auf 180±19 % (n=44) und die SGK3 auf 168±11 % (n=42). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die konstitutiv aktive PKB (T308D, S473D) die SMIT1 Aktivität auf 136±23 % (n=24) erhöht.

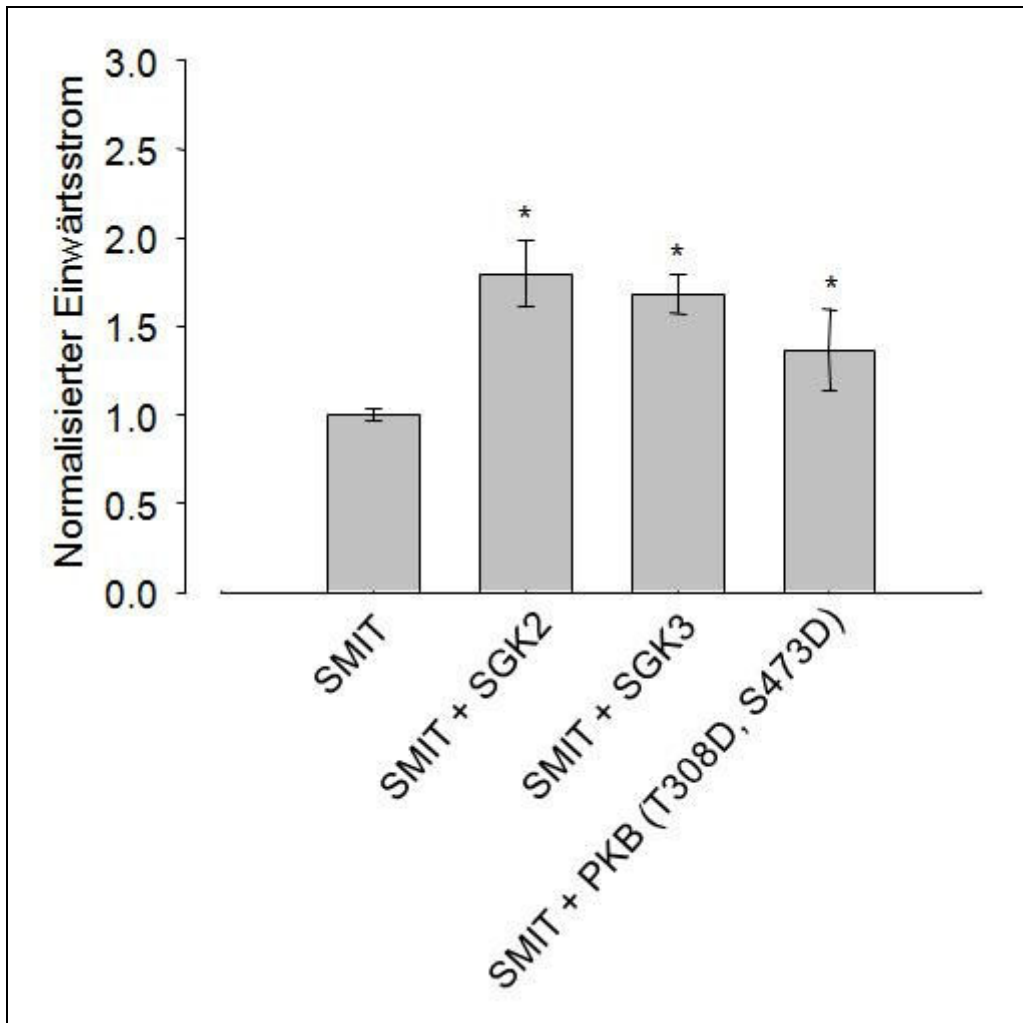


Abbildung 23: Die SGK-Isoformen und die PKB stimulieren SMIT1: Sowohl SGK2, SGK3 als auch die Protein Kinase B waren in der Lage SMIT1 zu stimulieren. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet, die durch Perfusion mit 2mM Myo-Inositol entstanden. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zur Gruppe mit der alleinigen Expression von SMIT1.

3.1.4 Die Stimulation von SMIT1 durch die SGK-Isoformen hängt vom katalytischen Zentrum der jeweiligen Kinase ab

Um klären zu können, ob die stimulativen Effekte der SGK-Isoformen durch ihre katalytische Aktivität und damit verbundene Phosphorylierung oder durch Protein-Protein-Interaktion zu Stande kommen, wurde die cRNA der konstitutiv aktiven und inaktiven SGK-Isoformen mit der cRNA von SMIT1 koinjiziert. Es wurden für die Kinasen jeweils 7,5 ng/Oozyte cRNA und für SMIT1 25 ng/Oozyte cRNA verwendet. Die konstitutiv aktive SGK1 (^{S422D}SGK1) erhöhte den Myo-Inositol induzierten Strom auf 215 ± 13 % ($n=116$) gegenüber der

Kontrollgruppe mit alleiniger Expression von SMIT1. Die durch Mutation im aktiven Zentrum veränderte SGK1 (K^{127N} SGK1) und damit inaktive Variante zeigte gegenüber der Kontrollgruppe keine Stimulation ($94\pm 17\%$ ($n=15$)). Ähnlich verhielten sich die SGK-Isoformen SGK2 und SGK3. Die konstitutiv aktive SGK2 (S^{356D} SGK2) erhöhte den Myo-Inositol Strom auf $181\pm 12\%$ ($n=52$) und die ebenfalls konstitutiv aktive SGK3 (S^{419D} SGK3) auf $159\pm 10\%$ ($n=50$). Auch hier zeigten die inaktiven Mutanten K^{64N} SGK2 und K^{191N} SGK3 keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Bei der K^{64N} SGK2 lag der Myo-Inositol induzierte Strom bei $100\pm 13\%$ ($n=9$) und bei der K^{191N} SGK3 bei $112\pm 23\%$ ($n=8$).

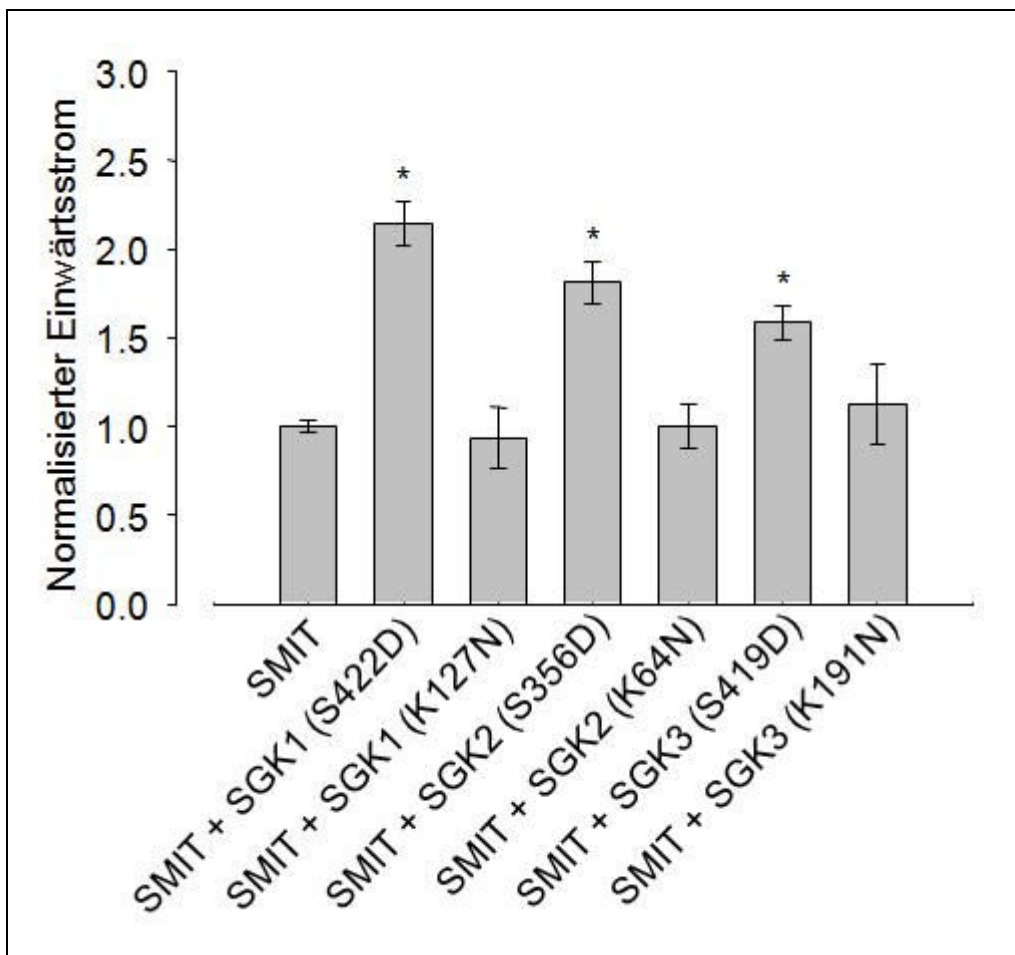


Abbildung 24: Die Stimulation von SMIT1 durch die SGK-Isoformen hängt vom katalytischen Zentrum der jeweiligen Kinase ab: Während die konstitutiv aktiven SGK-Isoformen S^{422D} SGK1, S^{356D} SGK2 und S^{419D} SGK3 SMIT1 aktivierten, zeigten die inaktiven Isoformen K^{127N} SGK1, K^{64N} SGK2 und K^{191N} SGK3 keinen stimulativen Effekt auf SMIT1. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet, die durch Perfusion mit 2 mM Myo-Inositol entstanden. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied ($P<0,05$) zur Gruppe mit der alleinigen Expression von SMIT1.

3.1.5 SMIT1 wird durch die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 reguliert

Der molekulare Mechanismus, über den die SGK SMIT1 stimuliert, könnte entweder auf einer direkten Phosphorylierung des Transporters durch die Kinase oder durch Phosphorylierung und damit verbundene Inaktivierung der Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 beruhen. Dass eine Inaktivierung der Nedd4-2 zur Stimulation von Membrantransportern führen kann, konnte bereits beim epithelialen Natrium Kanal ENaC und beim exzitatorischen Aminosäure Transporter EAAT1 gezeigt werden. Um überprüfen zu können, ob auch bei der Regulation von SMIT1 die Nedd4-2 eine Rolle spielt, wurden die cRNA's von SMIT (25 ng/Oozyte), Nedd4-2 (5 ng/Oozyte), ^{C962S}Nedd4-2 (5 ng/Oozyte) und SGK1 (7,5 ng/Oozyte) in Oozyten von *Xenopus laevis* injiziert. Bei Koinjektion von Nedd4-2 und SMIT1 konnte eine Reduktion des Myo-Inositol induzierten Stroms gegenüber der Kontrollgruppe (alleiniger Injektion von SMIT1) auf 64±11 % (n=19) nachgewiesen werden. Die Gruppe an Oozyten, die inaktive ^{C962S}Nedd4-2 (diese Mutante der Nedd4-2 ist nicht mehr in der Lage Zielproteine zu ubiquitieren) und SMIT1 exprimierten zeigten einen gegenüber der Kontrollgruppe unveränderten Strom von 116 ±11% (n=18).

Der inhibitorische Effekt der Nedd4-2 konnte durch zusätzliche Injektion von ^{S422D}SGK1-cRNA aufgehoben werden. Diese Gruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Referenzgruppe (99±14 % (n=9)).

Eine Injektion von ^{S422D}SGK1- und SMIT1-cRNA erbrachte in dieser Versuchsreihe eine Steigerung des Myo-Inositol induzierten Stroms auf 167±3 % (n=6) gegenüber der Kontrollgruppe. Dieser Strom ist vergleichbar zum Strom des Oozyten Kollektivs, der durch Koinjektion von SMIT1-, ^{S422D}SGK1- und ^{C962S}Nedd4-2-cRNA gemessen werden konnte. Letzterer lag bei 181±20 % (n=9) gegenüber der Kontrollgruppe. Eine Signifikanzprüfung dieser beiden Gruppen erbrachte keinen Unterschied.

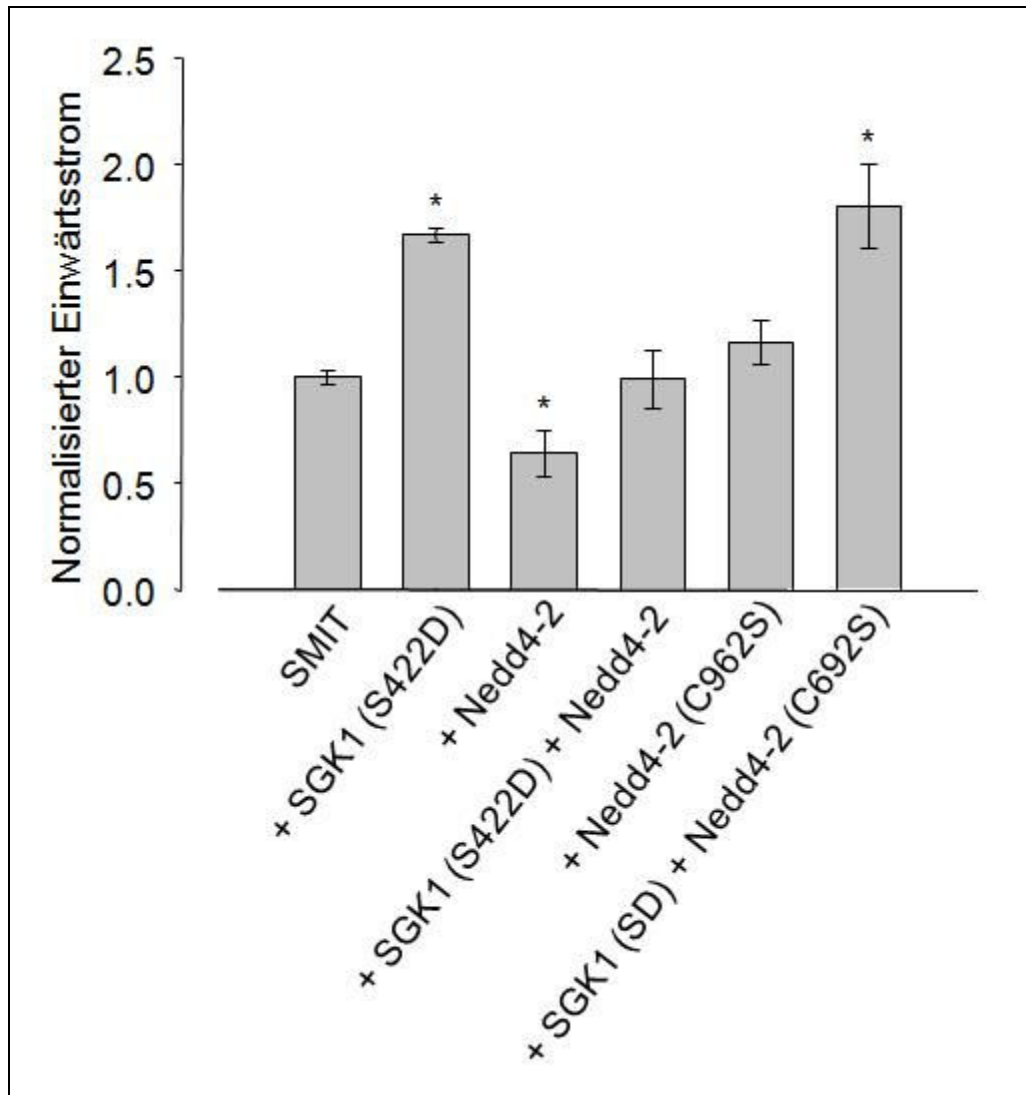


Abbildung 25: Regulation von SMIT1 durch die Nedd4-2: Die Koexpression von Wild-Typ Nedd4-2, nicht jedoch von der inaktiven ^{C962S}Nedd4-2, mit SMIT1 führte zur signifikanten Reduktion des Myo-Inositol induzierten Stroms. ^{S422D}SGK1 hob den inhibitorischen Effekt von Nedd4-2 auf SMIT1 auf und führte mit Koinjektion von ^{C962S}Nedd4-2 und SMIT1 zu einer Stimulation. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet, die durch Perfusion mit 2 mM Myo-Inositol entstanden. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zur Gruppe mit der alleinigen Expression von SMIT1.

3.1.6 Die SGK erhöht die maximale Transportrate von SMIT1 ohne Änderung der Substrat-Affinität

Die nachgewiesene Stimulation von SMIT1 durch die SGK-Isoformen kann grundlegend auf zwei verschiedenen Mechanismen beruhen. Entweder führt eine Injektion von SGK-cRNA in Verbindung mit SMIT1 zu einer erhöhten Transporterdichte auf der Oozytenmembran oder dazu, dass die Substrat-Affinität des SMIT1 verändert wird. Um klären zu können, ob die SGK die

Substrat-Affinität von SMIT1 verändert oder nicht, wurden Voltage-Clamp Messungen mit verschiedenen Konzentrationen an Myo-Inositol vorgenommen. Es wurden Myo-Inositol Lösungen der Konzentrationen 0,01 mM, 0,03 mM, 0,1 mM, 0,3 mM und 1,0 mM hergestellt. Eine Oozyte wurde hierbei während einer Voltage-Clamp Messung nacheinander mit den ansteigenden Konzentrationen an Myo-Inositol perfundiert und der jeweils abgeleitete Strom aufgezeichnet. Zwischen den einzelnen Myo-Inositol Lösungen wurde mit ND96-Lösung zwischengespült um die Oozyten wieder auf das Ausgangsniveau zurückzusetzen.

Zur Durchführung der Experimente wurden drei verschiedene Oozytengruppen mit cRNA injiziert; SMIT1, SMIT1 mit ^{S422D}SGK1 und SMIT1 mit ^{S419D}SGK3. In Bezug auf die halb-maximale Substratkonzentration (K_m) war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit SGK und der Kontrollgruppe zu detektieren. K_m lag für die Gruppe mit ^{S422D}SGK1 bei $40 \pm 5 \mu\text{M}$ ($n=11$), mit ^{S419D}SGK3 bei $48 \pm 11 \mu\text{M}$ ($n=6$) und für die Kontrollgruppe bei $59 \pm 5 \mu\text{M}$ ($n=8$). Zuletzt wurden mit Hilfe der Hill-Gleichung die V_{max} -Werte berechnet, wobei V_{max} den maximal erreichbaren Myo-Inositol induzierten Strom widerspiegelt. Hierbei lag V_{max} für die Gruppe mit ^{S422D}SGK1 bei $1,8 \pm 0,2$ ($n=11$), mit ^{S419D}SGK3 bei $2,0 \pm 0,4$ ($n=6$) und für die Kontrollgruppe bei $1,0 \pm 0,2$ ($n=8$). Damit war V_{max} bei Koinjektion von ^{S422D}SGK1 bzw. ^{S419D}SGK3 mit SMIT1 signifikant höher als V_{max} der Kontrollgruppe.

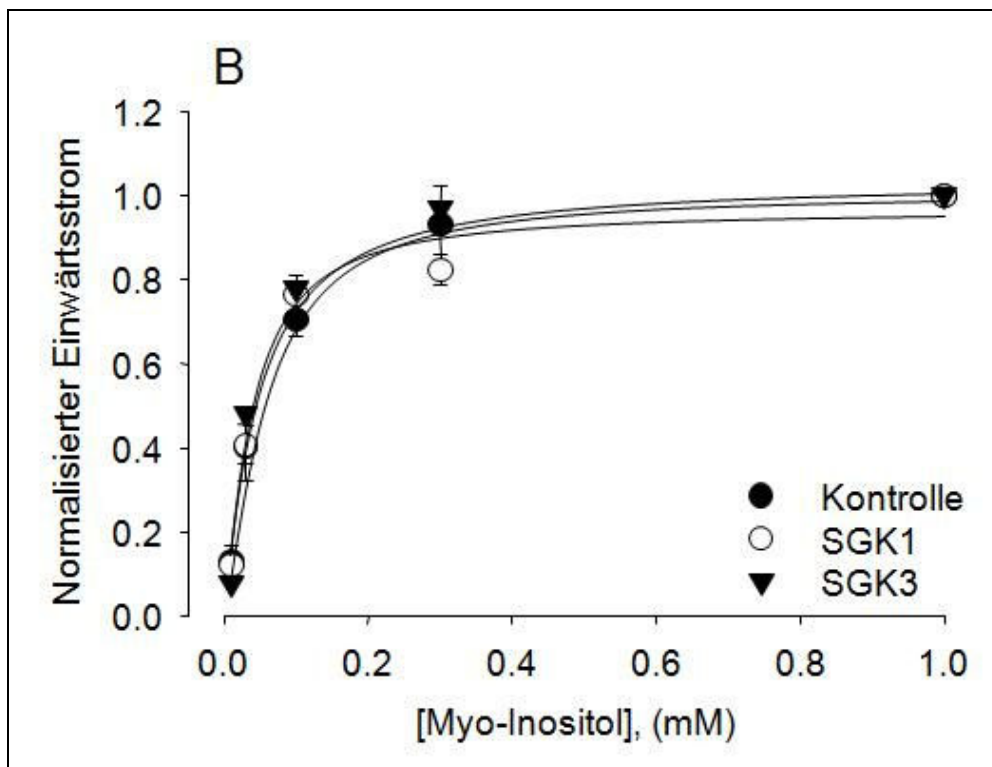
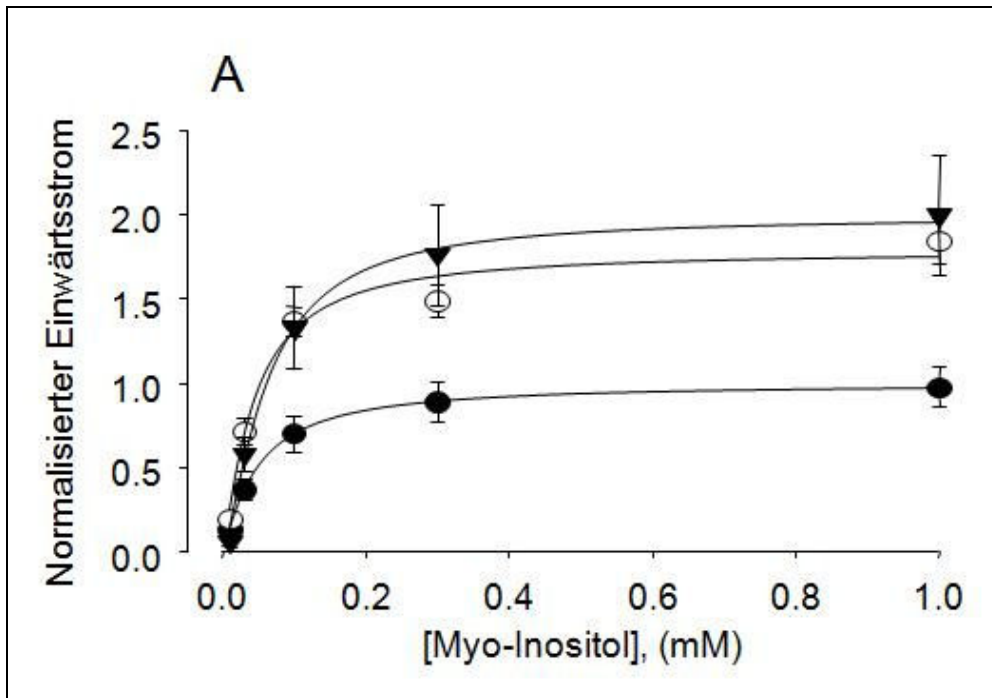


Abbildung 26: Kinetikmessungen der Myo-Inositol induzierten Ströme bei SMIT1: Während eine Koexpression von ^{S422D}SGK1 bzw. ^{S419D}SGK3 mit SMIT1 zu einer Zunahme von V_{max} führte (siehe A und Tabelle auf der nächsten Seite), bleibt K_m unverändert (siehe B und Tabelle auf der nächsten Seite). Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet. Die Daten wurden bei (A) auf den Maximalwert der Kontrollgruppe (Oozyten, die nur mit SMIT1-cRNA injiziert wurden) normalisiert und bei (B) auf den Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

cRNA	K_m (μM)	V_{max}	$P(V_{\text{max}})$	n
SMIT1	58,9 \pm 5,3	1,00 \pm 0,18		8
SMIT1 + ^{S422D}SGK1	39,5 \pm 5,1	1,79 \pm 0,17	<0,05	11
SMIT1 + ^{S419D}SGK3	48,0 \pm 10,7	2,01 \pm 0,41	<0,05	6

Tabelle 9: Kinetikmessungen der Myo-Inositol induzierten Ströme bei SMIT1: Während eine Koexpression von ^{S422D}SGK1 bzw. ^{S419D}SGK3 mit SMIT1 zu einer Zunahme von V_{max} führte (siehe Abb. A und Tabelle), bleibt K_m unverändert (siehe Abb. B und Tabelle). Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet.

Im voran gegangenen Versuch konnte eine Änderung der Transporter-Kinetik durch die SGK-Isoformen ausgeschlossen werden. Um nachzuweisen, dass die durch die SGK-Isoformen erhöhten V_{max} -Werte auf eine verstärkte Transporter-Dichte in der Oozytenmembran zurückzuführen sind, wurde eine SMIT1-Mutante mit einem Haemagglutinin (HA) Tag generiert (siehe Material und Methoden). Es wurden 25 ng/Oozyte SMIT1-HA-cRNA und 7,5 ng/Oozyte SGK1-cRNA injiziert. Mittels Chemilumineszenz konnte die Transporter-Dichte quantifiziert werden. Das emittierte Licht war direkt proportional zur SMIT1-Proteinmenge in der Oozytenmembran. Um die Funktionalität des neu generierten SMIT1-HA zu überprüfen, wurden parallel zu den Chemilumineszenz-Versuchen einige Oozyten der jeweiligen Gruppe elektrophysiologisch gemessen. Die Perfusion der Oozyten mit 2 mM Myo-Inositol erzeugte einen Strom, der in der Gruppe mit SGK1 und SMIT1-HA signifikant höher war (206 \pm 32 %, (n=13)) als in der Referenzgruppe mit SMIT1 ohne SGK1 (100 \pm 25 %, (n=13)).

Ein Vergleich der Chemilumineszenz-Versuche mit den Voltage-Clamp Messungen zeigte, dass die erhöhte Transporter-Dichte mit erhöhten Myo-Inositol Strömen einher ging. Lediglich mit DEPC-Wasser injizierte Oozyten zeigten eine gemessene Lumineszenz von 0,9 \pm 0,1 RLU (n=11). Die Kontrollgruppe, die SMIT1 allein exprimiert, wies eine Lumineszenz von 1,0 \pm 0,1 RLU (n=11) auf, wohingegen die mit SGK1 und SMIT1 injizierten Oozyten ein signifikant erhöhtes Lichtsignal von 2,5 \pm 0,1 RLU (n=11) aufwiesen.

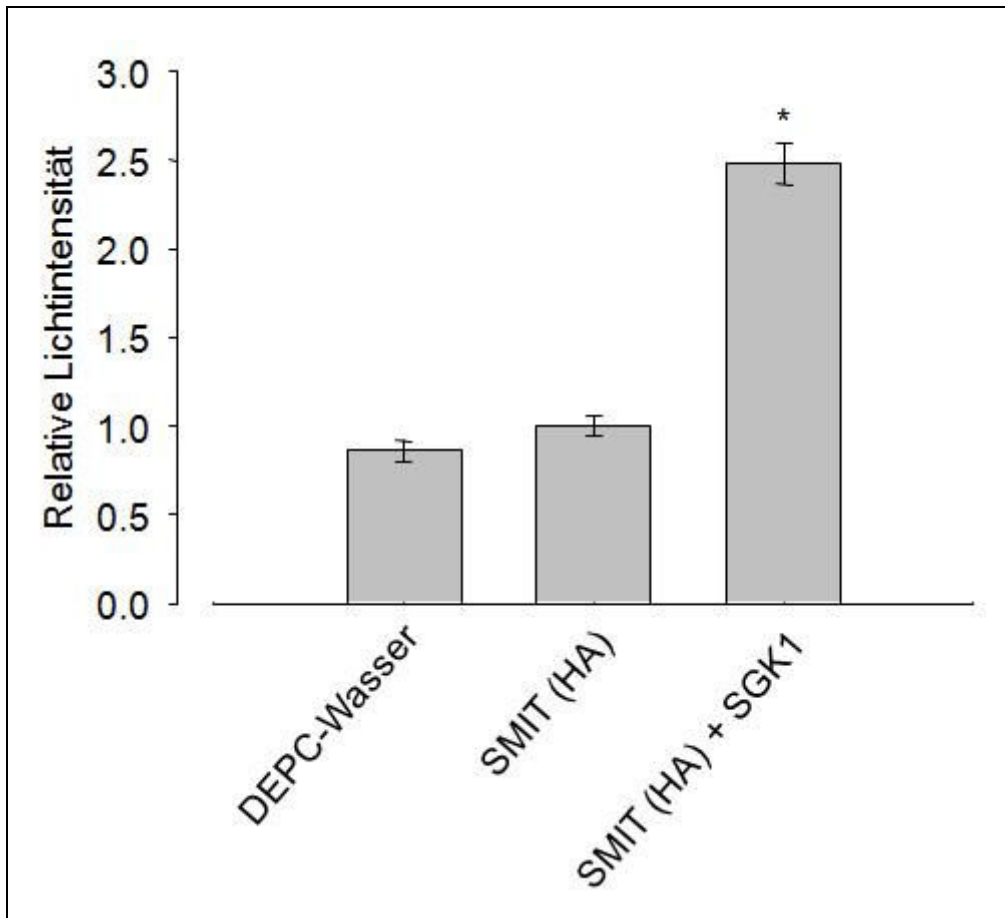


Abbildung 27: Die SGK1 erhöht die Transporter-Dichte von SMIT1 in der Oozytenmembran: Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler der Chemilumineszenz-Banden abgebildet. Die einzelnen Gruppen eines Batches an Oozyten wurden dabei auf den Mittelwert der Referenzgruppe (alleinige Expression von SMIT1-HA) normalisiert. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zur Referenzgruppe.

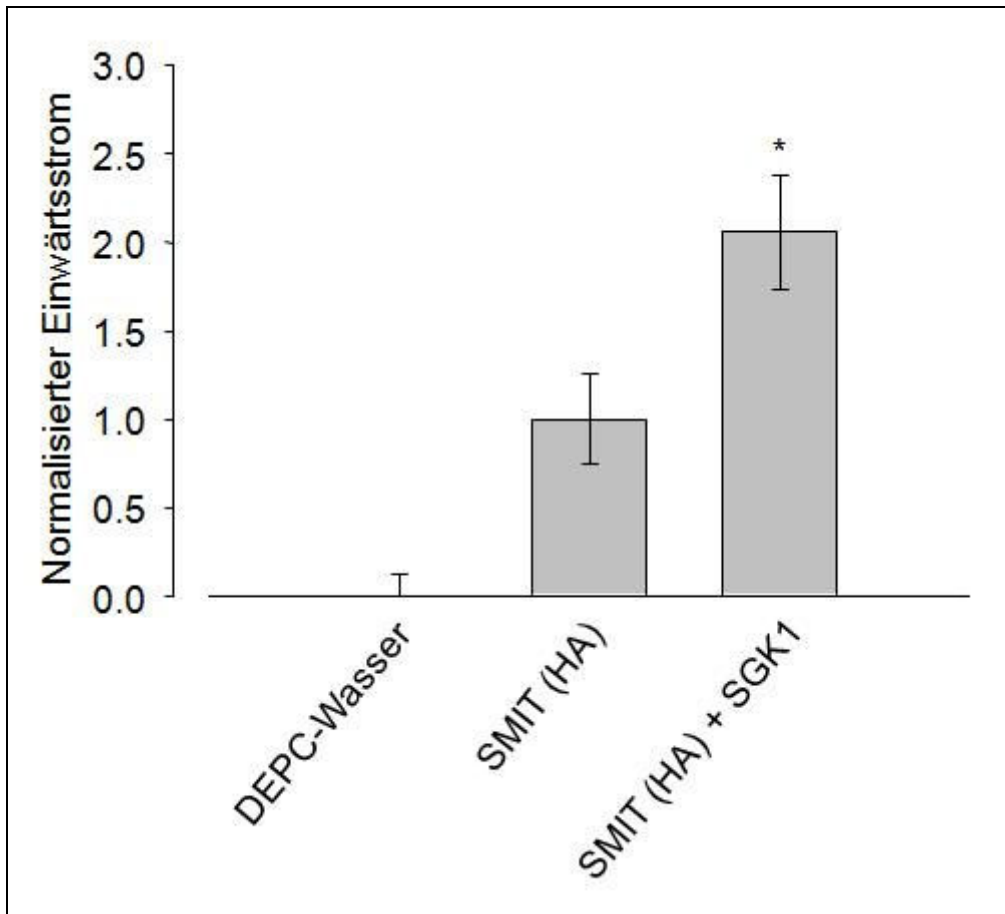


Abbildung 28: Die SGK1 erhöht die Transporter-Dichte von SMIT1 in der Oozytenmembran: Das Einbringen des extrazellulären HA-Tags veränderte nicht die funktionellen Eigenschaften des SMIT1 und ermöglichte weiterhin eine Stimulation durch die SGK1. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet, die durch Perfusion mit 2 mM Myo-Inositol entstanden. Die einzelnen Gruppen eines Batches an Oozyten wurden dabei auf den Mittelwert der Referenzgruppe (alleinige Expression von SMIT1-HA) normalisiert. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zur Referenzgruppe.

3.1.7 Die SGK1 stabilisiert den SMIT1 in der Oozytenmembran

Die nachgewiesene Zunahme der Transporter-Dichte durch die SGK1 in der Oozytenmembran kann auf zwei verschiedenen Mechanismen beruhen. Entweder führt eine Expression von SGK1 mit SMIT1 zu einem vermehrten Einbau von SMIT1 in die Oozytenmembran oder die SGK1 stabilisiert bereits in der Oozytenmembran vorhandenen SMIT1 und verhindert damit die Internalisierung. Um zwischen diesen beiden potentiellen Möglichkeiten differenzieren zu können, wurden die mit SMIT1- und ^{S422D}SGK1-cRNA bzw. DEPC-Wasser injizierten Oozyten mit Brefeldin A (BFA) inkubiert. Nach 4, 12

und 24 Stunden Inkubationszeit führte man Voltage-Clamp Messungen durch und quantifizierte damit den Myo-Inositol induzierten Strom. BFA unterbindet zum einen den Transport von Vesikeln vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat und verhindert zum anderen die Vesikel-Bildung im Golgi-Apparat selbst. Dadurch wird ein Einbau von Membranproteinen in die Oozytenmembran verhindert. Die verwendete Konzentration an BFA (5 μ M) reduziert die Überlebensfähigkeit der Oozyten nicht.

Eine Inkubation der Oozyten mit BFA führte zu verringerten Myo-Inositol induzierten Strömen. Es konnte gezeigt werden, dass die Verringerung des Stroms in Abhängigkeit zur Zeit bei Oozyten, die nur SMIT1 exprimierten signifikant größer war als bei Oozyten, die SMIT1 und SGK1 exprimierten. Während die Kontrollgruppe nach 12 Stunden BFA Inkubation noch einen relativen Strom von $0,7 \pm 0,1$ (n=12) auswies, konnte durch Koexpression von SGK1 ein relativer Strom von $0,9 \pm 0,1$ (n=20) detektiert werden. Nach 24 Stunden Inkubationszeit mit BFA war der stabilisierende Effekt der SGK1 noch deutlicher. Bei der Kontrollgruppe konnte ein relativer Strom von $0,5 \pm 0,1$ (n=17) gemessen werden, wohingegen die Oozyten mit SGK1 noch über einen relativen Strom von $0,8 \pm 0,1$ (n=20) verfügten.

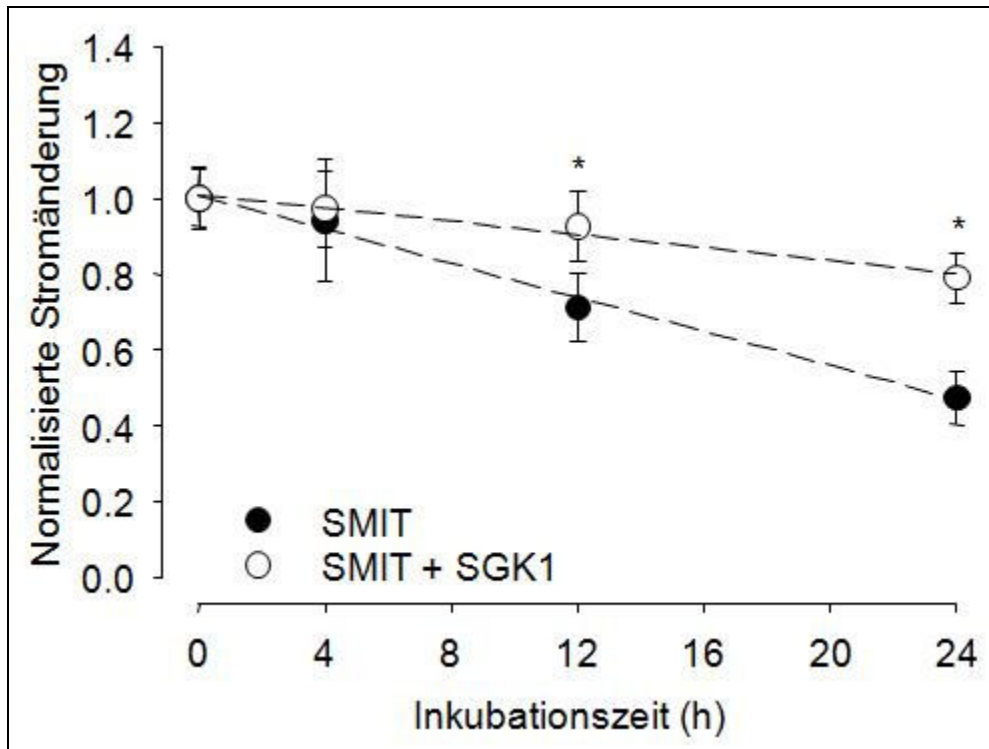


Abbildung 29: Koexpression von SGK1 stabilisiert SMIT1 in der Oozytenmembran: Die Abbildung zeigt normalisierte Myo-Inositol induzierte Ströme nach Inkubation mit 5µM Brefeldin A (BFA) zu den angegebenen Zeitpunkten. Nach 24 Stunden Inkubationszeit fiel der Strom in der Gruppe ohne SGK1 auf 50 % des Ausgangswertes wohingegen die Gruppe mit SGK noch über 80% des Ausgangswertes verfügte. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet, die durch Perfusion mit 2 mM Myo-inositol entstanden. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zwischen der Gruppe mit Koexpression von SGK1 gegenüber der alleinigen Expression von SMIT1.

3.2 Ergebnisse zum Oligo-Peptid-Transporter PepT2 (SLC15A2)

3.2.1 SGK1 und NHERF2, nicht aber NHERF1, stimulieren PepT2

Um Aussagen über eventuelle posttranslatorische Regulationsmechanismen der Protonen abhängigen Oligo-Peptid-Transporter 1 und 2 (PepT1 und PepT2) treffen zu können, wurde die cRNA des jeweiligen Transporters, jeweils 30 ng/Oozyte, in Oozyten von *Xenopus laevis* injiziert. Entsprechend des Versuchaufbaus wurde zusätzlich entweder DEPC-Wasser, die konstitutiv aktive Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1 (^{S422D}SGK1), „Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1“ (NHERF1) oder „Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 2“ (NHERF2) in die Oozyten injiziert. Die Injektionsmenge an Proteinkinase und den Gerüstproteinen NHERF1 und NHERF2 belief sich auf 15 ng/Oozyte. Für

die Voltage-Clamp Messungen perfundierte man die Oozyten zuerst mit normaler ND96-Lösung und wechselte dann auf eine ND96-Lösung, der das Dipeptid Glycin-Glycin (Gly-Gly) in der Konzentration von 10 mM zugesetzt war. Die mit PepT1 oder PepT2 ausgestatteten Oozyten nahmen das Dipeptid im Kotransport mit Protonen auf, was mittels Voltage-Clamp als Gly-Gly abhängiger Strom detektiert werden konnte.

Durch diese Versuchsanordnung konnte nachgewiesen werden, dass es in Oozyten, in denen ^{S422D}SGK1 und Pept2 koexprimiert wurden, zu einer Zunahme des Gly-Gly abhängigen Stroms kam. ^{S422D}SGK1 steigerte die PepT2-Aktivität auf $149 \pm 7,4$ % (n=118) gegenüber Oozyten, in die PepT2-cRNA und DEPC-Wasser injiziert worden war. Bei PepT1 konnte bei Koexpression von ^{S422D}SGK kein stimulativer Effekt gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden ($104 \pm 8,1$ % (n=41)).

Eine Koexpression von NHERF2 und PepT2 bzw. PepT1 führte zu ähnlichen Ergebnissen. Oozyten, die sowohl cRNA von NHERF2 als auch von PepT2 enthielten, erzeugten gegenüber der Kontrollgruppe eine Erhöhung des Gly-Gly abhängigen Stroms auf $188,6 \pm 13,9$ % (n=59), wohingegen PepT1 durch NHERF2 nicht reguliert wurde ($95,7 \pm 13,4$ % (n=18)).

NHERF1 konnte die Gly-Gly abhängigen Ströme weder bei PepT1 noch bei PepT2 steigern. Eine Koinjektion von NHERF1- und PepT1-cRNA erbrachte einen gegenüber der Kontrollgruppe normalisierten Strom von $96,5 \pm 10,4$ % (n=17). Injizierte man anstelle von NHERF1-cRNA die cRNA von NHERF2 lag der Strom bei $104,8 \pm 25,9$ % (n=13).

Oozyten, die lediglich mit DEPC-Wasser oder der cRNA von ^{S422D}SGK1, NHERF1 bzw. NHERF2 injiziert wurden, zeigten keine Gly-Gly abhängigen Ströme, was ein endogenes PepT1- bzw. PepT2-Vorkommen in Oozyten von *Xenopus laevis* ausschloss. Um sicherzustellen, dass der Translationsvorgang korrekt verlief, wurden die ^{S422D}SGK1-, NHERF1- und NHERF2-Proteine mit Hilfe von Western Blots aus lysierten Oozyten spezifisch nachgewiesen.

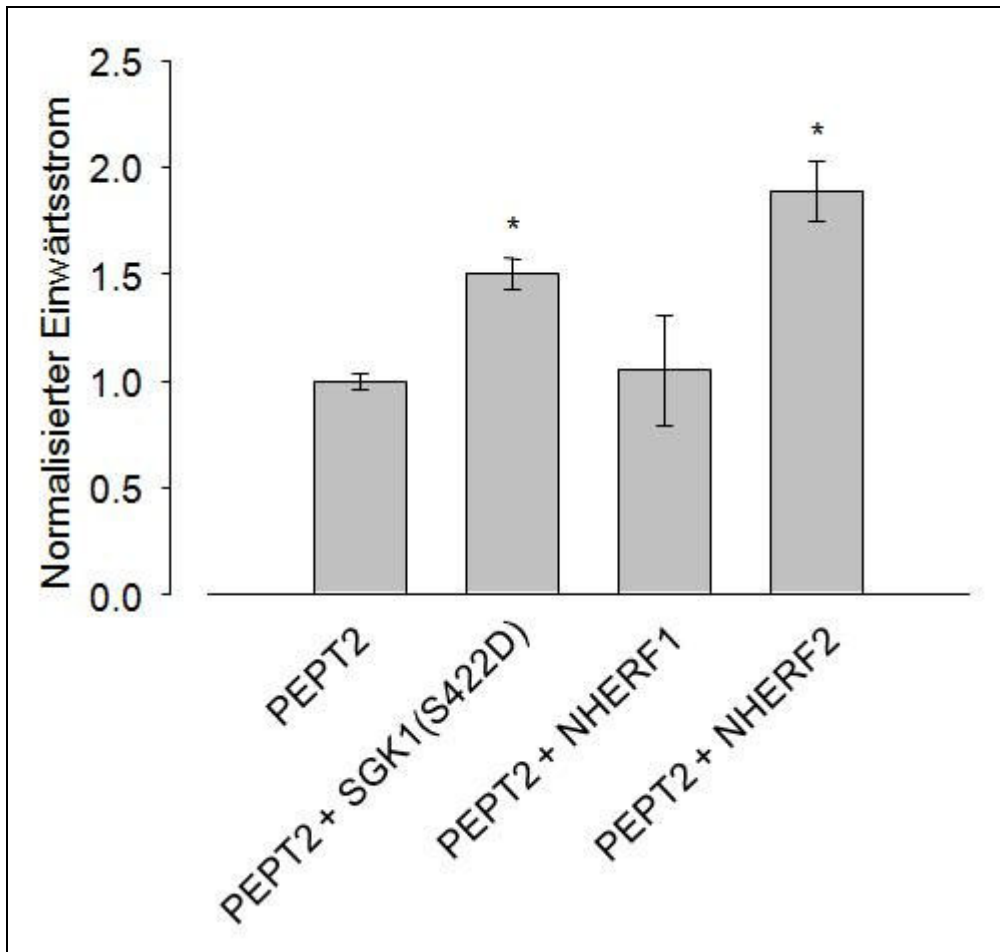


Abbildung 30: Die konstitutiv aktive ^{S422D}SGK1 und NHERF2, nicht jedoch NHERF1, stimulieren PepT2: Die Koinjektion von PepT2- und ^{S422D}SGK1- bzw. NHERF2-cRNA führte zur Stimulation des Transporters. NHERF1 war nicht in der Lage PepT2 in seiner Aktivität zu verändern. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet, die durch Perfusion mit 10 mM Gly-Gly entstanden. Die einzelnen Gruppen eines Batches an Oozyten wurden dabei auf den Mittelwert der Referenzgruppe (alleinige Expression von PepT2) normalisiert. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zur Referenzgruppe.

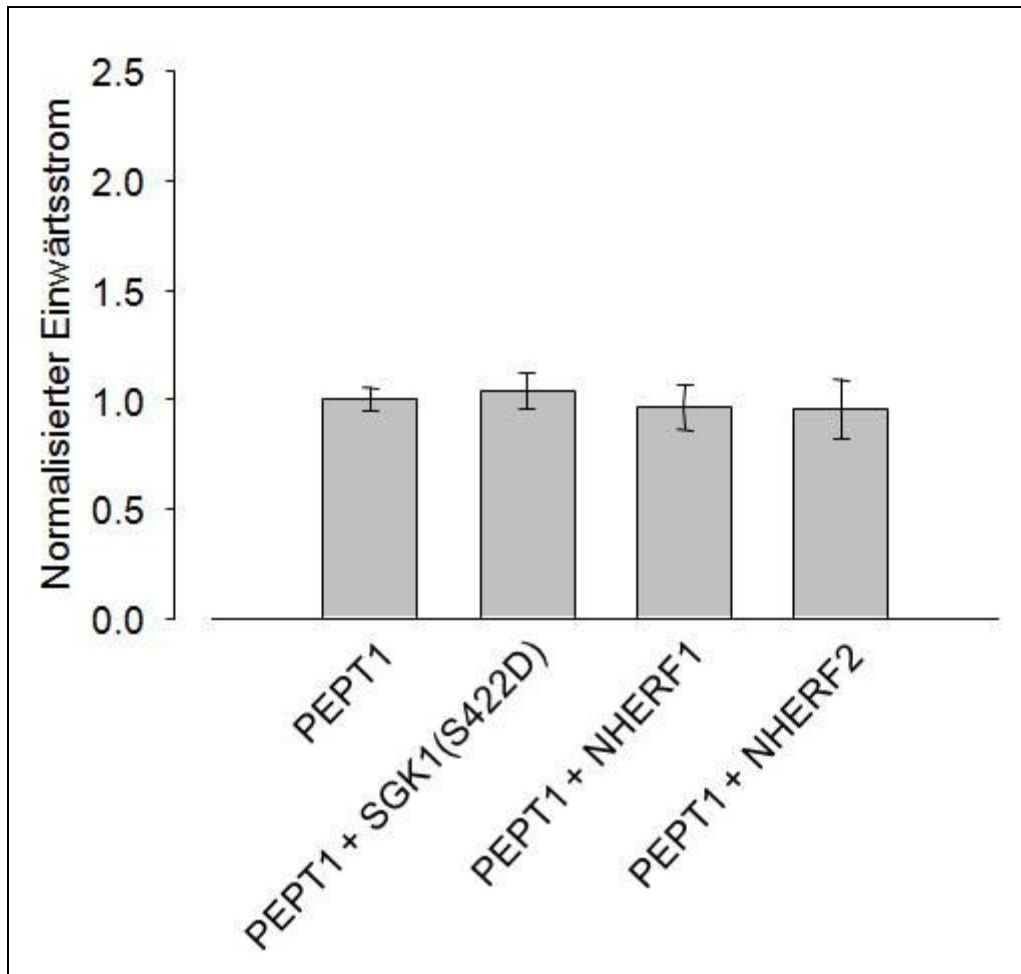


Abbildung 31: Die konstitutiv aktive ^{S422D}SGK1, NHERF1 und NHERF2 treten mit PepT1 nicht in Interaktion: PepT1 zeigte keine veränderte Aktivität bei Koexpression von ^{S422D}SGK1, NHERF1 oder NHERF2. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet, die durch Perfusion mit 10 mM Gly-Gly entstanden. Die einzelnen Gruppen eines Batches an Oozyten wurden dabei auf den Mittelwert der Referenzgruppe (alleinige Expression von PepT1) normalisiert.

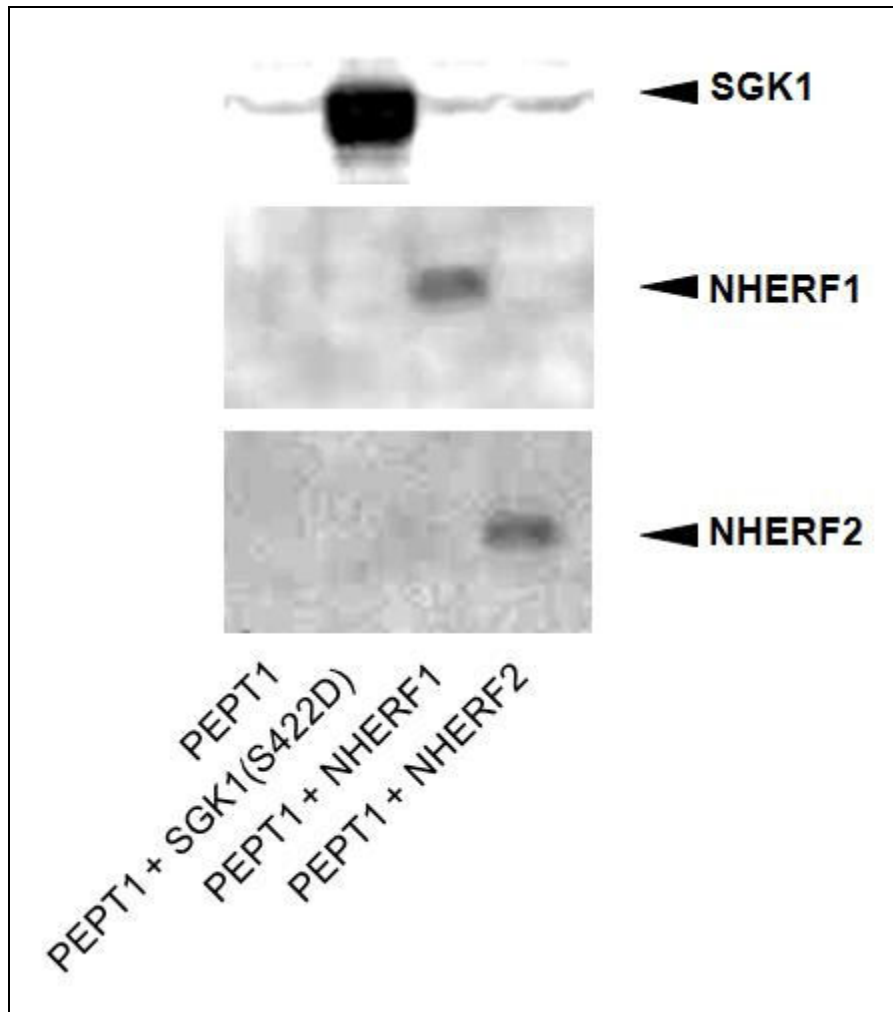


Abbildung 32: Nachweis der Interaktions-Proteine aus dem Lysat der Oozyten: Mit Hilfe von Western Blots konnte die korrekte Translation der ^{S422D}SGK1, NHERF1 und NHERF2 in lysierten Oozyten nachgewiesen werden.

3.2.2 Der stimulative Effekt von SGK1 auf PepT2 wird durch Mutation der Phosphorylierungsstelle von PepT2 aufgehoben

Der Protonen abhängige Oligo-Peptid-Transporter 2 (PepT2) weist in seiner Primärsequenz eine potentielle Phosphorylierungsstelle für die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase SGK1 auf. Genauer betrachtet handelt es sich hierbei um die Aminosäure Serin (Ser) an Position 185 innerhalb des PepT2-Proteins. Um nachzuweisen, dass die SGK1 über Phosphorylierung des Serins die PepT2-Transportaktivität verändert, wurde eine Mutante des PepT2 generiert. Hierfür ersetzte man das ¹⁸⁵Ser durch Alanin (Ala), was den Verlust der Phosphorylierungsstelle zur Folge hatte. Die so generierte Mutante

^{185}S PepT2 wurde in Oozyten zur Expression gebracht (30 ng/Oozyte an cRNA) und erzeugte dort bei Perfusion mit 2 mM Gly-Gly einen Strom von $77,2 \pm 9,4$ % (n=20) gegenüber Oozyten, die mit cRNA des Wildtyp PepT2 injiziert wurden. Koexprimierte man die ^{185}S PepT2 Mutante mit ^{3422}D SGK1 erhielt man einen relativen Strom von $77,6 \pm 11,5$ % (n=20) gegenüber dem Wildtyp PepT2. Die regelrechte Expression der ^{3422}D SGK1 in diesem Versuch wurde erneut mittels Western Blot Experimenten aus dem Lysat der elektrophysiologisch gemessenen Oozyten bestätigt.

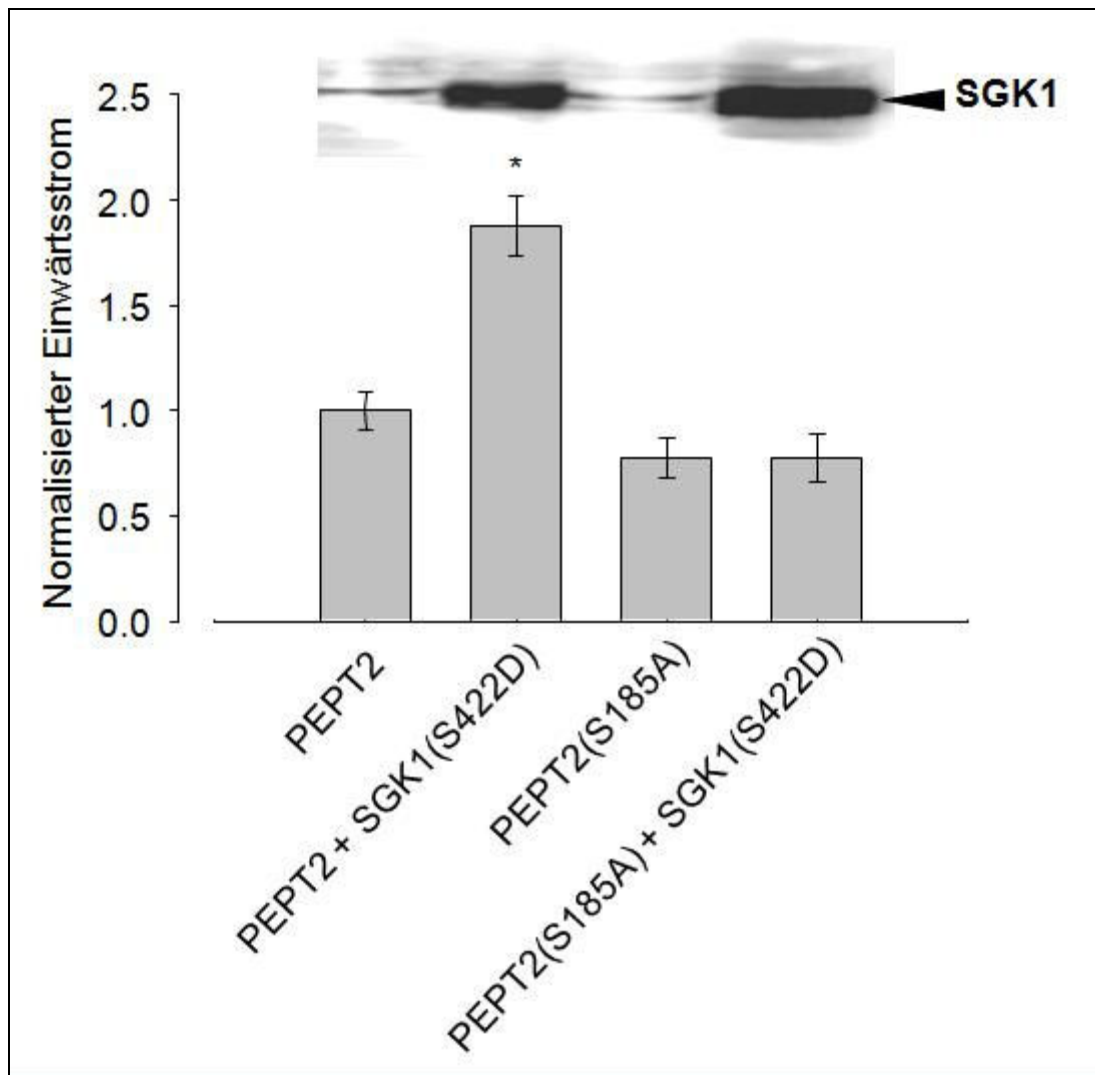


Abbildung 33: Die SGK1 interagiert mit PepT2 über Phosphorylierung des ^{185}Ser : Für die Stimulation von PepT2 durch die SGK1 ist eine intakte Phosphorylierungsstelle notwendig. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet, die durch Perfusion mit 10 mM Gly-Gly entstanden. Die einzelnen Gruppen eines Batches an Oozyten wurden dabei auf den Mittelwert der Referenzgruppe (alleinige Expression von Wildtyp PepT2) normalisiert. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zur Referenzgruppe. Mit Hilfe von spezifischen Western Blots konnte die korrekte Translation der ^{3422}D SGK1 in lysierten Oozyten nachgewiesen werden.

3.2.3 Die zweite PDZ-Domäne des NHERF2 ist für die Aktivierung des PepT2 erforderlich

In den voran gegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass NHERF2 in der Lage ist PepT2 in seiner Aktivität zu erhöhen. NHERF2 tritt über zwei verschiedene PDZ Domänen, die eine Protein-Protein-Interaktion ermöglichen, mit Membrantransportern in Verbindung. Um klären zu können, welche der beiden PDZ Domänen für die Stimulation von PepT2 verantwortlich ist, wurden NHERF2-Mutanten benutzt, bei denen je eine PDZ Domäne mutiert war. Die NHERF2-Mutanten NHERF2 Δ P1 und NHERF2 Δ P2 sowie der Wildtyp NHERF2 wurden in der Konzentration von 15 ng/Oozyte injiziert. Die cRNA von PepT2 lag bei 30 ng/Oozyte.

Oozyten, die mit PepT2 und NHERF2 Δ P1 koinjiziert waren, zeigten in den elektrophysiologischen Messungen einen Gly-Gly induzierten Strom von $156,4 \pm 14,9$ % (n=24) gegenüber der Gruppe mit PepT2 und DEPC-Wasser. Damit lagen die Ströme in dieser Gruppe signifikant höher als in der Referenzgruppe. Gegenüber Oozyten, die cRNA von PepT2 und Wildtyp NHERF2 enthielten, zeigte sich kein signifikanter Unterschied, was nahe legt, dass eine Mutation der ersten PDZ Domäne für die Regulation des PepT2 als irrelevant angesehen werden kann.

Die Injektion von PepT2 und NHERF2 Δ P2 führte hingegen zu einem relativen Strom von $97,1 \pm 10,8$ % (n=28) gegenüber der Referenzgruppe.

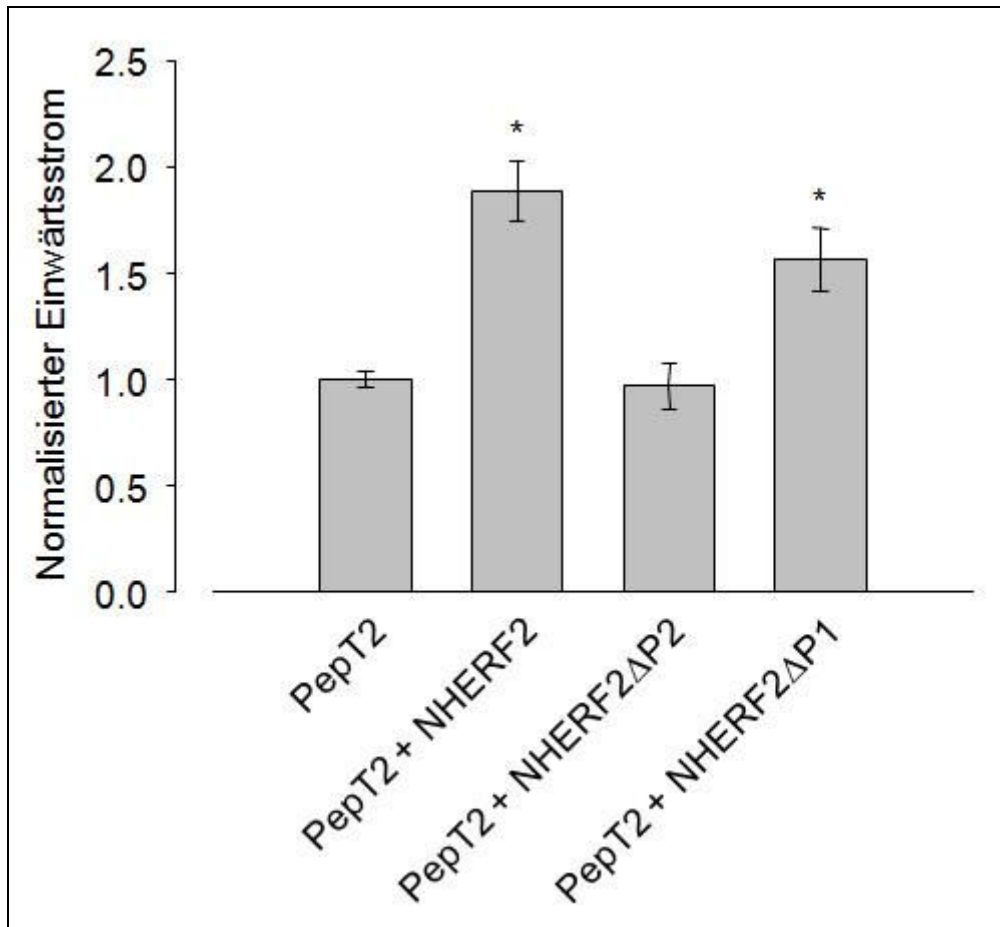


Abbildung 34: Die zweite PDZ Domäne des NHERF2 ist für die PepT2 Aktivierung notwendig: *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit PepT2- und/oder NHERF2ΔP1- bzw. NHERF2ΔP2-cRNA injiziert. Die Koexpression von PepT2 und NHERF2ΔP1 zeigt keinen signifikanten Unterschied zur Gruppe mit PepT2 und Wildtyp NHERF2. Der stimulative Effekt von NHERF2 fehlte bei der Gruppe mit NHERF2ΔP2, was die Wichtigkeit der zweiten PDZ Domäne widerspiegelte. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet, die durch Perfusion mit 10 mM Gly-Gly entstanden. Die einzelnen Gruppen eines Batches an Oozyten wurden dabei auf den Mittelwert der Referenzgruppe (alleinige Expression von PepT2) normalisiert. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zur Referenzgruppe.

3.2.4 Das PDZ Bindungsmotiv am C-Terminus von PepT2 ist für die Interaktion mit NHERF2 verantwortlich

In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass NHERF2 über seine PDZ Domänen an spezifische Sequenzen am C-Terminus des Zielproteins bindet. PepT2 weist an seinem C-Terminus ein solches PDZ Bindungsmotiv auf. Um nachzuweisen, dass das PDZ Bindungsmotiv für die Interaktion zwischen PepT2 und NHERF2 eine Rolle spielt, wurde eine PepT2 Mutante generiert. Diese Mutante (PepT2ΔC) wurde mit bzw. ohne NHERF2 in Oozyten exprimiert und elektrophysiologisch gemessen. Die cRNA-Menge betrug 30 ng/Oozyte für

PepT2 Δ C und 15 ng /Oozyte für NHERF2. Die mit NHERF2- und PepT2 Δ C-cRNA injizierten Oozyten wiesen gegenüber der Kontrollgruppe einen relativen Gly-Gly induzierten Strom von $90,0\pm 7,8$ % (n=26) auf. Das funktionsfähige NHERF2 Protein wurde aus den elektrophysiologisch untersuchten Oozyten mittels Western Blot nachgewiesen.

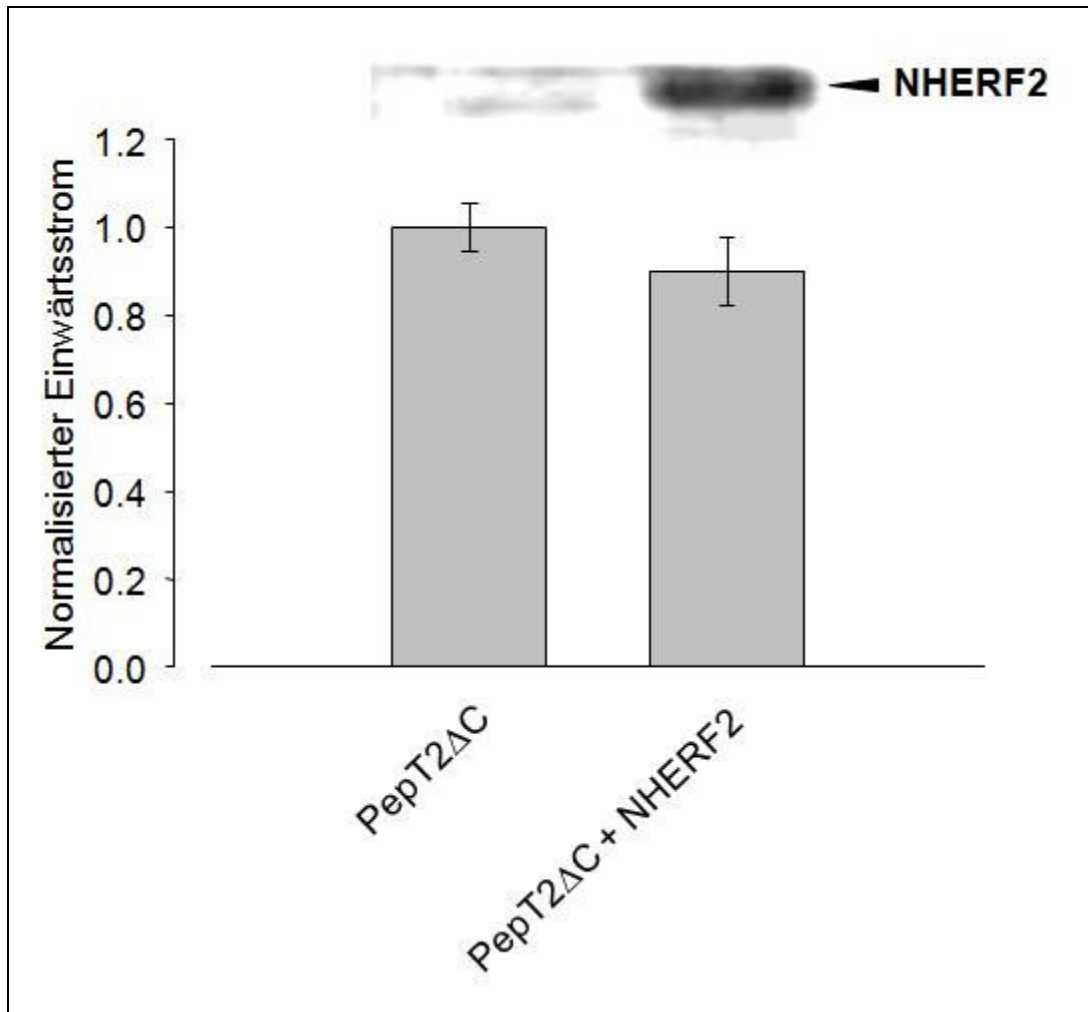


Abbildung 35: Das PDZ Bindungsmotiv am C-Terminus von PepT2 ist für die Interaktion mit NHERF2 notwendig: Oozyten von *Xenopus laevis* wurden mit cRNA von PepT2 Δ C und NHERF2 injiziert. Elektrophysiologisch war kein signifikanter Unterschied in den beiden Gruppen zu detektieren. Das NHERF2 Protein lag in funktionsfähiger Form vor, was durch die Aufarbeitung der Oozyten mit Hilfe von Western Blots gezeigt werden konnte.

3.2.5 ^{S422D}SGK1 und NHERF2 erhöhen die maximale Transportrate von PepT2 ohne Änderung der Substrat-Affinität

Die nachgewiesenen stimulativen Effekte von SGK1 und NHERF2 auf PepT2 können entweder dadurch zustande kommen, dass vermehrt PepT2 in die Oozytenmembran integriert wird oder dass sich die Substrat-Affinität von PepT2 ändert. Um diese Frage klären zu können, wurden Voltage-Clamp Messungen mit verschiedenen Konzentrationen an Gly-Gly vorgenommen. Es wurden Gly-Gly Lösungen der Konzentrationen 0,003 mM, 0,01 mM, 0,03 mM, 0,1 mM, 0,3 mM, 1,0 mM und 3,0 mM hergestellt. Eine Oozyte wurde hierbei während einer Voltage-Clamp Messung nacheinander mit den ansteigenden Konzentrationen an Gly-Gly perfundiert und der jeweils abgeleitete Strom aufgezeichnet. Zwischen den einzelnen Gly-Gly Lösungen wurde mit ND96-Lösung zwischengeschpült um die Oozyten wieder auf das Ausgangsniveau zurück zu setzen.

Zur Durchführung der Experimente wurden drei verschiedene Oozytengruppen mit cRNA injiziert; PepT2, PepT2 mit ^{S422D}SGK1 und PepT2 mit NHERF2. In Bezug auf die halb-maximale Substratkonzentration (K_m) war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit SGK bzw. NHERF2 und der Kontrollgruppe zu detektieren. Durch Zuhilfenahme der Hill-Gleichung berechnete man die V_{max} -Werte. V_{max} spiegelt hierbei den maximal detektierten Gly-Gly abhängigen Strom ($I_{Gly-Gly}$) wider. V_{max} lag für die Gruppe mit ^{S422D}SGK1 bzw. NHERF2 signifikant höher als V_{max} der Kontrollgruppe.

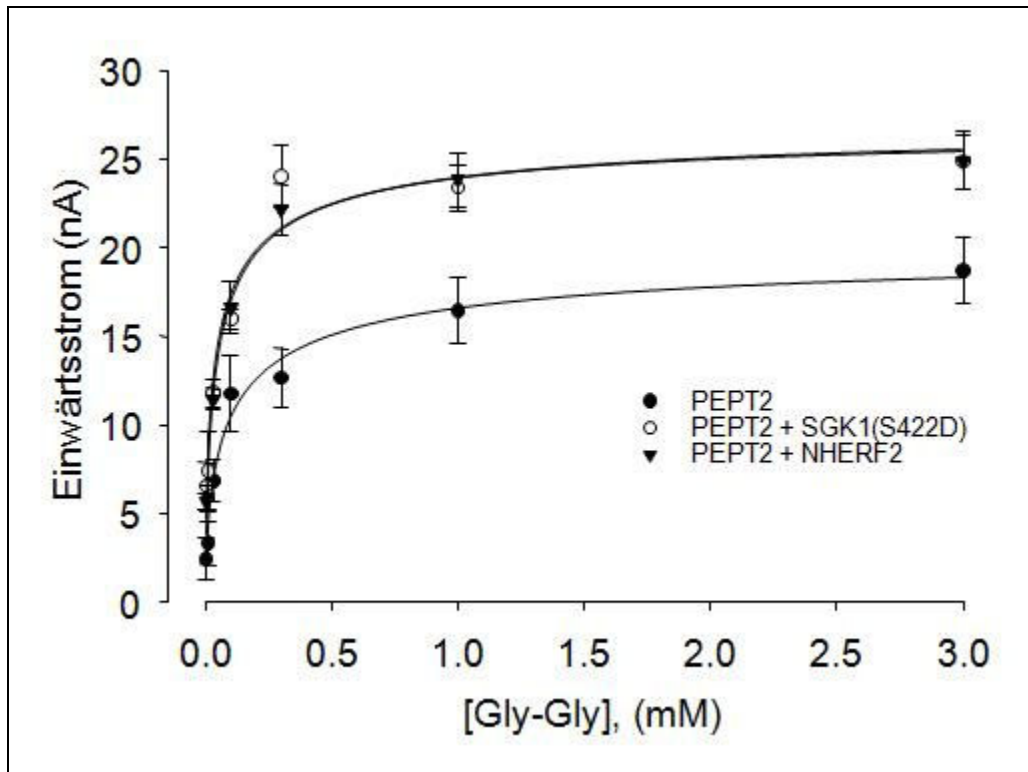


Abbildung 36: Kinetikmessungen der Gly-Gly induzierten Ströme bei PepT2: Eine Koexpression von S^{422D} SGK1 bzw. NHERF2 mit PepT2 führte zu einer Zunahme von V_{max} . K_m blieb unverändert. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet. Die Daten wurden auf den Maximalwert der Kontrollgruppe (Oozyten, die nur mit PepT2-cRNA injiziert wurden) normalisiert.

cRNA	K_m (mM)	V_{max}	$P(V_{max})$	n
PepT2	$0,061 \pm 0,018$	$20,6 \pm 3,4$		3
PepT2 + S^{422D} SGK1	$0,066 \pm 0,010$	$27,0 \pm 1,9$	<0,05	3
PepT2 + NHERF2	$0,060 \pm 0,013$	$27,5 \pm 2,7$	<0,05	3

Tabelle 10: Kinetikmessungen der Gly-Gly induzierten Ströme bei PepT2: Es fanden sich innerhalb der Gruppen keine Änderung der halbmaximalen Substratkonzentration. V_{max} wurde hingegen durch S^{422D} SGK1 bzw. NHERF2 signifikant erhöht.

3.2.6 Die SGK1 und NHERF2 erhöhen die Transporterdichte von PepT2 in der Oozytenmembran

Es konnte schon bei mehreren Membrantransportern und –kanälen gezeigt werden, dass die SGK1 die Transporter- bzw. Kanaldichte in der Oozytenmembran erhöht. Ob dies auch bei PepT2 der Fall ist, sollte mit Western Blot Experimenten nachgewiesen werden. Hierfür wurden 30 ng cRNA von PepT2 und 15 ng an cRNA von ^{S422D}SGK1 bzw. NHERF2 in Oozyten injiziert. Nach 4 Tagen Inkubationszeit wurde die Membranfraktion vom Zytoplasma der Oozyten getrennt und das PepT2-Protein in der Membranfraktion quantifiziert. Die Membranfraktion der Oozyten, die PepT2 und ^{S422D}SGK1 exprimierten, erzeugte im Western Blot eine Bandenintensität von $142,5 \pm 9,1$ % (n=3) gegenüber der Gruppe von Oozyten, die nur PepT2 exprimierten. Eine Koexpression von PepT2 und NHERF2 erbrachte eine Erhöhung auf $120,3 \pm 9,3$ % (n=3). Injizierte man PepT2 als auch ^{S422D}SGK1 und NHERF2 steigerte sich die Intensität sogar auf $149,4 \pm 11,4$ % (n=3). Mit der abschließenden Signifikanzprüfung konnte gezeigt werden, dass sowohl die ^{S422D}SGK1 als auch NHERF2 die Transporterdichte in der Oozytenmembran signifikant erhöhten.

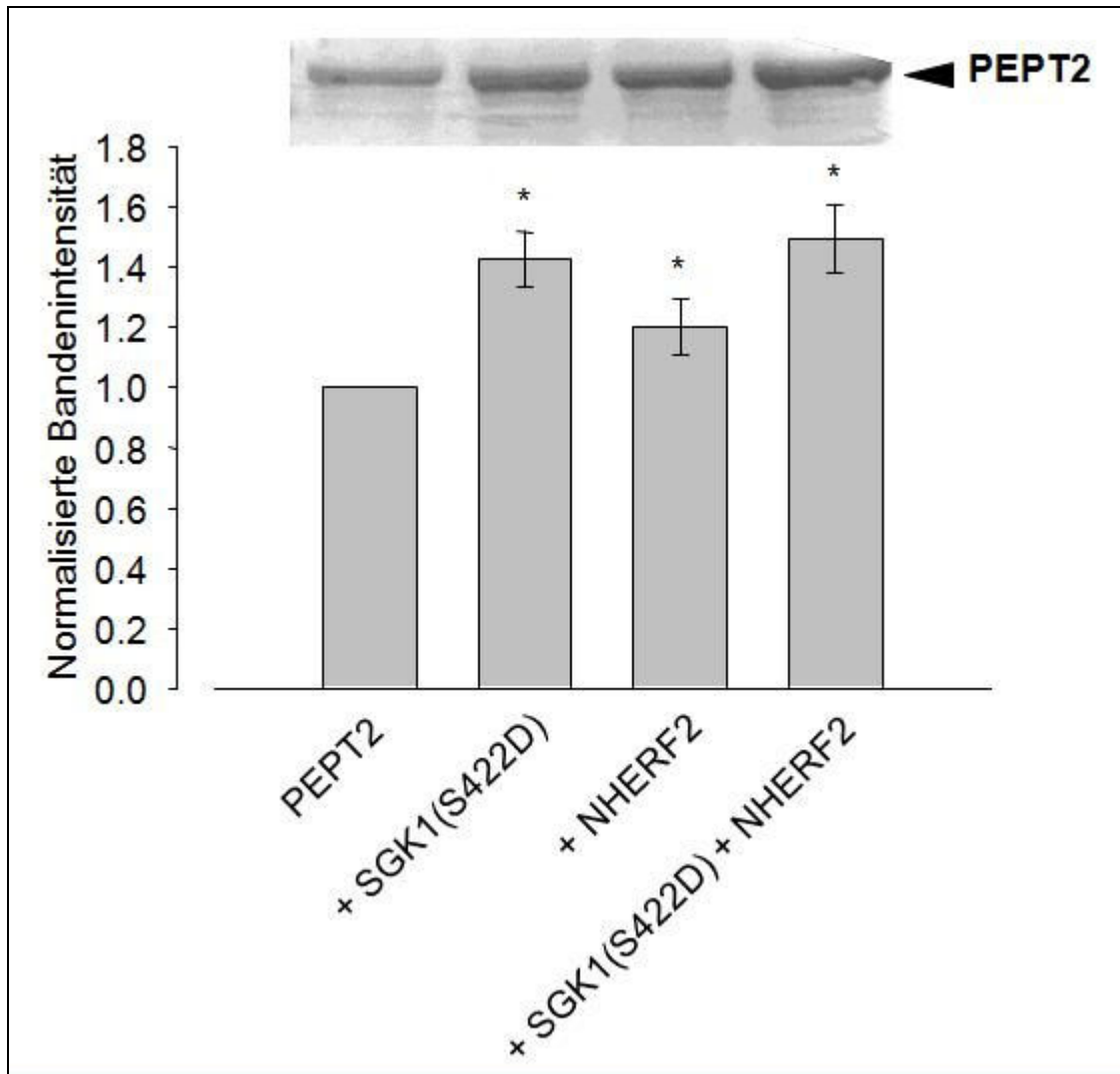


Abbildung 37: ^{S422D}SGK1 und NHERF2 erhöhen die Transporterdichte von PepT2 in der Oozytenmembran: Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler der Chemilumineszenz-Banden abgebildet. Die Bandenintensität wurde mittels Quantity One® Analysis software (Biorad, Munich, Germany) quantifiziert. Die einzelnen Gruppen eines Batches an Oozyten wurden dabei auf den Mittelwert der Referenzgruppe (alleinige Expression von PepT2) normalisiert. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zur Referenzgruppe.

3.2.7 Die SGK1 und NHERF2 stabilisieren PepT2 in der Oozytenmembran

NHERF2 hat neben seiner Funktion als „Gerüst-Protein“ auch die Eigenschaft in die Regulation von Endo- und Exozytose einzugreifen. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine Koexpression von NHERF2 entweder zu einem vermehrten Einbau von PepT2 in die Oozytenmembran führt oder bereits in der Oozytenmembran befindlicher PepT2 dort stabilisiert wird. Um zwischen diesen beiden potentiellen Möglichkeiten differenzieren zu können, wurden die mit PepT2- und NHERF2- bzw. ^{S422D}SGK1-cRNA injizierten Oozyten, mit einem

Dynamamin Inhibitor (DYNASORE) inkubiert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit führte man Voltage-Clamp Messungen durch und quantifizierte damit den Gly-Gly induzierten Strom.

Eine Inkubation der Oozyten mit 1 μ M DYNASORE führte zu verringerten Gly-Gly induzierten Strömen. Es konnte gezeigt werden, dass die Verringerung des Stroms in Abhängigkeit zur Zeit bei Oozyten, die nur PepT2 exprimierten signifikant größer war als bei Oozyten, die PepT2 und NHERF bzw. SGK1 exprimierten.

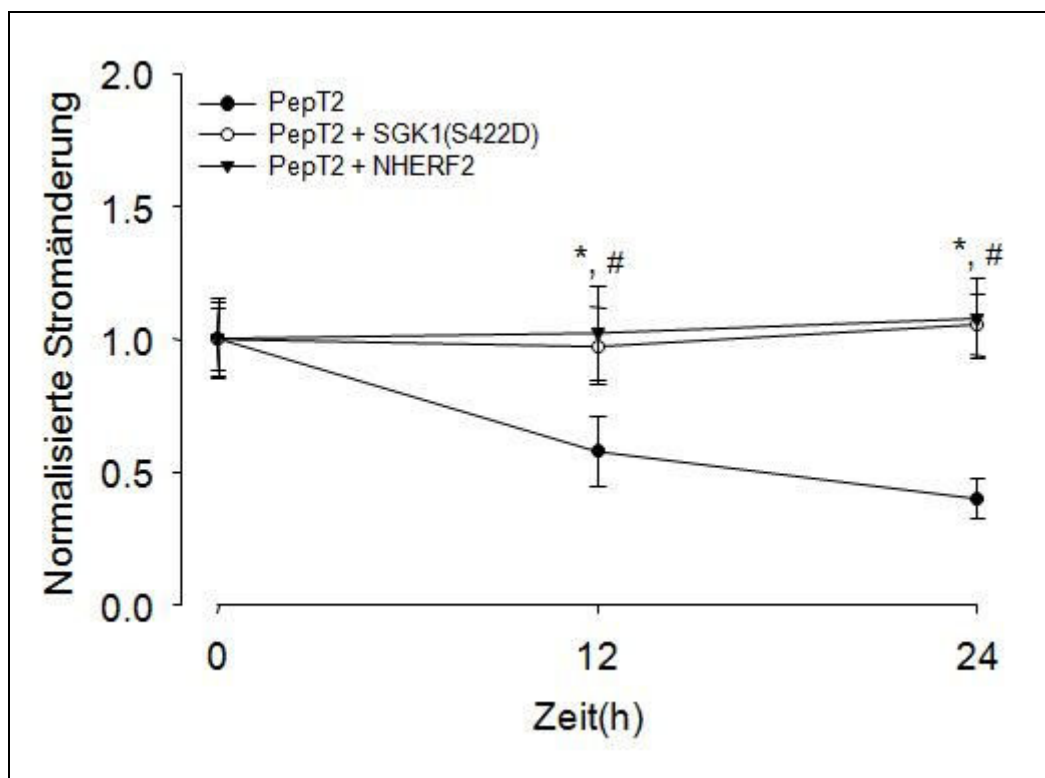


Abbildung 38: Koexpression von ^{S422D}SGK1 bzw. NHERF2 stabilisiert PepT2 in der Oozytenmembran: Die Abbildung zeigt normalisierte Gly-Gly induzierte Ströme nach Inkubation mit 1 μ M DYNASORE nach 24 Stunden (h). Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet, die durch Perfusion mit 10 mM Gly-Gly entstanden. Jede der drei Gruppen wurde auf sich selbst normalisiert. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zwischen der Gruppe mit Koexpression von SGK1 gegenüber der alleinigen Expression von PepT2. # kennzeichnet den signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zwischen der Gruppe mit Koexpression von NHERF2 gegenüber der alleinigen Expression von PepT2.

3.2.8 SGK1 und NHERF2 stimulieren PepT2 unabhängig

Die SGK1 besitzt ähnlich dem PepT2 ein PDZ Bindungsmotiv. Es wäre also möglich, dass NHERF2 über seine zweite PDZ Domäne an das PDZ

Bindungsmotiv von PepT2 bindet und gleichzeitig über seine erste PDZ Domäne eine Bindung mit der ^{S422D}SGK1 einget. Dies hätte zur Folge, dass PepT2 und ^{S422D}SGK1 sehr nahe zueinander zum liegen kämen. Die Wahrscheinlichkeit einer Phosphorylierung von PepT2 und damit verbundene Stimulation wäre erhöht. Es müsste also zu einem signifikanten additiven Effekt kommen, wenn man PepT2, ^{S422D}SGK1 und NHERF2 koexprimiert.

Es wurden entsprechend der unten stehenden Abbildung 8 Gruppen Oozyten injiziert. Die Konzentration an cRNA belief sich für den Wildtyp NHERF2, NHERF2 Δ P1, NHERF2 Δ P2 und ^{S422D}SGK1 auf 15 ng/Oozyte und für PepT2 auf 30 ng/Oozyte. Eine Koexpression von PepT2, NHERF2 und ^{S422D}SGK1 erbrachte keinen additiven Effekt (197,7 \pm 15,2 % (n=43) gegenüber der Gruppe mit PepT2 und ^{S422D}SGK1.

Des Weiteren zeigte sich, dass eine Koexpression von PepT2, NHERF2 Δ P2 und ^{S422D}SGK1 zu einer signifikanten Stimulation gegenüber einer Koexpression von PepT2 und NHERF2 Δ P2 führte (136,7 \pm 14,3 % (n=28)). Diese beiden Beobachtungen legen nahe, dass die SGK1 und NHERF2 den PepT2 unabhängig voneinander stimulieren.

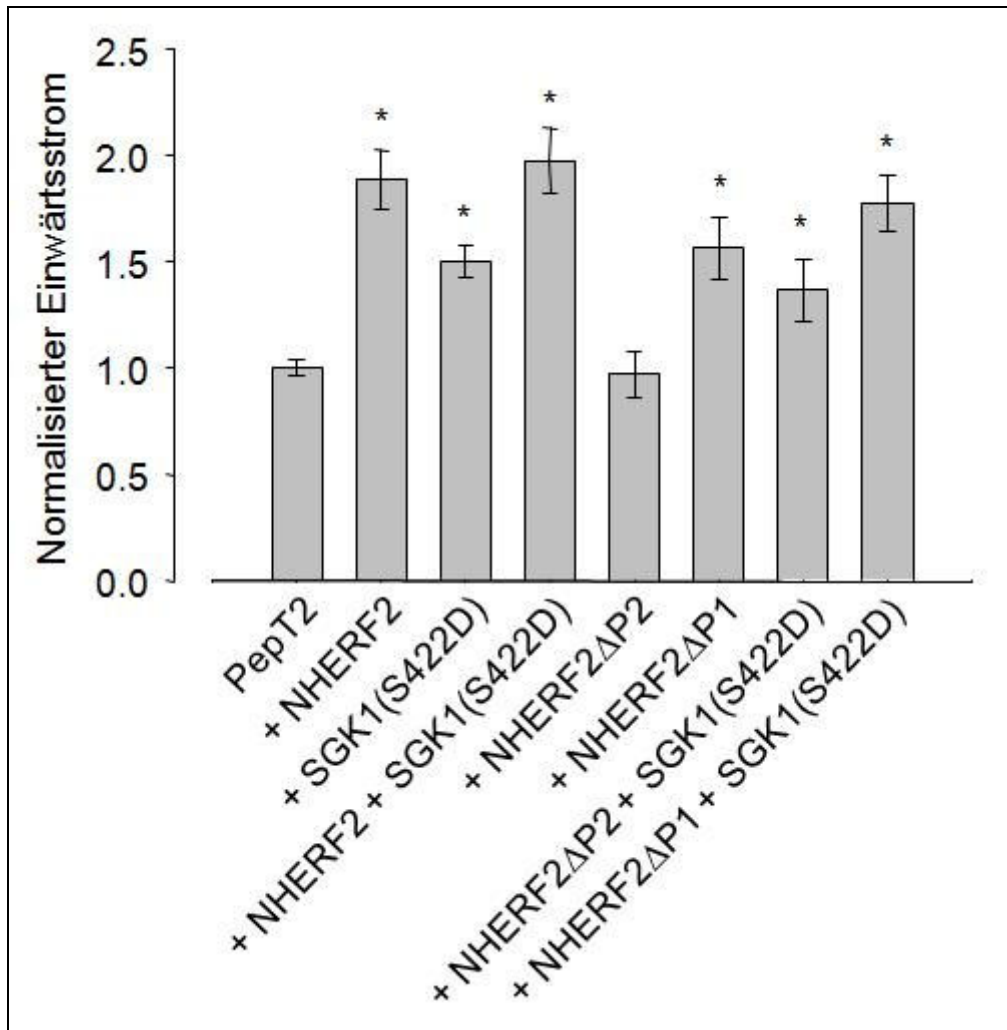


Abbildung 39: SGK1 und NHERF2 stimulieren PepT2 unabhängig voneinander: Eine Koexpression von PepT2, ^{S422D}SGK1 und NHERF2 erbrachte keinen additiven Effekt. Eine Koexpression von PepT2, NHERF2ΔP1 bzw. NHERF2ΔP2 und ^{S422D}SGK1 führte zu einer signifikanten Stimulation gegenüber der Koinjektion von PepT2 und NHERF2ΔP1 bzw. NHERF2ΔP2. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet, die durch Perfusion mit 10 mM Gly-Gly entstanden. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied (P<0,05) zur Gruppe mit der alleinigen Expression von PepT2 bzw. von PepT2 + NHERF2ΔP2.

3.2.9 Der Natrium-Protonen-Austauscher NHE3 stimuliert PepT2

Die funktionelle Interaktion von NHE3 und PepT2 konnte bereits in primären Zellkulturen von Astrozyten der Maus nachgewiesen werden. Um mögliche stimulative Effekte von NHE3 auf PepT2 zu untersuchen, exprimierte man PepT2, NHE3 und NHERF2 in den unten stehenden Abbildung zu entnehmenden Kombinationen. Die verwendete cRNA-Menge lag für PepT2 und NHE3 bei 30 ng/Oozyte und für NHERF2 bei 15 ng/Oozyte. Die

durchgeführten elektrophysiologischen Messungen zeigten, dass eine Koexpression von PepT2 und NHE3 zu einem, gegenüber der Referenzgruppe, erhöhten Gly-Gly abhängigen Strom von $198,3 \pm 12,6$ % (n=13) führte. Injizierte man die cRNA von PepT2, NHE3 und NHERF2 in Oozyten von *Xenopus laevis* steigerte sich der Strom auf $256,6 \pm 17,8$ % (n=12).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Gly-Gly induzierten Ströme in den Gruppen ohne NHE3 natriumunabhängig waren. Wurden hingegen Oozyten, die PepT2 und NHE3 koexprimierten, mit 10 mM natriumfreier Gly-Gly Lösung perfundiert, änderte sich der Strom. Er sank bei Perfusion mit natriumfreiem Gly-Gly auf $44,3 \pm 4,7$ % (n=13) gegenüber der Perfusion mit natriumhaltiger Gly-Gly-Lösung. Unter natriumfreien Bedingungen zeigte eine Koexpression von PepT2, NHE3 und NHERF2 ebenfalls einen gegenüber der Perfusion mit natriumhaltigen Gly-Gly verringerten Strom ($51,7 \pm 6,7$ % (n=12)). Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass PepT2 durch Koinjektion von NHE3 teilweise natriumabhängig wird.

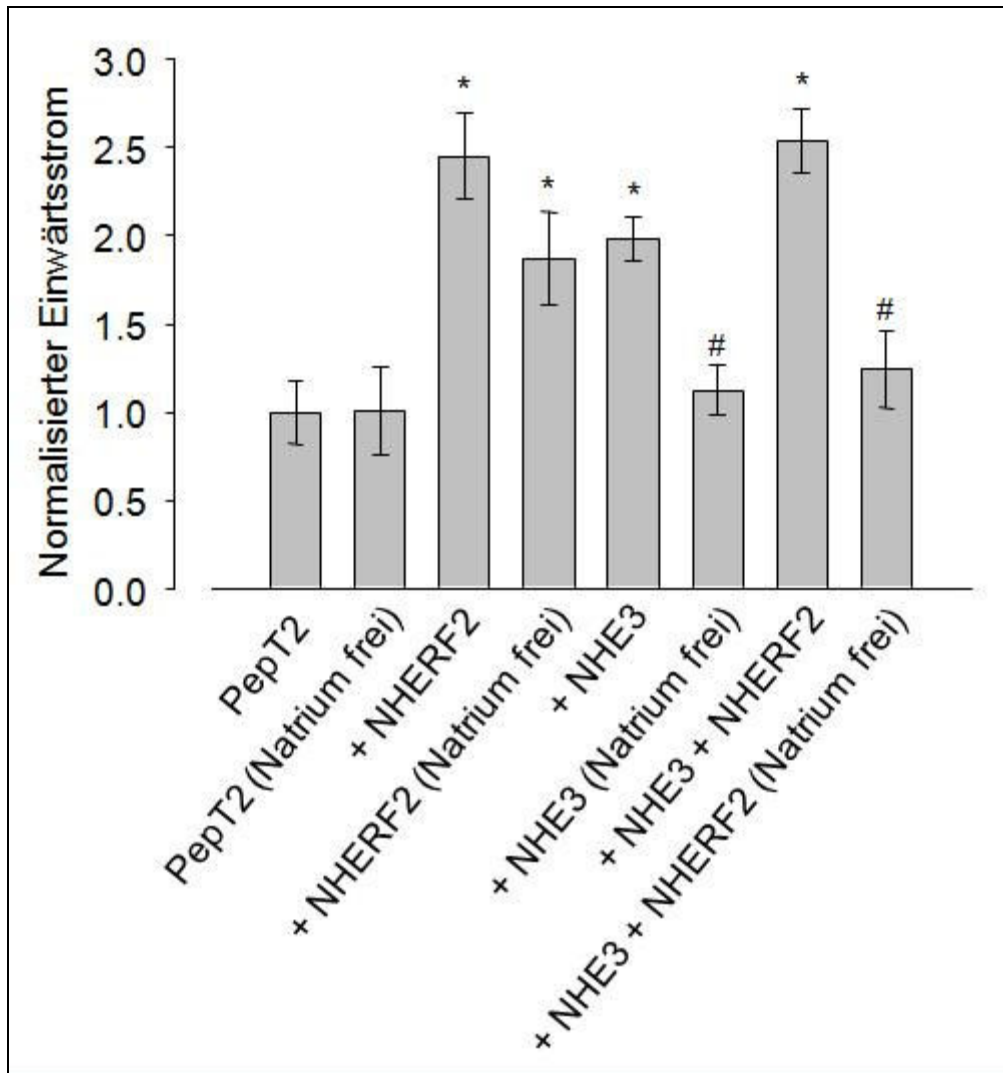


Abbildung 40: Der Natrium-Protonen-Austauscher NHE3 stimuliert PepT2: Eine Koinjektion von PepT2 und NHE3 führte zur Stimulation. Unter Koexpression von NHE3 wurde der Dipeptid-Transport von PepT2 teilweise natriumabhängig. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet, die durch Perfusion mit 10 mM Gly-Gly entstanden. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zur Gruppe mit der alleinigen Expression von PepT2. Bestand innerhalb einer Gruppe an Oozyten ein signifikanter Unterschied ($P < 0,05$) in der Perfusion mit natriumfreier Gly-Gly-Lösung gegenüber der Perfusion mit natriumhaltiger Gly-Gly-Lösung, so wurde die Gruppe mit # gekennzeichnet.

3.3 Ergebnisse zum Aminosäure-Transporter B^oAT (SLC6A19)

3.3.1 Die Isoformen der SGK stimulieren den B^oAT

Bereits in mehreren dieser Arbeit voran gegangenen Publikationen konnte gezeigt werden, dass die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase SGK Membrantransporter und -kanäle reguliert. Um eine potentielle

posttranslatorische Regulation des B^oAT durch die SGK nachweisen zu können, wurden *Xenopus laevis* Oozyten mit cRNA von BoAT (25 ng/Oozyte) und den SGK-Isoformen (jeweils 7,5 ng/Oozyte) koexprimiert. Nach 4-5 Tagen Inkubationszeit ermittelte man mit Hilfe der Voltage-Clamp Methode die durch Substratgabe von 2 mM Leucin Lösung erzeugten spezifischen Ströme. Die Höhe des Stroms wurde als Maß der Transporter-Aktivität herangezogen.

Eine Koexpression des Wildtyps von SGK1 und B^oAT erhöhte den Leucin abhängigen Strom auf 130,05±18,28 % (n=19) gegenüber der Referenzgruppe, die lediglich B^oAT und DEPC-Wasser enthielt. Oozyten, in die neben B^oAT-cRNA auch noch Wildtyp-cRNA der SGK2 bzw. SGK3 injiziert worden war, wiesen einen gegenüber der Kontrollgruppe erhöhten Leucin Strom von 143,44±14,34 % (n=18) bzw. 140,17±18,75 % (n=18) auf.

Der stimulative Effekt der Wildtyp-Isoformen der SGK konnte durch Injektion der konstitutiv aktiven Isoformen ^{S422D}SGK1, ^{S356D}SGK2 und ^{S419D}SGK3 bestätigt werden. Koinjektion von ^{S422D}SGK1- und B^oAT-cRNA in Oozyten erhöhte den Leucin induzierten Strom auf 163,95±9,31 % (n=78). Wurden B^oAT und ^{S356D}SGK2 bzw. ^{S419D}SGK3 koexprimiert, stieg der Leucin induzierte Strom auf 139,11±12,09 % (n=38) bzw. auf 157,65±13,92 % (n=49). Um eine endogene Expression von B^oAT in *Xenopus laevis* Oozyten ausschließen zu können wurden einige Oozyten lediglich mit DEPC-Wasser bzw. mit der cRNA der jeweiligen SGK-Isoformen injiziert. In diesem Kollektiv zeigte sich auf die Gabe von Leucin keine signifikante Änderung der Membranleitfähigkeit. Für die Oozyten mit injiziertem DEPC-Wasser lag der Strom bei 1,55±0,64 nA (n=11). Die Injektion von ^{S422D}SGK1- bzw. ^{S419D}SGK3-cRNA führte zu einer Leucin abhängigen Strominduktion von 2,18±0,82 nA (n=11) bzw. 1,81±0,81 nA (n=11).

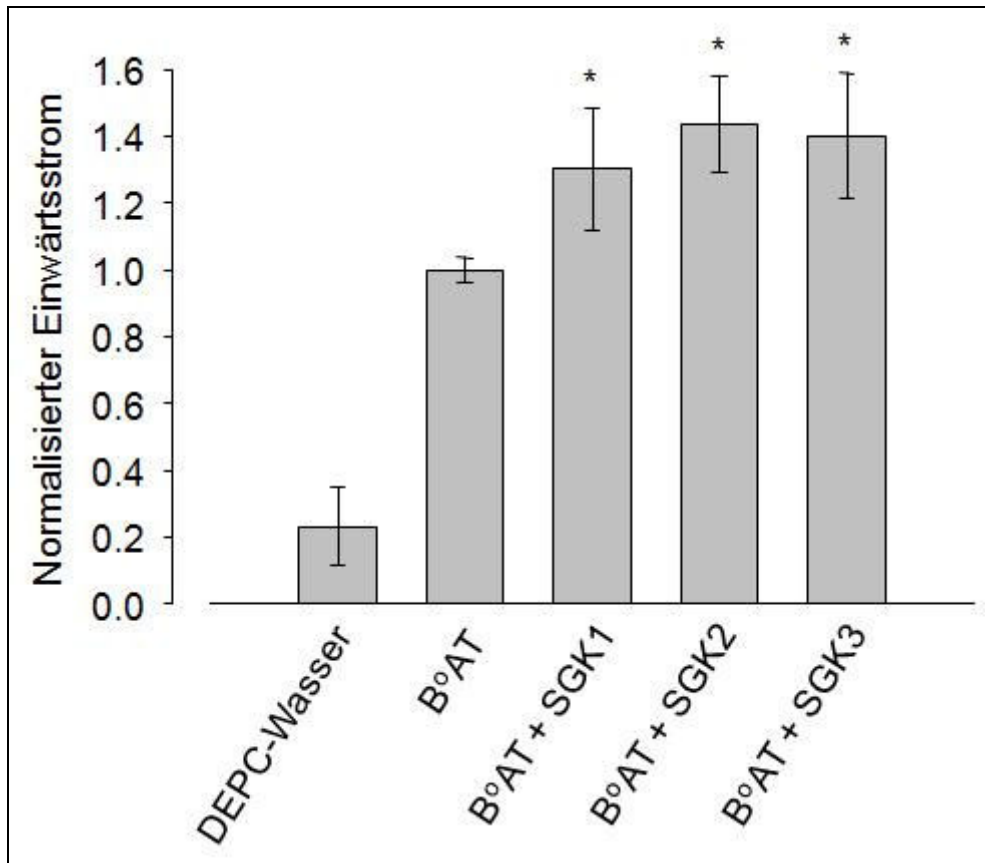


Abbildung 41: Die Wildtyp Isoformen der SGK stimulieren B⁰AT (SLC6A19): Koinjektion von B⁰AT-cRNA und Wildtyp-SGK1-, Wildtyp-SGK2- bzw. Wildtyp-SGK3-cRNA führte zur Stimulation des Transporters. Oozyten, die lediglich mit DEPC-Wasser injiziert worden waren, zeigten keinen signifikanten Strom. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet, die durch Perfusion mit 2 mM Leucin entstanden. Die einzelnen Gruppen eines Batches an Oozyten wurden dabei auf den Mittelwert der Referenzgruppe (alleinige Expression von B⁰AT) normalisiert. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zur Referenzgruppe.

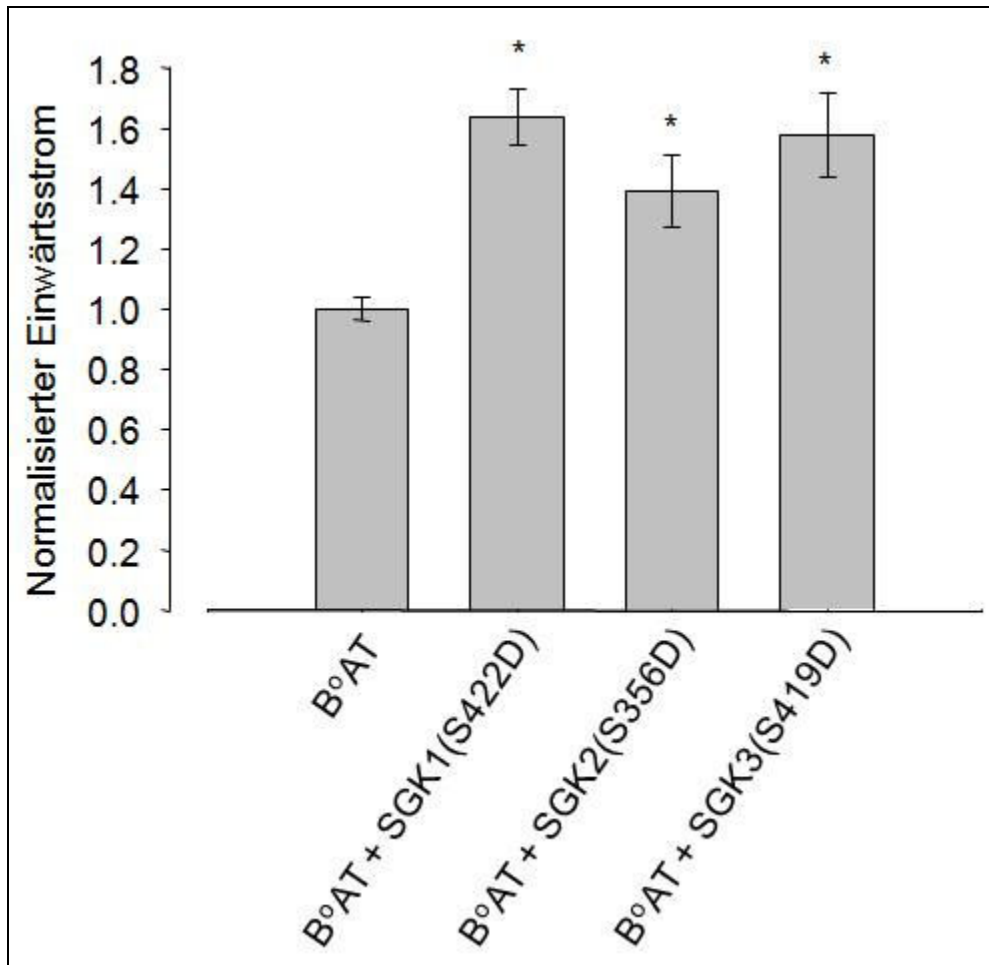


Abbildung 42: Die konstitutiv aktiven Isoformen der SGK stimulieren B⁰AT (SLC6A19): Die Koinjektion von B⁰AT- und ^{S422D}SGK1-, ^{S356D}SGK2- bzw. ^{S419D}SGK3-cRNA führte zur Stimulation des Transporters. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet, die durch Perfusion mit 2 mM Leucin entstanden. Die einzelnen Gruppen eines Batches an Oozyten wurden dabei auf den Mittelwert der Referenzgruppe (alleinige Expression von B⁰AT) normalisiert. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied (P<0,05) zur Referenzgruppe.

3.3.2 Der stimulative Effekt von SGK1 auf B⁰AT wird durch Mutation der Phosphorylierungsstelle von B⁰AT aufgehoben

Der Aminosäure-Transporter B⁰AT (SLC6A19) weist in seiner Primärsequenz eine potentielle Phosphorylierungsstelle für die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase SGK1 auf. Genauer betrachtet handelt es sich hierbei um die Aminosäure Serin (Ser) an Position 100 innerhalb des B⁰AT-Proteins. Um nachzuweisen, dass die SGK1 über Phosphorylierung des Serins die B⁰AT-Transportaktivität verändert, generierte man eine Mutante des B⁰AT. Das ¹⁰⁰Ser wurde hierfür durch Alanin (Ala) ersetzt, was den Verlust der

Phosphorylierungsstelle zur Folge hatte. Die so generierte Mutante $S^{100A}B^{\circ}AT$ wurde in Oozyten zur Expression gebracht, wobei für die Versuche 25 ng/Oozyte an cRNA in die Oozyten injiziert wurde. Die $S^{422D}SGK1$ injizierte man mit einer Konzentration von 7,5 ng/Oozyte an cRNA. Oozyten in denen $S^{100A}B^{\circ}AT$ mit DEPC-Wasser exprimiert wurden, zeigten gegenüber der Referenzgruppe, bestehend aus Oozyten die Wildtyp- $B^{\circ}AT$ und DEPC-Wasser exprimierten, einen auf $51,95 \pm 9,75$ % (n=15) verringerten Leucin induzierten Strom. Eine Koexpression von $S^{100A}B^{\circ}AT$ und $S^{422D}SGK1$ reduzierte den Strom auf $39,31 \pm 4,59$ % (n=11). Eine Stimulation des $S^{100A}B^{\circ}AT$ durch $S^{422D}SGK1$ war damit ausgeschlossen. Die reduzierten Ströme des $S^{100A}B^{\circ}AT$ gegenüber dem Wildtyp konnten abschließend nicht erklärt werden. Sowohl der Wildtyp- $B^{\circ}AT$ als auch der $S^{100A}B^{\circ}AT$ wurden mit der Konzentration von je 25 ng/Oozyte injiziert. Die Expression der $S^{422D}SGK1$ in diesem Versuch wurde mit Hilfe von Western Blot Experimenten aus dem Lysat der elektrophysiologisch gemessenen Oozyten bestätigt.

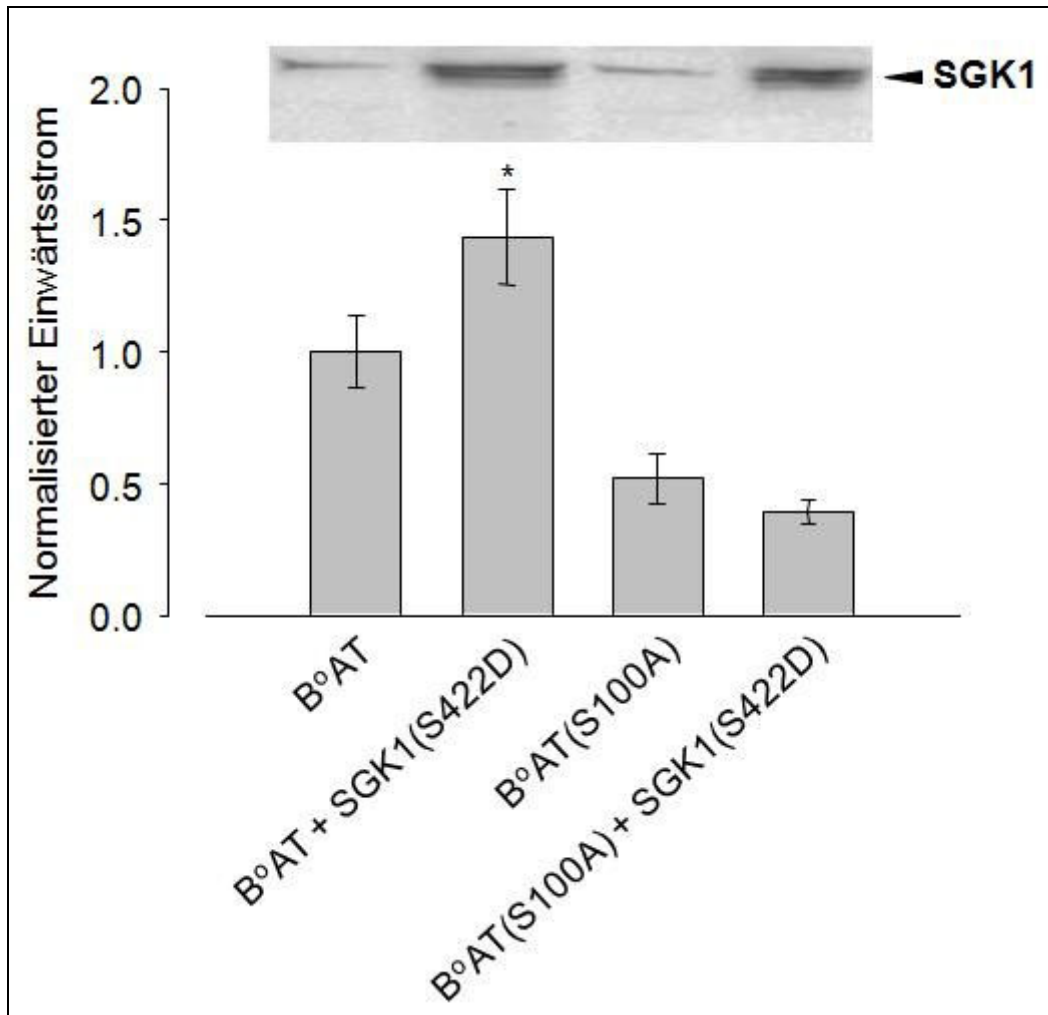


Abbildung 43: Die SGK1 interagiert mit B^oAT über Phosphorylierung des ¹⁰⁰Ser: Für die Stimulation von B^oAT durch die SGK1 ist eine intakte Phosphorylierungsstelle notwendig. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet, die durch Perfusion mit 2 mM Leucin entstanden. Die einzelnen Gruppen eines Batches an Oozyten wurden dabei auf den Mittelwert der Referenzgruppe (alleinige Expression von Wildtyp B^oAT) normalisiert. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied (P<0,05) zur Referenzgruppe. Die Gruppen von ^{S100A}B^oAT und ^{S100A}B^oAT + ^{S422D}SGK1 zeigten keinen signifikanten Unterschied des normalisierten Stroms.

3.3.3 Durch die Mutation des B^oAT verändern sich die kinetischen Eigenschaften des Transporters nicht

Der im vorangegangenen Experiment gemessene reduzierte Strom bei ^{S100A}B^oAT gegenüber dem Wildtyp-B^oAT könnte auf einer durch die Mutation bedingten Veränderung der Transportkinetik beruhen. Um dies auszuschließen wurden Kinetikmessungen durchgeführt. Man setzte die Oozyten verschiedenen Konzentrationen an Leucin aus und zeichnete die Änderung des Stromes elektrophysiologisch auf. Es wurden Leucin Lösungen der

Konzentrationen 0,1 mM, 0,3 mM, 1,0 mM, 3,0 mM und 10 mM auf Basis der normalen ND96-Lösung hergestellt. Eine Oozyte wurde hierbei während einer Voltage-Clamp Messung nacheinander mit den ansteigenden Konzentrationen an Leucin perfundiert und der jeweils abgeleitete Strom aufgezeichnet. Zwischen den einzelnen Leucin Lösungen wurde mit ND96-Lösung zwischengeschpült um die Oozyten wieder auf das Ausgangsniveau zurückzusetzen.

Zur Durchführung der Experimente wurden zwei verschiedene Oozytengruppen mit cRNA injiziert; Wildtyp-B^oAT und S^{100A}B^oAT. In Bezug auf die halb-maximale Substratkonzentration (K_m) war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu detektieren. K_m lag für die Gruppe mit Wildtyp-B^oAT bei $1,11 \pm 0,31$ mM (n=13) und für die Gruppe mit S^{100A}B^oAT bei $1,12 \pm 0,08$ mM (n=8).

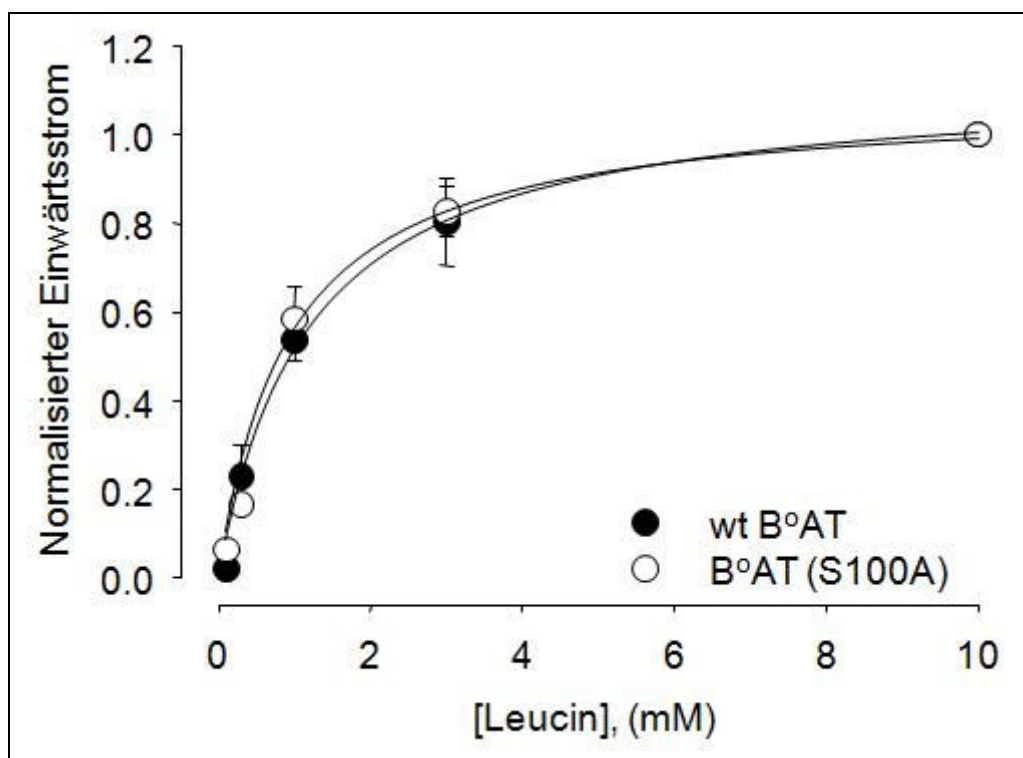


Abbildung 44: Der Wildtyp-B^oAT und der S^{100A}B^oAT verfügen über die gleiche Transportkinetik: Durch die Mutation des ¹⁰⁰Ser durch Ala veränderten sich die kinetischen Eigenschaften des B^oAT nicht. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler abgebildet. Jede Gruppe wurde auf den Mittelwert der 10mM Leucin-Gabe normalisiert. Die 10mM Leucin-Gabe wurde durch die Normalisierung auf 1,0 (auf der Ordinate) gesetzt.

3.3.4 Die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 spielt in der Regulation von B^oAT keine Rolle

In verschiedenen vorangegangenen Publikationen konnte gezeigt werden, dass die SGK1 Membrantransporter über Phosphorylierung der Nedd4-2 regulieren kann. Die physiologische Funktion der Nedd4-2 besteht darin Membranproteine zu ubiquitieren, was einen Abbau des Proteins im Proteasom zur Folge hat. Um klären zu können, ob B^oAT durch die Nedd4-2 reguliert wird, koexprimierte man B^oAT mit DEPC-Wasser, B^oAT mit ^{S422D}SGK1 und B^oAT mit Nedd4-2. Es wurden 25 ng/Oozyte an B^oAT-cRNA, 7,5 ng/Oozyte an ^{S422D}SGK1-cRNA und 15 ng/Oozyte an Nedd4-2-cRNA injiziert. Auch in diesem Versuch entfaltete die ^{S422D}SGK1 wie gewohnt ihre stimulative Wirkung. Einen signifikanten regulatorischen Effekt der Nedd4-2 konnte allerdings nicht detektiert werden. Oozyten, die mit der cRNA von B^oAT und Nedd4-2 koinjiziert worden waren, zeigten gegenüber der Gruppe mit Expression von B^oAT mit DEPC-Wasser einen Leucin induzierten Strom von 84,0±19,73 % (n=15).

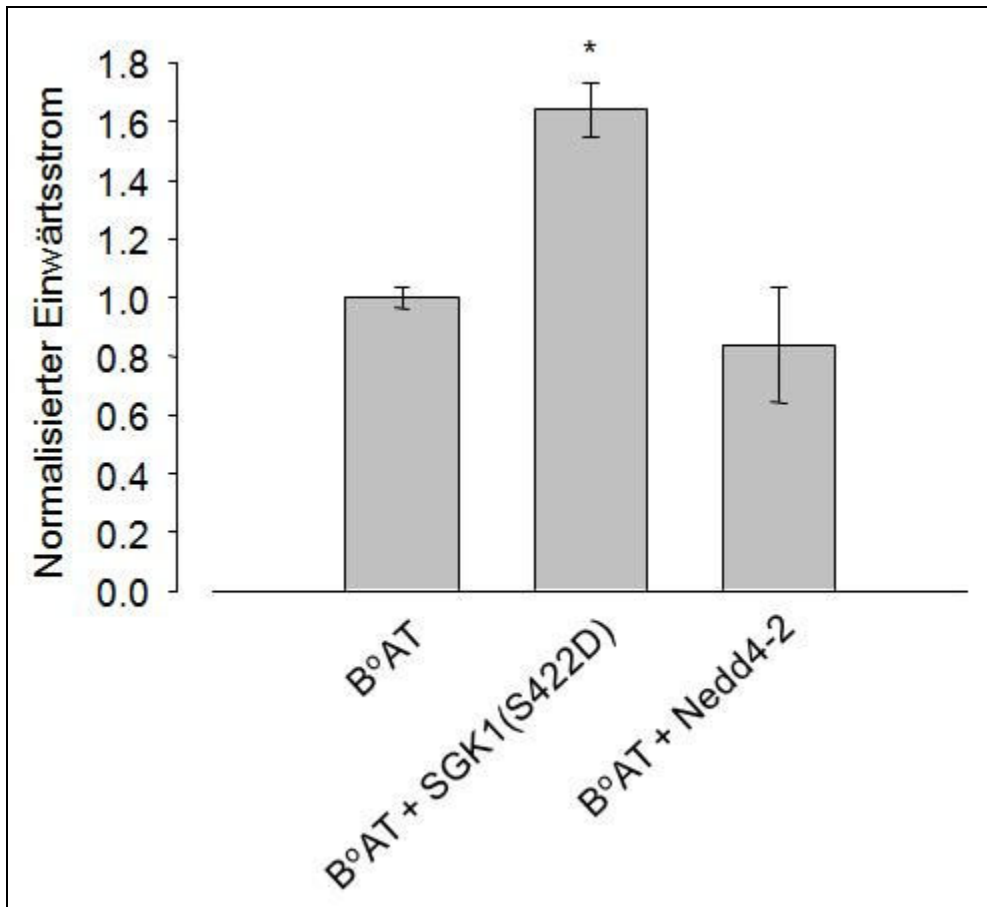


Abbildung 45: Die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 reguliert BoAT (SLC6A19) nicht: Die Koinjektion von B^oAT- und ^{S422D}SGK1-cRNA führte zur Stimulation des Transporters. Oozyten, in denen B^oAT und Nedd4-2 koexprimiert wurden, zeigten keine signifikante Änderung des Stroms. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet, die durch Perfusion mit 2 mM Leucin entstanden. Die einzelnen Gruppen eines Batches an Oozyten wurden dabei auf den Mittelwert der Referenzgruppe (alleinige Expression von B^oAT) normalisiert. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied (P<0,05) zur Referenzgruppe.

3.3.5 Die SGK erhöht die maximale Transportrate von B^oAT (SLC6A19) ohne Änderung der Substrat-Affinität

Die SGK-Isoformen sind in der Lage die Substrat-Affinität und die maximale Transportrate von Membrantransportern bzw. -kanälen zu verändern. Um klären zu können wie die SGK-Isoformen B^oAT stimulieren, wurden Voltage-Clamp Messungen mit verschiedenen Konzentrationen an Leucin vorgenommen. Es wurden Leucin Lösungen der Konzentrationen 0,1 mM, 0,3 mM, 1,0 mM, 3,0 mM und 10 mM auf Basis der normalen ND96-Lösung hergestellt. Eine Oozyte wurde hierbei während einer Voltage-Clamp Messung nacheinander mit den ansteigenden Konzentrationen an Leucin perfundiert und

der jeweils abgeleitete Strom aufgezeichnet. Zwischen den einzelnen Leucin Lösungen wurde mit ND96-Lösung zwischengeschpült um die Oozyten wieder auf das Ausgangsniveau zurückzusetzen.

Zur Durchführung der Experimente wurden drei verschiedene Oozytengruppen mit cRNA injiziert; B^oAT, B^oAT mit ^{S422D}SGK1 und B^oAT mit ^{S419D}SGK3. In Bezug auf die halb-maximale Substratkonzentration (K_m) war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit SGK und der Kontrollgruppe zu detektieren. K_m lag für die Gruppe mit ^{S422D}SGK1 bei $1,18 \pm 0,23$ mM ($n=12$), mit ^{S419D}SGK3 bei $1,17 \pm 0,21$ mM ($n=12$) und für die Kontrollgruppe bei $1,11 \pm 0,31$ mM ($n=13$). Zuletzt wurden mit Hilfe der Hill-Gleichung die V_{max} -Werte berechnet. V_{max} spiegelte hierbei den maximalen Strom an, der durch Gabe von Leucin erzeugt werden konnte. Hierbei lag V_{max} für die Gruppe mit ^{S422D}SGK1 bei $190 \pm 15,28$ %, mit ^{S419D}SGK3 bei $185 \pm 8,98$ % und für die Kontrollgruppe bei $100 \pm 30,63$ %. Damit war V_{max} bei Koinjektion von ^{S422D}SGK1 bzw. ^{S419D}SGK3 mit B^oAT signifikant höher als V_{max} der Kontrollgruppe.

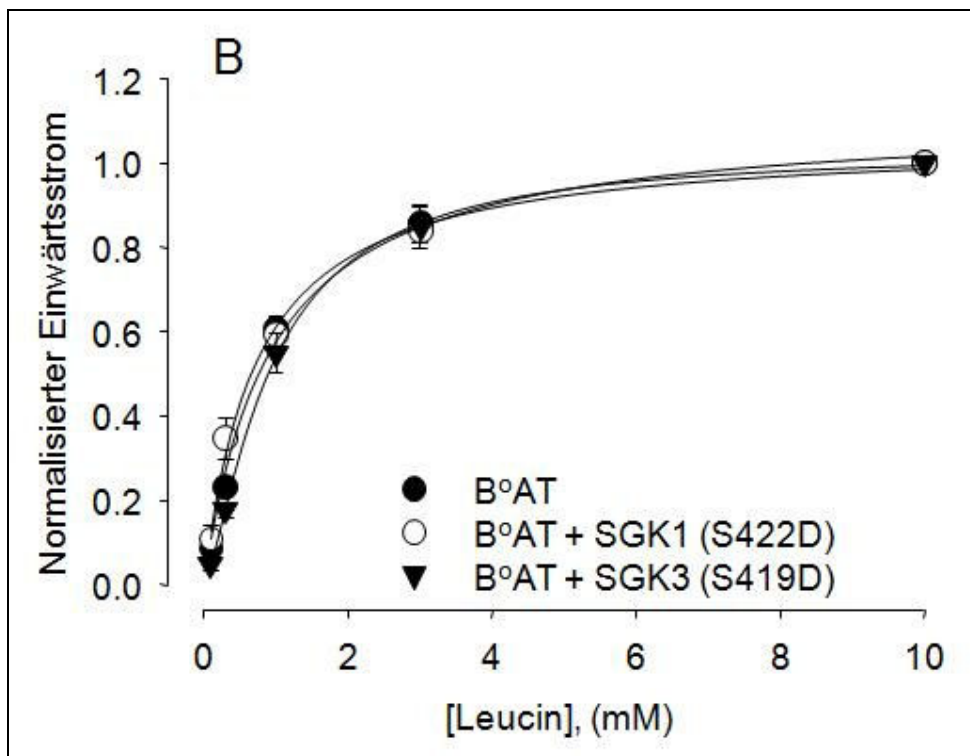
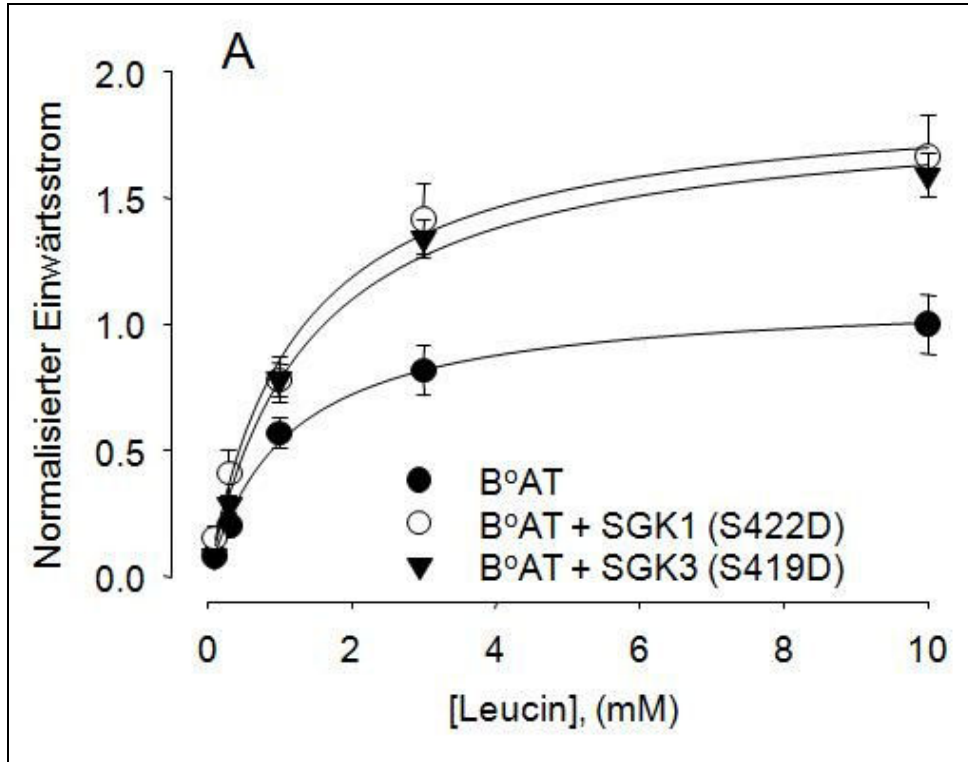


Abbildung 46: Kinetikmessungen der Leucin induzierten Ströme bei B°AT: Während eine Koexpression von ^{S422D}SGK1 bzw. ^{S419D}SGK3 mit B°AT zu einer Zunahme von V_{max} führte (siehe A und Tabelle), bleibt K_m unverändert (siehe B und Tabelle). Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet. Die Daten wurden bei (A) auf den Maximalwert der Kontrollgruppe (Oozyten, die nur mit B°AT-cRNA injiziert wurden) normalisiert und bei (B) auf den Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

cRNA	K _m (mM)	V _{max} (%)	P(V _{max})	n
B ⁰ AT	1,11±0,31	100±30,63		13
B ⁰ AT S ^{422D} SGK1	+ 1,18±0,23	190±15,28	<0,05	12
B ⁰ AT S ^{419D} SGK3	+ 1,17±0,21	185±8,98	<0,05	12

Tabelle 11: Kinetikmessungen der Leucin induzierten Ströme bei SLC6A19: Es fanden sich innerhalb der Gruppen keine Änderung der halbmaximalen Substratkonzentration. V_{max} wurde hingegen durch S^{422D}SGK1 und S^{419D}SGK3 signifikant erhöht.

3.3.6 Die SGK erhöht die Transporterdichte von B⁰AT in der Oozytenmembran

Die nachgewiesene Erhöhung von V_{max} durch die konstitutiv aktiven Isoformen 1 und 3 der SGK beruht wahrscheinlich auf einer erhöhten Transporterdichte in der Oozytenmembran. Zum Nachweis der Richtigkeit dieser Arbeitshypothese wurden Biotinylierungs-Versuche mit anschließenden Western Blots durchgeführt. Die für diese Versuche benötigten Oozyten wurden mit 25 ng cRNA von B⁰AT und 7,5 ng an cRNA von S^{422D}SGK1 bzw. S^{419D}SGK3 injiziert. Nach 4 Tagen Inkubationszeit wurde der in der Membranfraktion gelegene B⁰AT, wie unter Material und Methoden beschrieben, nachgewiesen. Die Membranfraktion der Oozyten, die B⁰AT und S^{422D}SGK1 exprimierten, erzeugte im Western Blot eine Bandenintensität von 129,61±9,09 % (n=8). Eine Koexpression von B⁰AT und S^{419D}SGK3 erbrachte eine Erhöhung auf 133,69±7,30 % (n=8). Die Bandenintensität der Gruppe mit alleiniger Expression von B⁰AT wurde auf 100 % gesetzt. Mit der abschließenden Signifikanzprüfung konnte gezeigt werden, dass sowohl die S^{422D}SGK1 als auch S^{419D}SGK3 die Transporterdichte in der Oozytenmembran signifikant erhöhten.

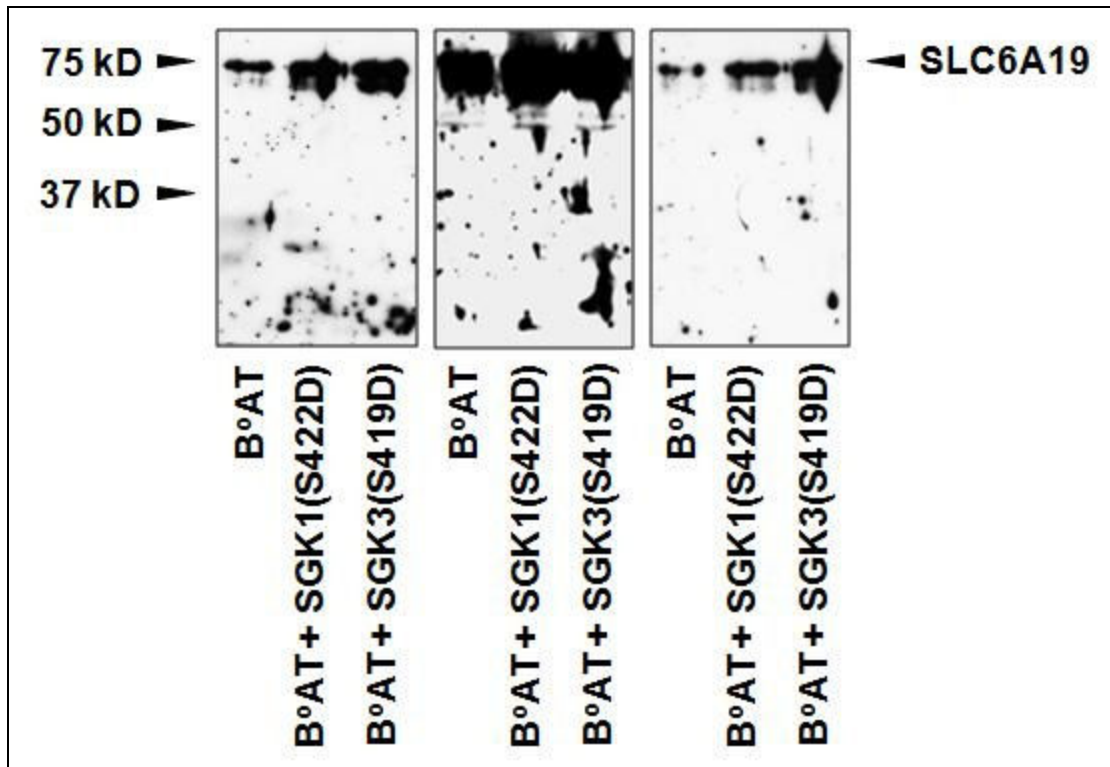


Abbildung 47: Die ^{S422D}SGK1 und ^{S419D}SGK3 erhöhen die Transporterdichte von B^oAT (SLC6A19): Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler der Chemilumineszenz-Banden abgebildet.

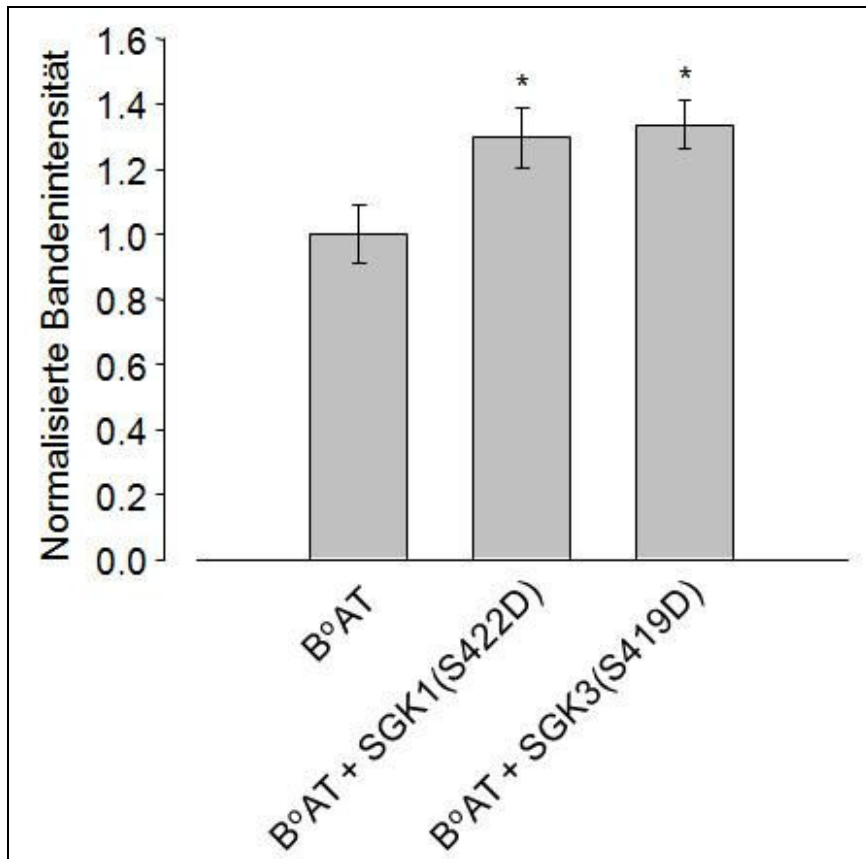


Abbildung 48: ^{S422D}SGK1 und ^{S419D}SGK3 erhöhen die Transporterdichte von B^oAT (SLC6A19): Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler der Chemilumineszenz-Banden abgebildet. Die einzelnen Gruppen eines Batches an Oozyten wurden dabei auf den Mittelwert der Referenzgruppe (alleinige Expression von B^oAT) normalisiert. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied (P<0,05) zur Referenzgruppe.

3.3.7 Die SGK stabilisiert den BoAT in der Oozytenmembran

Da sich auch bei B^oAT eine Zunahme der Transporter-Dichte durch die konstitutiv aktiven SGK-Isoformen nachweisen ließ, wurden hier analog zu SMIT1 Oozyten mit Brefeldin A (BFA) in der Konzentration von 5 µM inkubiert. Für die BFA-Versuche injizierte man 7,5 ng/Oozyte an ^{S422D}SGK1-cRNA und 25 ng B^oAT-cRNA. Nach 12 bzw. 24 Stunden Inkubationszeit mit BFA führte man Voltage-Clamp Messungen durch. Eine Inkubation der Oozyten mit BFA führte zu verringerten Leucin induzierten Strömen. Es konnte gezeigt werden, dass die Verringerung des Stroms in Abhängigkeit zur Zeit bei Oozyten, die nur B^oAT exprimierten signifikant größer war als bei Oozyten, die B^oAT und SGK1 exprimierten. Die SGK1 war somit in der Lage den B^oAT in der Zellmembran zu stabilisieren.

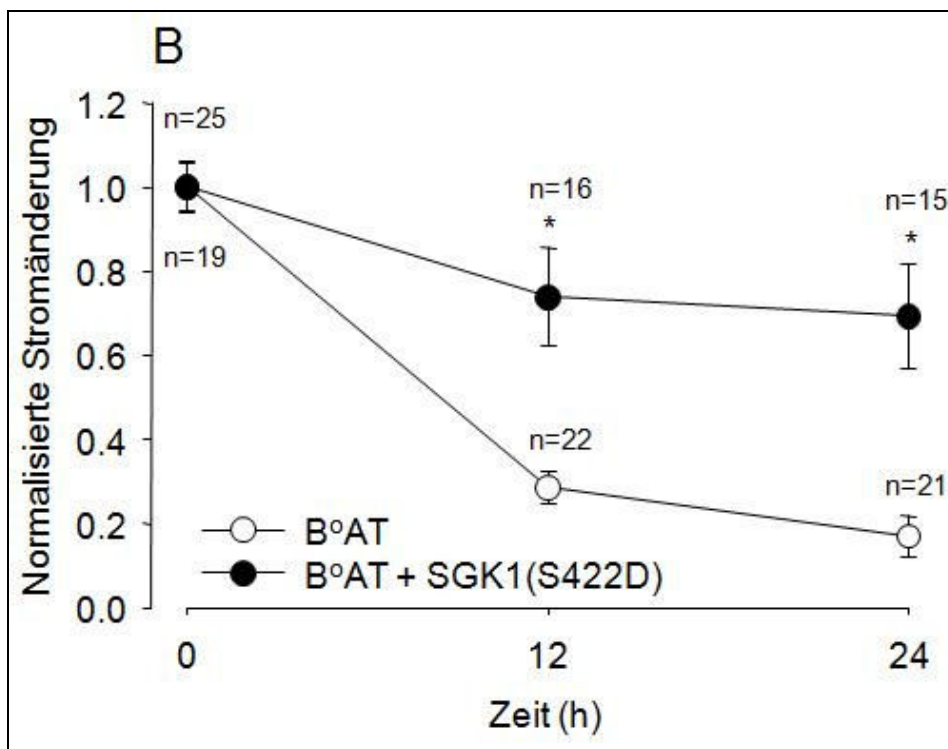
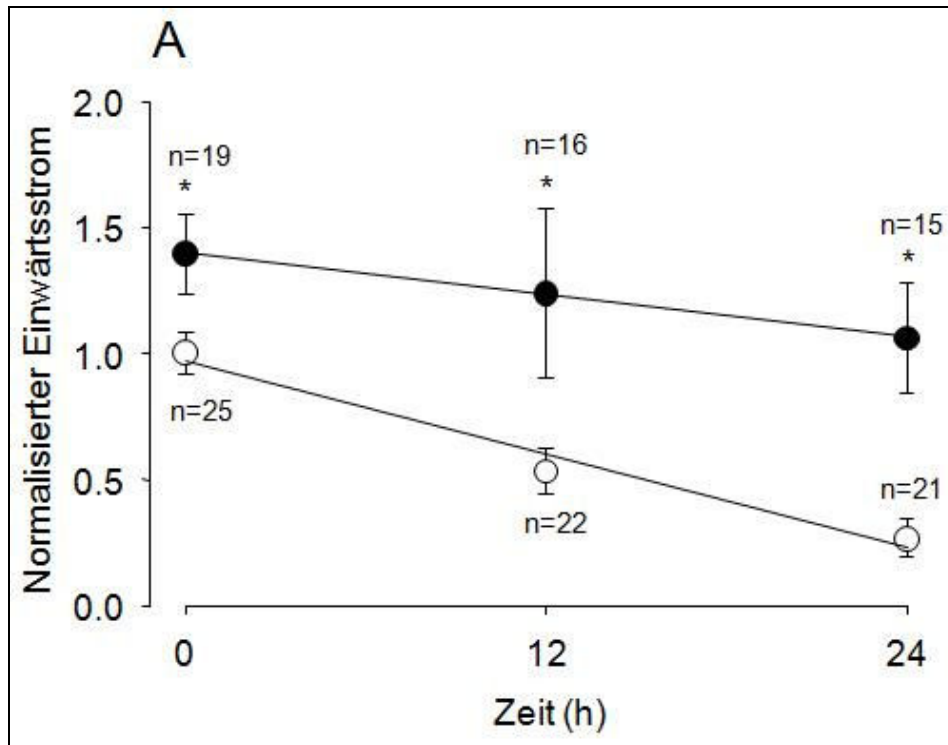


Abbildung 49: Koexpression von ^{S422D}SGK1 stabilisiert B⁰AT (SLC6A19) in der Oozytenmembran: Die Abbildung zeigt normalisierte Leucin induzierte Ströme nach Inkubation mit 5 μ M Brefeldin A nach 12 und 24 Stunden. Es sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standard-Fehler abgebildet, die durch Perfusion mit 2mM Leucin entstanden. Unter A wurde auf die Gruppe mit alleiniger Expression von B⁰AT beim Zeitpunkt t = 0 h normalisiert. In der Abbildung B normalisierte man die Gruppen an Oozyten beim Zeitpunkt t = 0 h auf sich selbst. * kennzeichnet den signifikanten Unterschied (P < 0,05) zwischen der Gruppe mit Koexpression von SGK1 gegenüber der alleinigen Expression von PepT2.

4 Diskussion und Interpretation

Ziel dieser Arbeit war es posttranslatorische Regulationsmechanismen der Membrantransporter SMIT1 (SLC5A3), PepT1 (SLC15A1), PepT2 (SLC15A2) und B⁰AT (SLC6A19) durch die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase (SGK) zu untersuchen.

4.1 Regulation des Myo-Inositol-Transporter SMIT1 (SLC5A3)

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte ein neuer posttranslatorischer Regulationsmechanismus des Myo-Inositol-Transporters SMIT1 aufgedeckt werden. SMIT1 wird durch die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1 (SGK1), durch ihre Isoformen 2 und 3 sowie durch die Proteinkinase B (PKB) stimuliert. Diese Beobachtung deckt sich mit der Tatsache, dass sowohl die SGK als auch der SMIT1 bei der Volumenregulation von Zellen eine entscheidende Rolle spielen (170), (168), (104). In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die SGK durch isotone bzw. hypertone Zellschrumpfung in ihrer Expression stimuliert wird (169). SMIT1 wird ebenfalls unter hypertonen Zellbedingungen in seiner Expression erhöht und schützt die Zelle durch gesteigerte Aufnahme des Osmolyts Myo-Inositol in den Intrazellularraum vor einer zu starken Schrumpfung (186), (115).

Die Stimulation des SMIT1 durch die SGK-Isoformen ist strikt an die Aktivität der Kinasen gebunden. Eine Inaktivierung des katalytischen Zentrums der SGK-Isoformen hebt den stimulativen Effekt auf SMIT1 auf. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass SMIT1 entweder direkt durch die SGK phosphoryliert und aktiviert wird oder dass die SGK über Phosphorylierung eines weiteren Proteins SMIT1 stimuliert.

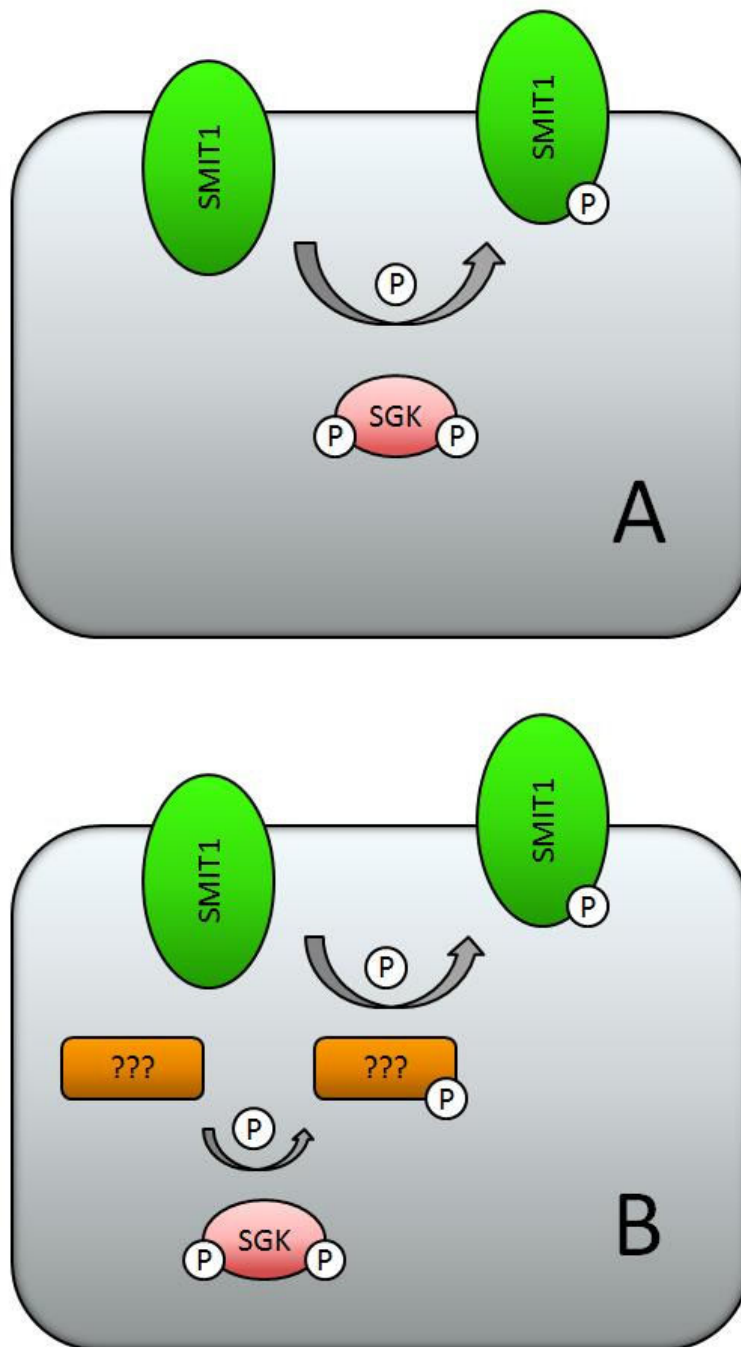


Abbildung 50: Abbildung A zeigt eine potentiell mögliche direkte Phosphorylierung des SMIT1 durch die SGK1. In Abbildung B ist ein noch unbekanntes Interaktionsprotein abgebildet. Eine Phosphorylierung dieses Interaktionsproteins führt zu dessen Aktivierung und der damit verbundenen Phosphorylierung des SMIT1.

Betrachtet man die Primärsequenz des SMIT1-Proteins so fällt auf, dass der SMIT1 anders als der B⁰AT oder PepT2 über keine SGK-Phosphorylierungsstelle („SGK-Consensus-Site“) verfügt. Über die „SGK-Consensus-Site“ ist eine direkte Phosphorylierung des Transporters durch die

SGK potentiell möglich. In Bezug auf den Myo-Inositol-Transporter SMIT1 bedeutet dies, dass die SGK entweder über zwischengeschaltete Proteine oder durch Phosphorylierung des SMIT an anderer Stelle als an der „SGK-Consensus-Site“ ihre Wirkung auf den SMIT1 entfalten muss. Ein potentielles Zwischenprotein ist die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2. Die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 ist in der Lage verschiedene Membrantransporter und –kanäle zu regulieren (48), (20), (134). Die Regulation durch die Nedd4-2 beruht auf einer Ubiquitierung des Membranproteins und damit verbundenen Abbau im Proteasom. Die Membranproteindichte wird durch die Ubiquitierung folglich verringert.

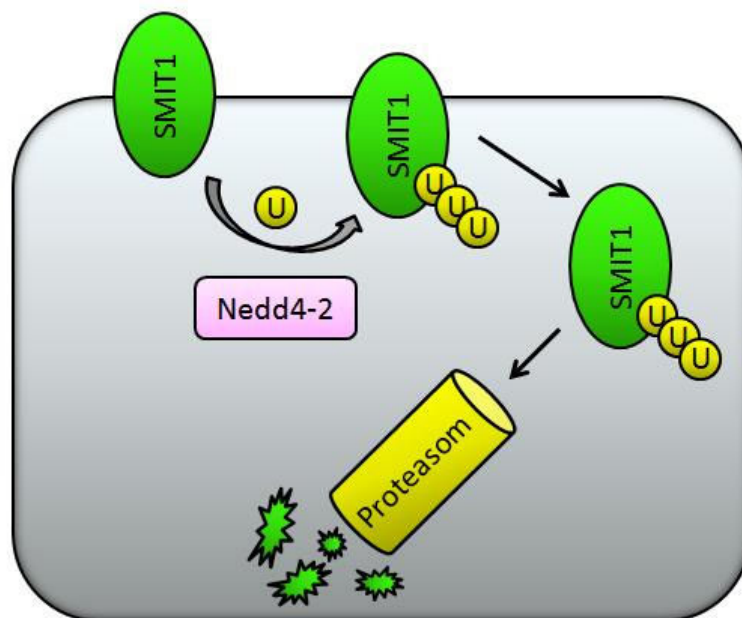


Abbildung 51: Die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 ubiquitiniert den SMIT1, was zum Abbau des Transporters im Proteasom führt.

Die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1 ist in der Lage die Nedd4-2 zu phosphorylieren, was zu einer Inaktivierung der Nedd4-2 führt (48). Die Folge ist eine erhöhte Membranproteindichte.

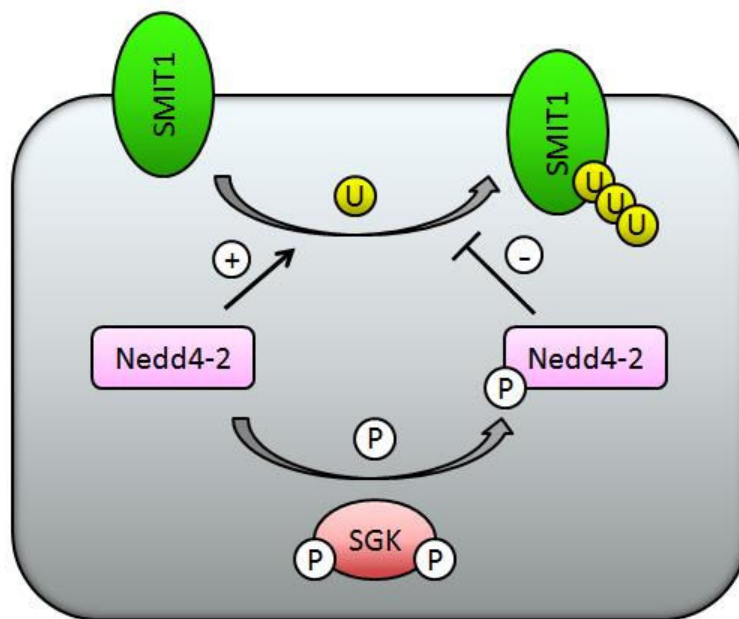


Abbildung 52: Die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase phosphoryliert die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2. Damit wird die Nedd4-2 in ihrer Aktivität reduziert.

Da die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 in *Xenopus laevis* Oozyten endogen vorhanden ist, könnte der stimulative Effekt durch die Injektion von exogener SGK1-cRNA auf SMIT1 über eine Inaktivierung der endogenen Nedd4-2 zurückzuführen sein. Beim epithelialen Natrium Kanal ENaC (48) sowie bei diversen exzitatorischen Aminosäure-Transportern (24), (21), (20), (17), (141), (134) und dem natriumabhängigen Glukose-Transporter SGLT1 (51) konnte dieser Mechanismus bereits nachgewiesen werden. Eine Injektion von Nedd4-2-cRNA in Oozyten von *Xenopus laevis* führt zu einem verringerten Myo-Inositol induzierten Strom. Die Koexpression von Nedd4-2 und SGK1 cRNA hebt den inhibitorischen Nedd4-2 Effekt auf. Diese Beobachtung stützt die These, dass die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 eine entscheidende Rolle in der posttranslatorischen Regulation von SMIT1 spielt.

Die Frage, ob die SGK1 ausschließlich über Nedd4-2 auf SMIT1 wirkt, wurde durch Koexpression von SGK1 und der inaktiven ^{C692S}Nedd4-2 beantwortet. Oozyten, die exogene SGK1 und ^{C692S}Nedd4-2 exprimierten zeigten einen signifikant höheren Myo-Inositol induzierten Strom als Oozyten, die SGK1 und Wild-Typ Nedd4-2 exprimierten. Dies lässt schlussfolgern, dass die SGK1 nicht ausschließlich über die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 wirkt. Es muss weitere

Regulationsmechanismen geben! Denkbar wäre hierbei die Phosphorylierung weiterer Interaktionsproteine durch die SGK1, die dann wiederum stimulatv auf SMIT1 wirken könnten.

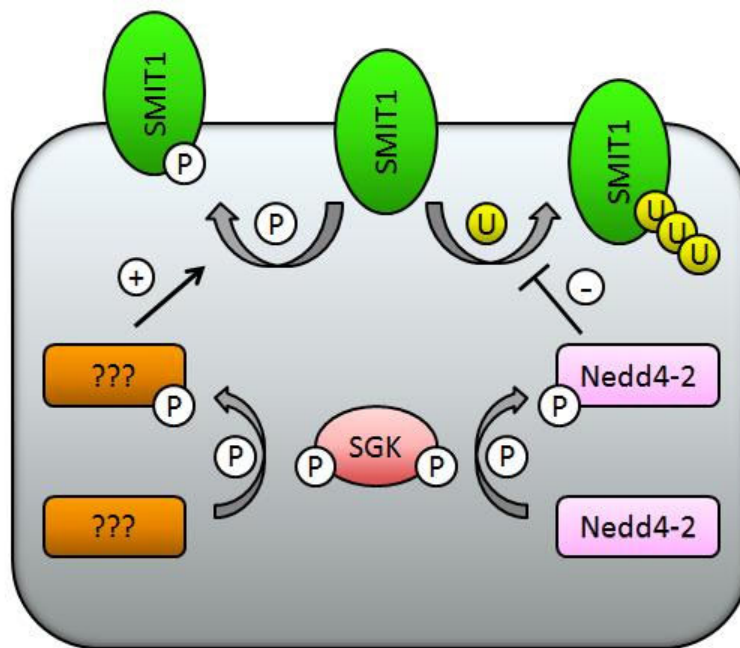


Abbildung 53: Der stimulative Effekt der SGK auf SMIT1 lässt sich nicht ausschließlich auf eine Hemmung der Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 zurück führen. Es müssen weitere Interaktionsschritte diskutiert werden.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die SGK1 den SMIT1 stimuliert, wobei der stimulative Effekt der Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1 auf einer Stabilisierung des Myo-Inositol Transporter in der Plasmamembran beruht. Dadurch wird die Transporter-Dichte erhöht. Die kinetischen Eigenschaften des SMIT1 werden durch die SGK1 nicht beeinflusst. Die SGK1 stimuliert SMIT1 zumindest teilweise durch Phosphorylierung und damit verbundene Inaktivierung der Ubiquitin-Ligase Nedd4-2. Mit dieser Studie konnten erstmals Aussagen über die posttranslatorischen Regulationsmechanismen der Serum- und Glukokortikoid induzierbaren Kinase in Bezug auf den Myo-Inositol Transporter SMIT1 getroffen werden. Dies könnte in Zukunft beim Verständnis der Zellvolumenregulation bei hyperosmolarem Stress von Bedeutung sein.

4.2 Regulation des Oligo-Peptid-Transporter PepT2 (SLC15A2)

Im Falle von PepT1 konnten zwei und im Falle von PepT2 eine potentielle Phosphorylierungsstelle der Serum- und Glukokortikoid induzierbaren Kinase 1 nachgewiesen werden. Beide PepT-Isoformen weisen des Weiteren am C-Terminus ein PDZ-Bindungsmotiv auf, welches als Erkennungssequenz für Interaktionsproteine mit PDZ-Domänen fungiert. Ob die Phosphorylierungsstellen bzw. die PDZ-Bindungsmotive eine Rolle in der Regulation der PepT-Isoformen spielen, ist bisher unbekannt. Die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase (SGK) wird im menschlichen Organismus in sämtlichen Geweben exprimiert. In der Niere findet sich die SGK im Aldosteron sensiblen distalen Tubulus und in geringerer Konzentration auch im Glomerulum und im proximalen Tubulus (116). Die Gerüst-Proteine NHERF1 („Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1“) und NHERF2 („Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 2“) werden neben vielen anderen Geweben auch im proximalen Tubulus der Niere exprimiert (151), (178), (164). Die gemeinsame Expression der SGK1, der NHERF-Isoformen und von PepT1 bzw. PepT2 lassen vermuten, dass die Oligo-Peptid-Transporter durch die SGK und die Gerüstproteine NHERF1 bzw. NHERF2 reguliert werden könnten. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass PepT2 ein spezifisches Ziel der SGK1 und des Gerüstproteins NHERF2 darstellt. Während die SGK1 in der Lage war PepT2 zu stimulieren, zeigte sich bei Koinjektion von PepT1 und SGK1 keine gesteigerten Gly-Gly induzierbaren Ströme. Diese Beobachtung könnte damit zusammen hängen, dass Aminosäuren, die in der Primärsequenz der SGK1 nahe an der Phosphorylierungsstelle liegen, eine Phosphorylierung des PepT1 durch die SGK1 verhindern (99), (100).

NHERF1 und NHERF2 weisen je zwei PDZ-Domänen auf. Obwohl beide PDZ-Domänen sowohl bei NHERF1 als auch bei NHERF2 eine sehr große Ähnlichkeit in ihrer Struktur aufweisen, binden sie unterschiedliche Zielproteine (147). Einige Zielproteine binden spezifisch an eine NHERF-Isoform (182), (105, 111), (133), (150). In der vorliegenden Studie wurde PepT2 als spezifisches Ziel von NHERF2 identifiziert. Die vorliegenden Daten belegen,

dass PepT2 an seinem PDZ-Bindungsmotiv am C-Terminus durch die zweite PDZ-Domäne des NHERF2 aktiviert wird.

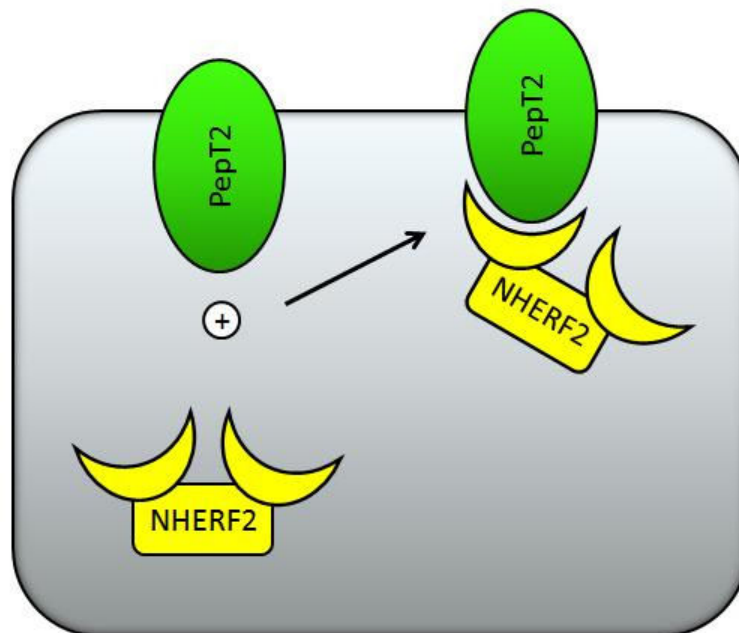


Abbildung 54: Das Gerüstprotein NHERF2 ist in der Lage PepT2 zu stimulieren.

Sowohl PepT1 als auch PepT2 sind Protonen abhängige Oligo-Peptid-Transporter. Potentiell besteht die Möglichkeit, dass SGK1 und NHERF2 den PepT2 durch Veränderung des zytosolischen pH-Wertes in seiner Aktivität verändern. Die Tatsache, dass nur PepT2 spezifisch und nicht beide PepT-Isoformen stimuliert werden, verringert die Wahrscheinlichkeit einer pH abhängigen Regulation des PepT2. Die Mutation der potentiellen Phosphorylierungsstelle der SGK in der Primärsequenz des PepT2 bewirkt den Verlust des stimulativen Effektes. Hierfür wurde das Serin an Position 185 durch die Aminosäure Alanin ersetzt. Damit ist bewiesen, dass die SGK den PepT2 direkt durch Phosphorylierung stimuliert.

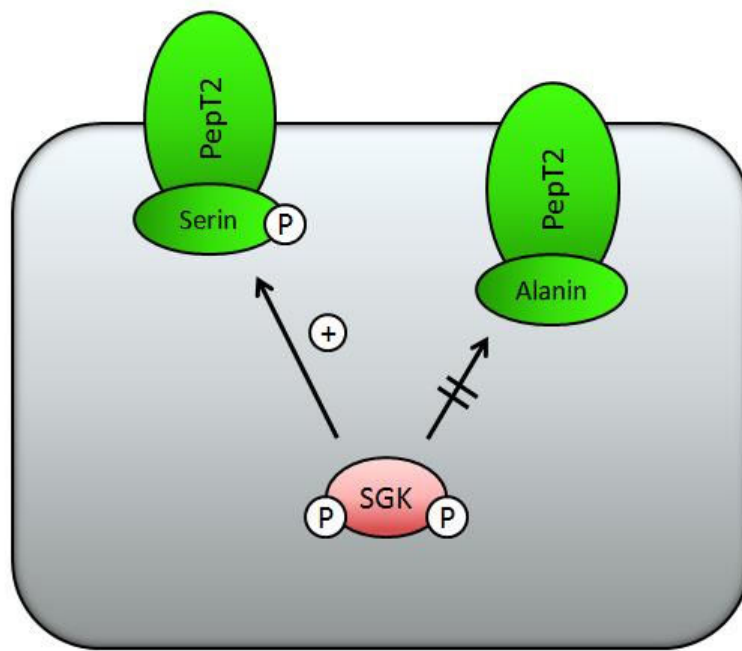


Abbildung 55: Durch Mutation der Aminosäure Serin zu Alanin im Bereich der SGK Phosphorylierungsstelle des PepT2 geht die stimulative Wirkung der SGK verloren.

Der Natrium-Protonen-Austauscher NHE3 verfügt über ein PDZ-Bindungsmotiv. In vivo könnte es zu einer räumlichen Annäherung von PepT2 und NHE3 durch das Gerüstprotein NHERF2 kommen, indem PepT2 an die zweite und NHE3 an die erste PDZ-Domäne des NHERF2 bindet. Damit würde NHE3 den PepT2 mit einem ausreichenden Protonen-Gradienten versorgen und damit den Transport von Di- und Tripeptiden über die Zellmembran sicherstellen. (179). Diese Vermutung stützt die Tatsache, dass in primären Zellkulturen von Astrozyten eine funktionelle Verbindung zwischen PepT2 und NHE1 bzw. NHE2 nachgewiesen werden konnte (163). Diese Vorstellung wird durch die in dieser Arbeit erhobenen Daten untermauert. Werden PepT2 und NHE3 in Oozyten von *Xenopus laevis* koexprimiert, wird der Dipeptid-Transport teilweise natriumabhängig. Dadurch wird deutlich, dass in Zellsystemen, in denen sowohl PepT2 als auch NHE3 exprimiert werden, eine indirekte Stimulation durch NHERF2 auf PepT2 über NHE3 möglich ist.

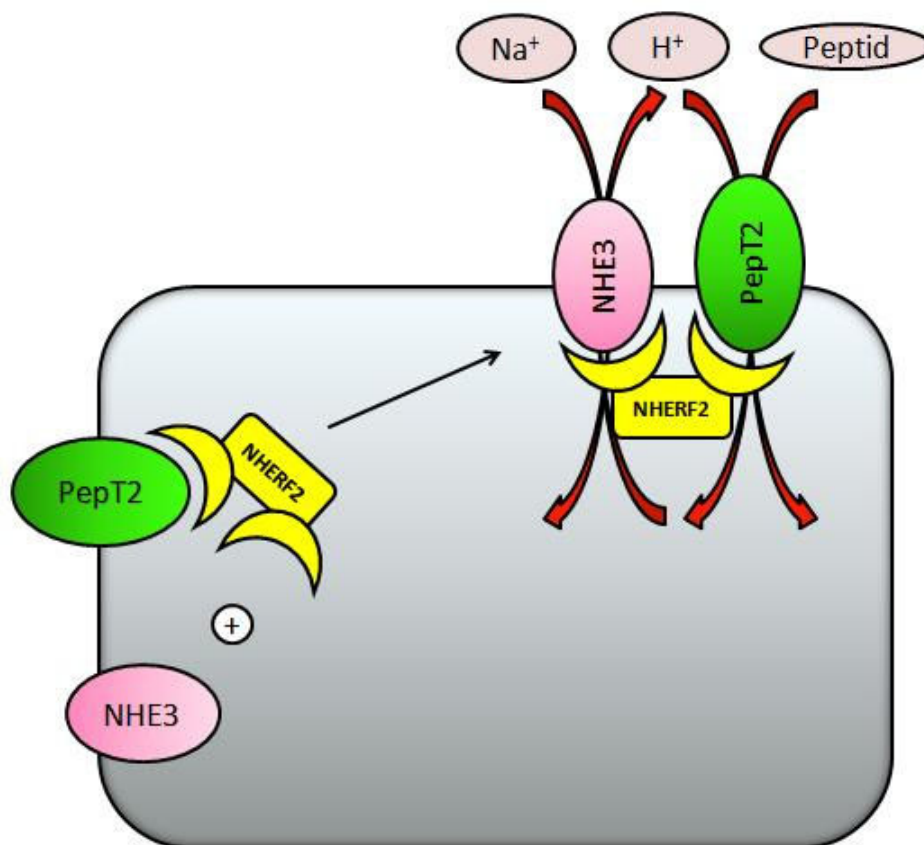


Abbildung 56: Die Koexpression von NHERF2 und NHE3 führt zu einem vergrößerten Gly-Gly induzierten Strom. Es kann angenommen werden, dass NHERF2 den PepT2 und den NHE3 räumlich zueinander lokalisiert. Damit wird über den Natriumgradienten die Dipeptidaufnahme forciert.

NHERF2 wirkt als Gerüst-Protein. Hierbei bringt NHERF2 Proteinkinasen über eine Protein-Protein-Bindung in räumliche Nähe zu Membrantransportern und – Kanälen (178), (177), (176), (129), (182), (183), (155), (154). In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass NHERF2 die SGK1 in räumliche Nähe zum K^+ -Kanal ROMK (Kir 1.1) und dem epithelialen Ca^{2+} -Kanal TRPV5 bringen kann und so für die Stimulation von ROMK bzw. TRPV5 durch die SGK1 verantwortlich ist (129), (183), (181). Die alleinige Expression von ROMK und SGK1 bzw. NHERF2 führt zu unveränderten Strömen. Erst die gemeinsame Koexpression aller drei Proteine führt zur Stimulation des ROMK. Dabei bindet das NHERF2 über eine seiner beiden PDZ-Domänen an das am C-Terminus des ROMK gelegene PDZ-Bindungsmotiv und mit der anderen PDZ-Domäne die SGK. Dadurch lokalisiert NHERF2 den ROMK und die SGK räumlich eng zueinander.

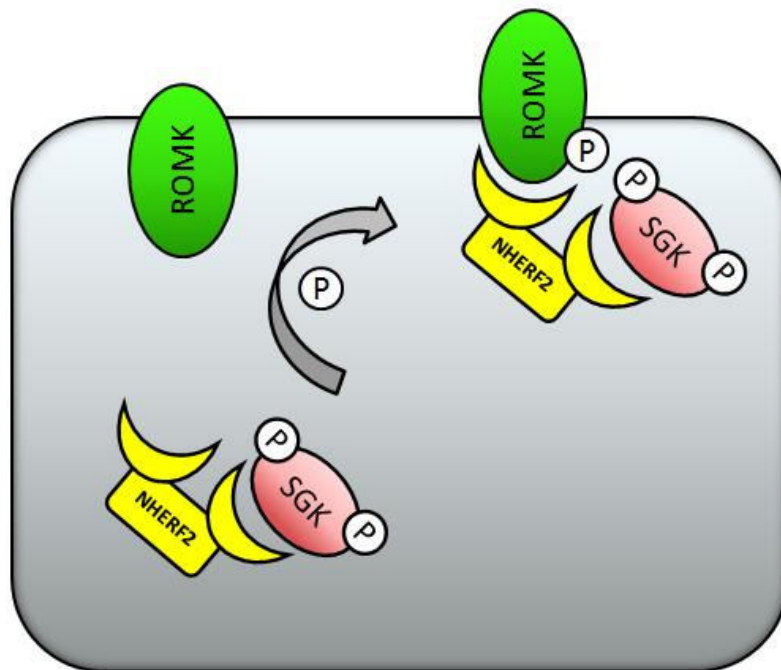


Abbildung 57: Die Gerüst-Funktion des NHERF2 konnte für den K⁺-Kanal ROMK nachgewiesen werden. NHERF2 lokalisiert hierbei die SGK und den ROMK zueinander. Die Phosphorylierung des ROMK durch die SGK wird damit begünstigt.

In Bezug auf PepT2 konnte gezeigt werden, dass die SGK1 und NHERF2 unabhängig voneinander stimulatив auf PepT2 wirken. Hierbei bindet und stimuliert NHERF2 den Oligo-Peptid-Transporter PepT2 über seine zweite PDZ-Domäne. Die Interaktion zwischen NHERF2 und SGK1 erfolgt ebenfalls über die zweite PDZ-Domäne. Diese Tatsache legt nahe, dass NHERF2 und SGK1 unabhängig voneinander PepT2 aktivieren. Ein weiterer Hinweis für den unabhängigen Stimulationsmechanismus liegt darin begründet, dass eine Koexpression von SGK1 und der NHERF2 Δ P2-Mutante (hier ist die zweite PDZ-Domäne funktionell inaktiviert) trotzdem zur Hochregulation von PepT2 führt. Unter der Annahme, dass die SGK1 bzw. NHERF2 unabhängig voneinander agieren, müsste eine Koinjektion von SGK1- und NHERF2-cRNA in Oozyten von *Xenopus laevis* zu einem additiven Effekt gegenüber der alleinigen Injektion von SGK1 bzw. NHERF2 führen. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. Eine Möglichkeit warum es zum Ausbleiben eines additiven Effektes kam ist, dass bereits die Expression einer der beiden Stimulatoren (SGK1 bzw. NHERF2) zum maximalen stimulativen Effekt führt.

Zumindest ein Teil des stimulativen Effektes des SGK1 ist auf eine Stabilisierung des Membrantransporters in der Zellmembran zurückzuführen. Die erhobenen Daten zeigen, dass sowohl SGK1 als auch NHERF2 eine Stabilisierung des PepT2 in der Membran der *Xenopus laevis* Oozyten bewirken. Der stabilisierende Effekt von PDZ-Domänen enthaltenden Proteinen wie dem NHERF2 auf PEPT2 konnte bereits in früheren Publikationen nachgewiesen werden. Das PDZ-Domänen enthaltende Protein PDZK1 ist in der Lage PepT2 zu stimulieren. Ähnlich dem NHERF2 ist PDZK1 in der Lage PepT2 durch Stabilisierung in der Zellmembran in seiner Aktivität zu erhöhen (124).

Eine weitere Funktion des „Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 2“ (NHERF2) ist das Mitwirken bei der Endozytose bzw. Exozytose (52). Damit stehen für den beobachteten stabilisierenden Effekt des NHERF2 potentiell zwei verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Entweder bewirkt NHERF2 einen verstärkten Einbau von PepT2 in die Zellmembran oder NHERF2 führt zu einer verringerten Internalisierung von bereits in der Membran befindlichem PepT2. Durch Experimente mit dem Dynamin-Inhibitor DYNASORE konnte gezeigt werden, dass eine Expression von NHERF2 zu einer verringerten Internalisierung des Oligo-Peptid-Transporters PepT2 aus der Zellmembran führt.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass sowohl die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1 (SGK1) als auch das Gerüstprotein NHERF2 („Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 2“) den Oligo-Peptid-Transporter PepT2 (SLC15A2) in seiner Aktivität steigern. Dies geschieht durch Stabilisierung des Transporters in der Zellmembran. Die kinetischen Eigenschaften des PepT2 werden weder durch die SGK1 noch durch NHERF2 verändert. Die SGK1 phosphoryliert den PepT2 direkt am ¹⁸⁵Ser. Eine Mutation der Phosphorylierungsstelle der SGK1 in der Primärsequenz des PepT2 hat einen Verlust der Stimulation zur Folge. NHERF2 übt seine Aktivierung über die zweite PDZ-Domäne durch Bindung an das PDZ-Bindungsmotiv am C-Terminus des PepT2 aus. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten lassen vermuten, dass die Transporterdichte an PepT2 innerhalb der Zellmembran zumindest teilweise über die Interaktion von PepT2 mit SGK1 bzw. NHERF2 zu Stande kommt. Die Menge

an exprimiertem PepT2 besitzt klinische Relevanz. In Tierexperimenten mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine funktionelle Blockade der epithelialen PepT2-Moleküle eine gesteigerte renale Ausscheidung an Dipeptiden zur Folge hat. Des Weiteren zeigte sich im Mausmodell eine verringerte Aufnahmekapazität für Peptid ähnliche Substanzen wie diverse Penicilline bzw. Cephalosporine (Cefadroxil) (63), (139), (146). Veränderte Aufnahmekapazitäten von Dipeptiden bzw. Peptid ähnlichen Substanzen können nicht nur durch Blockung des PepT2 auftreten. Eine übermäßige Stimulation der SGK1 hätte potenziell eine vermehrte PepT2-Dichte in der Zellmembran zur Folge. Durch eine spezifische Mutation im SGK1-Gen kommt es zur erhöhten SGK-Aktivität (31), (162). Glukokortikoide und Stress stimulieren ebenfalls die SGK-Expression (106). In beiden Fällen könnte es zu einer erhöhten epithelialen PepT2-Dichte kommen, was eine gesteigerte Peptidaufnahme zur Folge hätte. In wie weit diese Beobachtungen auch in vivo von Bedeutung sind, konnte bisher noch nicht abschließend geklärt werden und bedarf weiterer Nachforschung.

4.3 Regulation des Aminosäure-Transporters B^oAT (SLC6A19)

Derzeit ist noch sehr wenig über die posttranslatorische Regulation des B^oAT (SLC6A19) bekannt. Obwohl bisher schon viele Glykosilierungs- und Phosphorylierungsstellen in der Primärsequenz des SLC6A19 identifiziert wurden, kann über ihre Bedeutung für die Modulation des Membrantransporters momentan nur spekuliert werden. Speziell verfügt der SLC6A19 über eine Phosphorylierungsstelle für die Isoformen der Serum- und Glukokortikoid induzierbaren Kinasen (SGK1-3). Tatsächlich stimulieren die SGK-Isoformen, sowie die in ihrer Primärsequenz ähnliche Proteinkinase B (PKB), den SLC6A19. Der stimulative Effekt der SGK-Isoformen beruht auf einer intakten Phosphorylierungsstelle der Aminosäure Serin an Position 100 innerhalb des SLC6A19-Moleküls. Wird das ¹⁰⁰Ser durch Alanin ersetzt, bleiben erhöhte Leucin induzierte Ströme in der elektrophysiologischen Messung aus. Außerdem war zu beobachten, dass die Aktivität der ^{S100A}SLC6A19-Mutante im Vergleich zum Wildtyp verringert war. Möglicherweise ist diese verringerte

Aktivität auf eine fehlende Stimulation durch endogene SGK der *Xenopus laevis* Oozyten zurück zu führen (22).

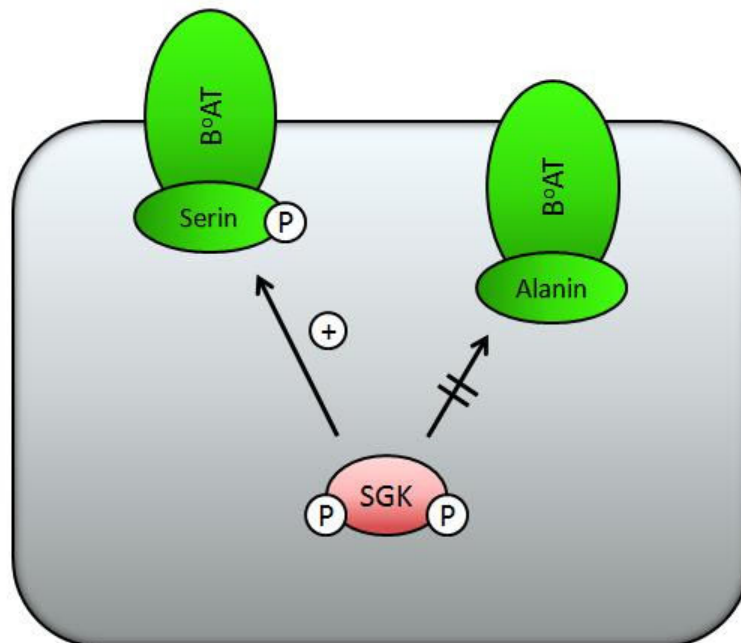


Abbildung 58: Durch Mutation im Bereich der SGK Phosphorylierungsstelle des B⁰AT geht die stimulative Wirkung der SGK verloren.

In früheren Publikationen konnte gezeigt werden, dass die SGK Membrantransporter entweder durch direkte Phosphorylierung oder durch Phosphorylierung von Interaktionsproteinen stimuliert. Eine Möglichkeit der indirekten Stimulation beinhaltet die Phosphorylierung der Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 durch die SGK. Im nicht phosphorylierten Zustand ubiquitiert die Nedd4-2 Membrantransporter und bereitet so den Abbau der Membranproteine im Proteasom vor. Die SGK inaktiviert die Nedd4-2 durch Phosphorylierung. Eine Koexpression von Nedd4-2 und SLC6A19 führte zu keiner signifikanten Reduktion des Leucin induzierten Stroms, was nahe legt, dass die Nedd4-2 für die Regulation des SLC6A19 keine Rolle spielt. Die SGK-Isoformen müssen den SLC6A19 folglich über direkte Phosphorylierung stimulieren.

Die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase wird in der Niere exprimiert (4). Die SGK-Isoformen kommen im Aldosteron sensiblen distalen Tubulus vor und in geringerer Konzentration auch im Glomerulus und im proximalen Tubulus (116). Im Dünndarm wurden die SGK-Isoformen in den Enterozyten

nachgewiesen (127). Das gemeinsame Vorkommen der SGK und des SLC6A19 legt die Vermutung nahe, dass der SGK auch in vivo Bedeutung in der Regulation des SLC6A19 zukommt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass der Aminosäure-Transport und die Menge an membranständigem SLC6A19 im Bürstensaum-Epithel der Niere von hypomorphen PDK1-Mäusen (PDK^{hm}) gegenüber Wildtyp-Mäusen signifikant verringert war (136). Dabei exprimierten die PDK^{hm}-Mäuse nur 10-25 % an PDK1 gegenüber den Wildtyp-Mäusen. Der Aminosäure-Transport war auf 75 % und die Menge an SLC6A19 auf 60 % gegenüber des Wildtyp-Kollektives abgesunken. Da die PDK1 („PIP3-dependent-kinase-1“) im PI3-Kinase Weg „upstream“ der SGK1-3 liegt, müsste bei den PDK^{hm}-Mäusen auch die Aktivität der SGK1-3 verringert sein.

Die zelluläre Aminosäureaufnahme wird unter anderem durch Insulin und „Insulin like growth factor“ (IGF) reguliert. Dabei wird die Aufnahme der Aminosäuren über den PI3-Kinase Weg stimuliert. Die SGK-Isoformen liegen „downstream“ der PI3-Kinase. Die PI3-Kinase führt über eine Phosphorylierung der PDK1 und PDK2 zur Aktivierung der SGK. Dieser Sachverhalt lässt vermuten, dass die SGK-Isoformen Einfluss auf den Aminosäure-Transport in vivo haben (106).

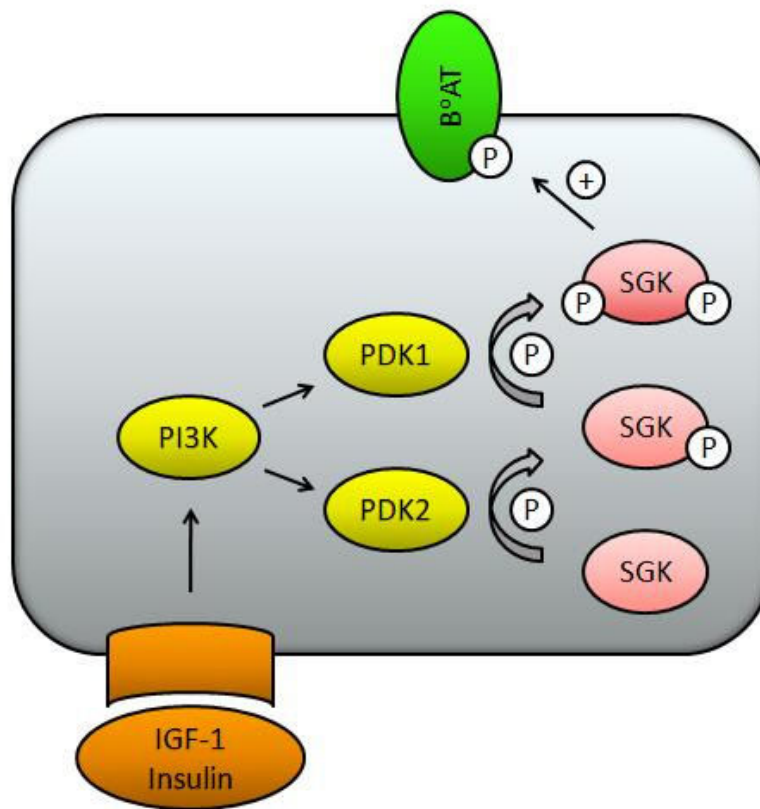


Abbildung 59: Insulin bzw. der Insulin ähnliche Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) stimulieren über Bindung am IGF-1-Rezeptor die PI3-Kinase. Die PI3-Kinase aktiviert im weiteren Verlauf die PDK1 bzw. PDK2. Über zwei aufeinander folgende Phosphorylierungsschritte wird die SGK aktiviert und kann ihrerseits Membrantransporter phosphorylieren und damit stimulieren.

Die Stimulation der SGK ist zumindest teilweise auf eine gesteigerte Expression der Membrantransporter innerhalb der Zellmembran zurückzuführen (106). Dieser Effekt konnte auch für den SLC6A19 nachgewiesen werden. Sowohl die SGK1 als auch die SGK3 erhöhen die Transporterdichte an SLC6A19. In mehreren Publikationen konnte nachgewiesen werden, dass die erhöhte Transporterdichte durch die SGK-Isoformen auf einer Stabilisierung der Transporter beruht. Die Interaktion zwischen der SGK und dem zu stabilisierenden Membranprotein führt zu einer verringerten Internalisierung des Membranproteins von der Zellmembran (183), (55). Durch Inkubation von Oozyten des Krallenfroschs *Xenopus laevis* mit Brefeldin A zeigte sich unter Koexpression von SGK1 bzw. SGK3 mit SLC6A19 eine verringerte Internalisierung des SLC6A19. Die Isoformen 1 und 3 der Serum- und Glukokortikoid induzierbaren Kinase stabilisieren folglich den SLC6A19 in der Zellmembran der Oozyten.

Eine nicht regelgerechte Regulation des SLC6A19 könnte theoretisch in vivo zu einer vermehrten renalen Ausscheidung von Aminosäuren führen. Spezielle „Loss-of-function“-Mutationen im Gen des SLC6A19 führen zum Krankheitsbild der Hartnup-Krankheit (96), (144). Unter „Loss-of-function“-Mutationen versteht man Mutationen, die zur Funktionslosigkeit des betreffenden Gens führen. Die Hartnup-Krankheit ist von einer verringerten Resorption an Aminosäuren im Dünndarm und der Niere gekennzeichnet (142), (119). Jedoch liegt keine der SGK-Phosphorylierungsstellen innerhalb einer der „Loss-of-function“-Mutationen des SLC6A19 (28).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase als neuer Modulator des SLC6A19 identifiziert werden konnte. Die SGK-Isoformen aktivieren den SLC6A19 durch Stabilisierung des Transporters in der Zellmembran. Es kommt zu keiner Veränderung der kinetischen Eigenschaften des SLC6A19. Für eine adäquate Stimulation ist das ¹⁰⁰Ser innerhalb der SGK-Phosphorylierungsstelle in der Primärsequenz des SLC6A19 von entscheidender Bedeutung. Ein Ersatz des Serins durch Alanin hat den Verlust des stimulativen Effekts zur Folge. Die durch die vorliegende Arbeit gewonnenen Daten lassen vermuten, dass die SGK1 und SGK3 als Regulator der SLC6A19-Dichte innerhalb der Zellmembran fungieren.

5 Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit konnten weitreichende Aufschlüsse über die posttranslatorische Regulation der Membrantransporter SMIT1, PepT2 und B^oAT durch die Serum- und Glukokortikoid induzierbaren Kinase (SGK) gewonnen werden.

1. Alle drei SGK-Isoformen (SGK1-3) sowie die Proteinkinase B sind in der Lage SMIT1 zu stimulieren, wobei die Stimulation vom aktiven katalytischen Zentrum der jeweiligen Kinase abhängt. Eine Inaktivierung des katalytischen Zentrums führt zum Verlust des stimulativen Effektes der SGK auf SMIT1.
2. Die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 hemmt den SMIT1.
3. SGK1 stimuliert den PepT2 nicht aber den PepT1. Die Stimulation erfolgt wahrscheinlich durch direkte Phosphorylierung des PepT2.
4. Das Gerüstprotein NHERF2, nicht jedoch NHERF1, ist an der Stimulation von PepT2 beteiligt. NHERF2 wirkt hierbei über die zweite PDZ-Domäne innerhalb der Primärsequenz des PepT2.
5. NHERF2 verändert nicht die Transportkinetiken des PepT2, sondern erhöht die Transporterdichte und damit die maximale Transportrate.
6. SGK1 und das Gerüstprotein NHERF2 aktivieren PepT2 unabhängig voneinander.
7. Der Protonen-Austauscher NHE3 stimuliert den PepT2, wodurch der PepT2 zumindest teilweise natriumabhängig wird.
8. Die SGK-Isoformen (SGK1-3) stimulieren den BoAT durch direkte Phosphorylierung.
9. Die SGK verändert die Transportkinetiken des SMIT1, des PepT2 und des B^oAT nicht, sondern erhöht vielmehr die maximale Transportrate durch Stabilisation der Transporter in der Zellmembran. Dadurch wird die Transporterdichte in der Zellmembran erhöht.

Die Ergebnisse zeigen, dass die SGK sowohl bei der Zellvolumenregulation (SMIT1) als auch bei Rückresorptionsvorgängen von Di- und Tripeptiden im Tubulussystem der Niere (PepT2) und bei der intestinalen und renalen Aminosäureaufnahme (B⁰AT) eine entscheidende Rolle einnimmt. Trotz der Fülle an Ergebnissen bleiben vor allem beim SMIT1 einige Fragen offen. Hier konnte keine direkte Phosphorylierung des Transporters durch die SGK nachgewiesen werden. Ziel weiterer Forschungsarbeit wird es sein, an der Regulation beteiligte Proteine zu identifizieren und zu charakterisieren.

6 Literatur

6.1 Abkürzungen

Abkürzung	Erläuterung
BFA	Brefeldin A
I_{max}	Maximaler Einwärtsstrom
V_{max}	Maximale Transportgeschwindigkeit
nA	Nano-Amper
ng	Nano-Gramm
rpm	„rounds per minute“
kDa	Kilo-Dalton
MΩ	Mega-Ohm
Na⁺K⁺-ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
h	Stunde
M	Molarität (mol/Liter)
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
DEPC	DiethylenePyrocarbonate

6.2 Literaturverzeichnis

1. **Akutsu N, Lin R, Bastien Y, Bestawros A, Enepekides DJ, Black MJ, and White JH.** Regulation of gene Expression by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and Its analog EB1089 under growth-inhibitory conditions in squamous carcinoma Cells. *Mol Endocrinol* 15: 1127-1139, 2001.
2. **Alliston TN, Gonzalez-Robayna IJ, Buse P, Firestone GL, and Richards JS.** Expression and localization of serum/glucocorticoid-induced kinase in the rat ovary: relation to follicular growth and differentiation. *Endocrinology* 141: 385-395, 2000.
3. **Altomare DA, Lyons GE, Mitsuuchi Y, Cheng JQ, and Testa JR.** Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the AKT2 kinase is activated by insulin. *Oncogene* 16: 2407-2411, 1998.
4. **Alvarez de la Rosa D, Coric T, Todorovic N, Shao D, Wang T, and Canessa CM.** Distribution and regulation of expression of serum- and glucocorticoid-induced kinase-1 in the rat kidney. *J Physiol* 551: 455-466, 2003.
5. **Anan T, Nagata Y, Koga H, Honda Y, Yabuki N, Miyamoto C, Kuwano A, Matsuda I, Endo F, Saya H, and Nakao M.** Human ubiquitin-protein ligase Nedd4: expression, subcellular localization and selective interaction with ubiquitin-conjugating enzymes. *Genes Cells* 3: 751-763, 1998.
6. **Bagowski CP, Myers JW, and Ferrell JE, Jr.** The classical progesterone receptor associates with p42 MAPK and is involved in phosphatidylinositol 3-kinase signaling in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 276: 37708-37714, 2001.
7. **Baron DN, Dent CE, Harris H, Hart EW, and Jepson JB.** Hereditary pellagra-like skin rash with temporary cerebellar ataxia, constant renal amino-aciduria, and other bizarre biochemical features. *Lancet* 271: 421-428, 1956.
8. **BelAiba RS, Djordjevic T, Bonello S, Artunc F, Lang F, Hess J, and Gorlach A.** The serum- and glucocorticoid-inducible kinase Sgk-1 is involved in pulmonary vascular remodeling: role in redox-sensitive regulation of tissue factor by thrombin. *Circ Res* 98: 828-836, 2006.
9. **Bell LM, Leong ML, Kim B, Wang E, Park J, Hemmings BA, and Firestone GL.** 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: 25262-25272, 2000.
10. **Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, and Tsichlis PN.** A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254: 274-277, 1991.
11. **Berger UV, and Hediger MA.** Distribution of peptide transporter PEPT2 mRNA in the rat nervous system. *Anat Embryol (Berl)* 199: 439-449, 1999.
12. **Berkowitz BA, Bevins CL, and Zasloff MA.** Magainins: a new family of membrane-active host defense peptides. *Biochem Pharmacol* 39: 625-629, 1990.
13. **Berry GT, Mallee JJ, Kwon HM, Rim JS, Mulla WR, Muenke M, and Spinner NB.** The human osmoregulatory Na⁺/myo-inositol cotransporter gene (SLC5A3): molecular cloning and localization to chromosome 21. *Genomics* 25: 507-513, 1995.

14. **Bhargava A, Fullerton MJ, Myles K, Purdy TM, Funder JW, Pearce D, and Cole TJ.** The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology* 142: 1587-1594, 2001.
15. **Biondi RM, Kieloch A, Currie RA, Deak M, and Alessi DR.** The PIF-binding pocket in PDK1 is essential for activation of S6K and SGK, but not PKB. *EMBO J* 20: 4380-4390, 2001.
16. **Bockman DE, Ganapathy V, Oblak TG, and Leibach FH.** Localization of peptide transporter in nuclei and lysosomes of the pancreas. *Int J Pancreatol* 22: 221-225, 1997.
17. **Boehmer C, Henke G, Schniepp R, Palmada M, Rothstein JD, Broer S, and Lang F.** 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: 1181-1188, 2003.
18. **Boehmer C, Okur F, Setiawan I, Broer S, and Lang F.** Properties and regulation of glutamine transporter SN1 by protein kinases SGK and PKB. *Biochem Biophys Res Commun* 306: 156-162, 2003.
19. **Boehmer C, Palmada M, Klaus F, Jeyaraj S, Lindner R, Laufer J, Daniel H, and Lang F.** The peptide transporter PEPT2 is targeted by the protein kinase SGK1 and the scaffold protein NHERF2. *Cell Physiol Biochem* 22: 705-714, 2008.
20. **Boehmer C, Palmada M, Rajamanickam J, Schniepp R, Amara S, and Lang F.** Post-translational regulation of EAAT2 function by co-expressed ubiquitin ligase Nedd4-2 is impacted by SGK kinases. *J Neurochem* 97: 911-921, 2006.
21. **Boehmer C, Rajamanickam J, Schniepp R, Kohler K, Wulff P, Kuhl D, Palmada M, and Lang F.** Regulation of the excitatory amino acid transporter EAAT5 by the serum and glucocorticoid dependent kinases SGK1 and SGK3. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 738-742, 2005.
22. **Boehmer C, Wilhelm V, Palmada M, Wallisch S, Henke G, Brinkmeier H, Cohen P, Pieske B, and Lang F.** Serum and glucocorticoid inducible kinases in the regulation of the cardiac sodium channel SCN5A. *Cardiovasc Res* 57: 1079-1084, 2003.
23. **Boehmer C, Broer A, Munzinger M, Kowalczyk S, Rasko JE, Lang F, and Broer S.** Characterization of mouse amino acid transporter B0AT1 (slc6a19). *Biochem J* 389: 745-751, 2005.
24. **Boehmer C, Philippin M, Rajamanickam J, Mack A, Broer S, Palmada M, and Lang F.** Stimulation of the EAAT4 glutamate transporter by SGK protein kinase isoforms and PKB. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 1242-1248, 2004.
25. **Boll M, Markovich D, Weber WM, Korte H, Daniel H, and Murer H.** Expression cloning of a cDNA from rabbit small intestine related to proton-coupled transport of peptides, beta-lactam antibiotics and ACE-inhibitors. *Pflugers Arch* 429: 146-149, 1994.
26. **Brennan FE, and Fuller PJ.** Rapid upregulation of serum and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) gene expression by corticosteroids in vivo. *Mol Cell Endocrinol* 166: 129-136, 2000.

27. **Brickley DR, Mikosz CA, Hagan CR, and Conzen SD.** Ubiquitin modification of serum and glucocorticoid-induced protein kinase-1 (SGK-1). *J Biol Chem* 277: 43064-43070, 2002.
28. **Broer S, Cavanaugh JA, and Rasko JE.** Neutral amino acid transport in epithelial cells and its malfunction in Hartnup disorder. *Biochem Soc Trans* 33: 233-236, 2005.
29. **Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, and Greenberg ME.** Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol* 21: 952-965, 2001.
30. **Burgering BM, and Coffey PJ.** Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376: 599-602, 1995.
31. **Busjahn A, Aydin A, Uhlmann R, Krasko C, Bähring S, Szelestei T, Feng Y, Dahm S, Sharma AM, Luft FC, and Lang F.** Serum- and glucocorticoid-regulated kinase (SGK1) gene and blood pressure. *Hypertension* 40: 256-260, 2002.
32. **Busjahn A, and Luft FC.** Twin studies in the analysis of minor physiological differences between individuals. *Cell Physiol Biochem* 13: 51-58, 2003.
33. **Chen XZ, Zhu T, Smith DE, and Hediger MA.** Stoichiometry and kinetics of the high-affinity H⁺-coupled peptide transporter PepT2. *J Biol Chem* 274: 2773-2779, 1999.
34. **Chu S, Rushdi S, Zumpfe ET, Mamers P, Healy DL, Jobling T, Burger HG, and Fuller PJ.** FSH-regulated gene expression profiles in ovarian tumours and normal ovaries. *Mol Hum Reprod* 8: 426-433, 2002.
35. **Chung EJ, Sung YK, Farooq M, Kim Y, Im S, Tak WY, Hwang YJ, Kim YI, Han HS, Kim JC, and Kim MK.** Gene expression profile analysis in human hepatocellular carcinoma by cDNA microarray. *Mol Cells* 14: 382-387, 2002.
36. **Ciechanover A.** The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of action and cellular physiology. *Biol Chem Hoppe Seyler* 375: 565-581, 1994.
37. **Ciechanover A.** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79: 13-21, 1994.
38. **Ciechanover A, and Schwartz AL.** The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins. *FASEB J* 8: 182-191, 1994.
39. **Cobb J, and Duboule D.** Comparative analysis of genes downstream of the Hoxd cluster in developing digits and external genitalia. *Development* 132: 3055-3067, 2005.
40. **Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, and Hemmings BA.** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378: 785-789, 1995.
41. **Dai F, Yu L, He H, Zhao Y, Yang J, Zhang X, and Zhao S.** Cloning and mapping of a novel human serum/glucocorticoid regulated kinase-like gene, SGK1, to chromosome 8q12.3-q13.1. *Genomics* 62: 95-97, 1999.
42. **Daniel H.** Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu Rev Physiol* 66: 361-384, 2004.

43. **Daniel H, and Herget M.** Cellular and molecular mechanisms of renal peptide transport. *Am J Physiol* 273: F1-8, 1997.
44. **Daniel H, and Kottra G.** The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Pflugers Arch* 447: 610-618, 2004.
45. **Dascal N.** The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem* 22: 317-387, 1987.
46. **Dawid IB, Rebbert ML, Rosa F, Jamrich M, and Sargent TD.** Gene expression in amphibian embryogenesis. *Cell Differ Dev* 25 Suppl: 67-74, 1988.
47. **Dawid IB, and Sargent TD.** *Xenopus laevis* in developmental and molecular biology. *Science* 240: 1443-1448, 1988.
48. **Debonneville C, Flores SY, Kamynina E, Plant PJ, Tauxe C, Thomas MA, Munster C, Chraibi A, Pratt JH, Horisberger JD, Pearce D, Loffing J, and Staub O.** Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. *EMBO J* 20: 7052-7059, 2001.
49. **Delmolino LM, and Castellot JJ, Jr.** Heparin suppresses sgk, an early response gene in proliferating vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 173: 371-379, 1997.
50. **Diakov A, and Korbmacher C.** A novel pathway of epithelial sodium channel activation involves a serum- and glucocorticoid-inducible kinase consensus motif in the C terminus of the channel's alpha-subunit. *J Biol Chem* 279: 38134-38142, 2004.
51. **Dieter M, Palmada M, Rajamanickam J, Aydin A, Busjahn A, Boehmer C, Luft FC, and Lang F.** Regulation of glucose transporter SGLT1 by ubiquitin ligase Nedd4-2 and kinases SGK1, SGK3, and PKB. *Obes Res* 12: 862-870, 2004.
52. **Donowitz M, Cha B, Zachos NC, Brett CL, Sharma A, Tse CM, and Li X.** NHERF family and NHE3 regulation. *J Physiol* 567: 3-11, 2005.
53. **Doyle FA, and McGivan JD.** The bovine renal epithelial cell line NBL-1 expresses a broad specificity Na(+)-dependent neutral amino acid transport system (System Bo) similar to that in bovine renal brush border membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1104: 55-62, 1992.
54. **Dumont JN.** Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136: 153-179, 1972.
55. **Embark HM, Bohmer C, Palmada M, Rajamanickam J, Wyatt AW, Wallisch S, Capasso G, Waldegger P, Seyberth HW, Waldegger S, and Lang F.** Regulation of CLC-Ka/barttin by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum- and glucocorticoid-dependent kinases. *Kidney Int* 66: 1918-1925, 2004.
56. **Embark HM, Bohmer C, Vallon V, Luft F, and Lang F.** Regulation of KCNE1-dependent K(+) current by the serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) isoforms. *Pflugers Arch* 445: 601-606, 2003.
57. **Embark HM, Setiawan I, Poppendieck S, van de Graaf SF, Boehmer C, Palmada M, Wieder T, Gerstberger R, Cohen P, Yun CC, Bindels RJ, and Lang F.** 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: 203-212, 2004.

58. **Fanning AS, and Anderson JM.** PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J Clin Invest* 103: 767-772, 1999.
59. **Fanning AS, and Anderson JM.** Protein-protein interactions: PDZ domain networks. *Curr Biol* 6: 1385-1388, 1996.
60. **Fanning AS, and Anderson JM.** Protein modules as organizers of membrane structure. *Curr Opin Cell Biol* 11: 432-439, 1999.
61. **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, and Lang F.** Expression of the serine/threonine kinase hSGK1 in chronic viral hepatitis. *Cell Physiol Biochem* 12: 47-54, 2002.
62. **Firestone GL, Giampaolo JR, and O'Keeffe BA.** Stimulus-dependent regulation of serum and glucocorticoid inducible protein kinase (SGK) transcription, subcellular localization and enzymatic activity. *Cell Physiol Biochem* 13: 1-12, 2003.
63. **Frey IM, Rubio-Aliaga I, Siewert A, Sailer D, Drobyshv A, Beckers J, de Angelis MH, Aubert J, Bar Hen A, Fiehn O, Eichinger HM, and Daniel H.** Profiling at mRNA, protein, and metabolite levels reveals alterations in renal amino acid handling and glutathione metabolism in kidney tissue of Pept2-/- mice. *Physiol Genomics* 28: 301-310, 2007.
64. **Friedrich B, Warntges S, Klingel K, Sauter M, Kandolf R, Risler T, Muller GA, Witzgall R, Kriz W, Grone HJ, and Lang F.** Up-regulation of the human serum and glucocorticoid-dependent kinase 1 in glomerulonephritis. *Kidney Blood Press Res* 25: 303-307, 2002.
65. **Gamper N, Fillon S, Feng Y, Friedrich B, Lang PA, Henke G, Huber SM, Kobayashi T, Cohen P, and Lang F.** K⁺ channel activation by all three isoforms of serum- and glucocorticoid-dependent protein kinase SGK. *Pflugers Arch* 445: 60-66, 2002.
66. **Gamper N, Fillon S, Huber SM, Feng Y, Kobayashi T, Cohen P, and Lang F.** IGF-1 up-regulates K⁺ channels via PI3-kinase, PDK1 and SGK1. *Pflugers Arch* 443: 625-634, 2002.
67. **Ganapathy ME, Brandsch M, Prasad PD, Ganapathy V, and Leibach FH.** Differential recognition of beta -lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT 1 and PEPT 2. *J Biol Chem* 270: 25672-25677, 1995.
68. **Garcia-Perez A, and Burg MB.** Role of organic osmolytes in adaptation of renal cells to high osmolality. *J Membr Biol* 119: 1-13, 1991.
69. **Garner CC, Nash J, and Haganir RL.** PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends Cell Biol* 10: 274-280, 2000.
70. **Gonzalez-Nicolini V, and McGinty JF.** Gene expression profile from the striatum of amphetamine-treated rats: a cDNA array and in situ hybridization histochemical study. *Brain Res Gene Expr Patterns* 1: 193-198, 2002.
71. **Groneberg DA, Doring F, Theis S, Nickolaus M, Fischer A, and Daniel H.** Peptide transport in the mammary gland: expression and distribution of PEPT2 mRNA and protein. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1172-1179, 2002.
72. **Groneberg DA, Nickolaus M, Springer J, Doring F, Daniel H, and Fischer A.** Localization of the peptide transporter PEPT2 in the lung:

implications for pulmonary oligopeptide uptake. *Am J Pathol* 158: 707-714, 2001.

73. **Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, and Marbaix G.** Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233: 177-182, 1971.

74. **Hayashi M, Tapping RI, Chao TH, Lo JF, King CC, Yang Y, and Lee JD.** BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase. *J Biol Chem* 276: 8631-8634, 2001.

75. **Hayashi Y, Iwashita T, Murakamai H, Kato Y, Kawai K, Kurokawa K, Tohnai I, Ueda M, and Takahashi M.** Activation of BMK1 via tyrosine 1062 in RET by GDNF and MEN2A mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 281: 682-689, 2001.

76. **Hediger MA, Coady MJ, Ikeda TS, and Wright EM.** Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature* 330: 379-381, 1987.

77. **Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, and Bruford EA.** The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflügers Arch* 447: 465-468, 2004.

78. **Hediger MA, Turk E, and Wright EM.** Homology of the human intestinal Na⁺/glucose and Escherichia coli Na⁺/proline cotransporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5748-5752, 1989.

79. **Henke G, Maier G, Wallisch S, Boehmer C, and Lang F.** 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: 194-199, 2004.

80. **Henley JR, Cao H, and McNiven MA.** Participation of dynamin in the biogenesis of cytoplasmic vesicles. *FASEB J* 13 Suppl 2: S243-247, 1999.

81. **Henley JR, and McNiven MA.** Association of a dynamin-like protein with the Golgi apparatus in mammalian cells. *J Cell Biol* 133: 761-775, 1996.

82. **Hershko A, and Ciechanover A.** The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 61: 761-807, 1992.

83. **Huber SM, Friedrich B, Klingel K, Lenka N, Hescheler J, and Lang F.** Protein and mRNA expression of serum and glucocorticoid-dependent kinase 1 in metanephrogenesis. *Dev Dyn* 221: 464-469, 2001.

84. **Hung AY, and Sheng M.** PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem* 277: 5699-5702, 2002.

85. **Ito T, Fujio Y, Hirata M, Takatani T, Matsuda T, Muraoka S, Takahashi K, and Azuma J.** Expression of taurine transporter is regulated through the TonE (tonicity-responsive element)/TonEBP (TonE-binding protein) pathway and contributes to cytoprotection in HepG2 cells. *Biochem J* 382: 177-182, 2004.

86. **Jentsch S.** The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet* 26: 179-207, 1992.

87. **Jeyaraj S, Boehmer C, Lang F, and Palmada M.** Role of SGK1 kinase in regulating glucose transport via glucose transporter GLUT4. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 629-635, 2007.

88. **Jolliffe CN, Harvey KF, Haines BP, Parasivam G, and Kumar S.** Identification of multiple proteins expressed in murine embryos as binding partners for the WW domains of the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *Biochem J* 351 Pt 3: 557-565, 2000.
89. **Jones PF, Jakubowicz T, Pitossi FJ, Maurer F, and Hemmings BA.** Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4171-4175, 1991.
90. **Kandel ES, and Hay N.** The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 253: 210-229, 1999.
91. **Kanelis V, Rotin D, and Forman-Kay JD.** Solution structure of a Nedd4 WW domain-ENaC peptide complex. *Nat Struct Biol* 8: 407-412, 2001.
92. **Kennedy MB.** Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science* 290: 750-754, 2000.
93. **Kitamura H, Yamauchi A, Sugiura T, Matsuoka Y, Horio M, Tohyama M, Shimada S, Imai E, and Hori M.** Inhibition of myo-inositol transport causes acute renal failure with selective medullary injury in the rat. *Kidney Int* 53: 146-153, 1998.
94. **Klaus F, Palmada M, Lindner R, Laufer J, Jeyaraj S, Lang F, and Boehmer C.** Up-regulation of hypertonicity-activated myo-inositol transporter SMIT1 by the cell volume-sensitive protein kinase SGK1. *J Physiol* 586: 1539-1547, 2008.
95. **Klausner RD, Donaldson JG, and Lippincott-Schwartz J.** Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 116: 1071-1080, 1992.
96. **Kleta R, Romeo E, Ristic Z, Ohura T, Stuart C, Arcos-Burgos M, Dave MH, Wagner CA, Camargo SR, Inoue S, Matsuura N, Helip-Wooley A, Bockenbauer D, Warth R, Bernardini I, Visser G, Eggermann T, Lee P, Chairoungdua A, Jutabha P, Babu E, Nilwarangkoon S, Anzai N, Kanai Y, Verrey F, Gahl WA, and Koizumi A.** Mutations in SLC6A19, encoding B0AT1, cause Hartnup disorder. *Nat Genet* 36: 999-1002, 2004.
97. **Klingel K, Warntges S, Bock J, Wagner CA, Sauter M, Waldegger S, Kandolf R, and Lang F.** Expression of cell volume-regulated kinase h-sgk in pancreatic tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G998-G1002, 2000.
98. **Knutter I, Rubio-Aliaga I, Boll M, Hause G, Daniel H, Neubert K, and Brandsch M.** H⁺-peptide cotransport in the human bile duct epithelium cell line SK-ChA-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G222-229, 2002.
99. **Kobayashi T, and Cohen P.** 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, 1999.
100. **Kobayashi T, Deak M, Morrice N, and Cohen P.** Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochem J* 344 Pt 1: 189-197, 1999.
101. **Kotra G, Stamford A, and Daniel H.** PEPT1 as a paradigm for membrane carriers that mediate electrogenic bidirectional transport of anionic, cationic, and neutral substrates. *J Biol Chem* 277: 32683-32691, 2002.

102. **Kulik G, Klippel A, and Weber MJ.** Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol* 17: 1595-1606, 1997.
103. **Kumar JM, Brooks DP, Olson BA, and Laping NJ.** Sgk, a putative serine/threonine kinase, is differentially expressed in the kidney of diabetic mice and humans. *J Am Soc Nephrol* 10: 2488-2494, 1999.
104. **Kwon HM, Yamauchi A, Uchida S, Preston AS, Garcia-Perez A, Burg MB, and Handler JS.** Cloning of the cDNA for a Na⁺/myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein. *J Biol Chem* 267: 6297-6301, 1992.
105. **Lamprecht G, Heil A, Baisch S, Lin-Wu E, Yun CC, Kalbacher H, Gregor M, and Seidler U.** The down regulated in adenoma (dra) gene product binds to the second PDZ domain of the NHE3 kinase A regulatory protein (E3KARP), potentially linking intestinal Cl⁻/HCO₃⁻ exchange to Na⁺/H⁺ exchange. *Biochemistry* 41: 12336-12342, 2002.
106. **Lang F, Bohmer C, Palmada M, Seebohm G, Strutz-Seebohm N, and Vallon V.** (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol Rev* 86: 1151-1178, 2006.
107. **Lang F, and Cohen P.** Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci STKE* 2001: RE17, 2001.
108. **Lang F, Klingel K, Wagner CA, 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 SC, Massry SG, and Broer S.** Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8157-8162, 2000.
109. **Leong ML, Maiyar AC, Kim B, O'Keeffe BA, and Firestone GL.** 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: 5871-5882, 2003.
110. **Liang R, Fei YJ, Prasad PD, Ramamoorthy S, Han H, Yang-Feng TL, Hediger MA, Ganapathy V, and Leibach FH.** Human intestinal H⁺/peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 270: 6456-6463, 1995.
111. **Liedtke CM, Yun CH, Kyle N, and Wang D.** Protein kinase C epsilon-dependent regulation of cystic fibrosis transmembrane regulator involves binding to a receptor for activated C kinase (RACK1) and RACK1 binding to Na⁺/H⁺ exchange regulatory factor. *J Biol Chem* 277: 22925-22933, 2002.
112. **Liu D, Yang X, and Songyang Z.** Identification of CISK, a new member of the SGK kinase family that promotes IL-3-dependent survival. *Curr Biol* 10: 1233-1236, 2000.
113. **Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, and Kirchhausen T.** Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* 10: 839-850, 2006.
114. **Maiyar AC, Leong ML, and Firestone GL.** Importin-alpha mediates the regulated nuclear targeting of serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by recognition of a nuclear localization signal in the kinase central domain. *Mol Biol Cell* 14: 1221-1239, 2003.

115. **Matsuoka Y, Yamauchi A, Nakanishi T, Sugiura T, Kitamura H, Horio M, Takamitsu Y, Ando A, Imai E, and Horii M.** Response to hypertonicity in mesothelial cells: role of Na⁺/myo-inositol co-transporter. *Nephrol Dial Transplant* 14: 1217-1223, 1999.
116. **McCormick JA, Bhalla V, Pao AC, and Pearce D.** SGK1: a rapid aldosterone-induced regulator of renal sodium reabsorption. *Physiology (Bethesda)* 20: 134-139, 2005.
117. **Meng F, Yamagiwa Y, Taffetani S, Han J, and Patel T.** IL-6 activates serum and glucocorticoid kinase via p38alpha mitogen-activated protein kinase pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C971-981, 2005.
118. **Meredith D, and Boyd CA.** Structure and function of eukaryotic peptide transporters. *Cell Mol Life Sci* 57: 754-778, 2000.
119. **Milne MD, Crawford MA, Girao CB, and Loughridge LW.** The metabolic disorder in Hartnup disease. *Q J Med* 29: 407-421, 1960.
120. **Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS, and Kwon HM.** Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2538-2542, 1999.
121. **Nakatani K, Sakaue H, Thompson DA, Weigel RJ, and Roth RA.** Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 906-910, 1999.
122. **Nebenfuhr A, Ritzenthaler C, and Robinson DG.** Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol* 130: 1102-1108, 2002.
123. **Nishida Y, Nagata T, Takahashi Y, Sugahara-Kobayashi M, Murata A, and Asai S.** Alteration of serum/glucocorticoid regulated kinase-1 (sgk-1) gene expression in rat hippocampus after transient global ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 123: 121-125, 2004.
124. **Noshiro R, Anzai N, Sakata T, Miyazaki H, Terada T, Shin HJ, He X, Miura D, Inui K, Kanai Y, and Endou H.** The PDZ domain protein PDZK1 interacts with human peptide transporter PEPT2 and enhances its transport activity. *Kidney Int* 70: 275-282, 2006.
125. **Nuber UA, Kriaucionis S, Roloff TC, Guy J, Selfridge J, Steinhoff C, Schulz R, Lipkowitz B, Ropers HH, Holmes MC, and Bird A.** Up-regulation of glucocorticoid-regulated genes in a mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 14: 2247-2256, 2005.
126. **Out HJ, Braat DD, Lintsen BM, Gurgan T, Bukulmez O, Gokmen O, Keles G, Caballero P, Gonzalez JM, Fabregues F, Balasch J, and Roulier R.** Increasing the daily dose of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon) does not compensate for the age-related decline in retrievable oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod* 15: 29-35, 2000.
127. **Palmada M, Dieter M, Boehmer C, Waldegger S, and Lang F.** Serum and glucocorticoid inducible kinases functionally regulate ClC-2 channels. *Biochem Biophys Res Commun* 321: 1001-1006, 2004.
128. **Palmada M, Embark HM, Yun C, Bohmer C, and Lang F.** Molecular requirements for the regulation of the renal outer medullary K(+) channel

ROMK1 by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Biochem Biophys Res Commun* 311: 629-634, 2003.

129. **Palmada M, Poppendieck S, Embark HM, van de Graaf SF, Boehmer C, Bindels RJ, and Lang F.** Requirement of PDZ domains for the stimulation of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 by the NHE regulating factor NHERF2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1. *Cell Physiol Biochem* 15: 175-182, 2005.

130. **Palmieri F.** The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch* 447: 689-709, 2004.

131. **Park J, Leong ML, Buse P, Maiyar AC, Firestone GL, and Hemmings BA.** Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J* 18: 3024-3033, 1999.

132. **Perrotti N, He RA, Phillips SA, Haft CR, and Taylor SI.** Activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase (Sgk) by cyclic AMP and insulin. *J Biol Chem* 276: 9406-9412, 2001.

133. **Poulat F, de Santa Barbara P, Desclozeaux M, Soullier S, Moniot B, Bonneaud N, Boizet B, and Berta P.** The human testis determining factor SRY binds a nuclear factor containing PDZ protein interaction domains. *J Biol Chem* 272: 7167-7172, 1997.

134. **Rajamanickam J, Palmada M, Lang F, and Boehmer C.** EAAT4 phosphorylation at the SGK1 consensus site is required for transport modulation by the kinase. *J Neurochem* 102: 858-866, 2007.

135. **Rauhala P, Andoh T, and Chiueh CC.** Neuroprotective properties of nitric oxide and S-nitrosoglutathione. *Toxicol Appl Pharmacol* 207: 91-95, 2005.

136. **Rexhepaj R, Grahammer F, Volkl H, Remy C, Wagner CA, Sandulache D, Artunc F, Henke G, Nammi S, Capasso G, Alessi DR, and Lang F.** Reduced intestinal and renal amino acid transport in PDK1 hypomorphic mice. *FASEB J* 20: 2214-2222, 2006.

137. **Rim JS, Tanawattanachoen S, Takenaka M, Handler JS, and Kwon HM.** The canine sodium/myo-inositol cotransporter gene: structural organization and characterization of the promoter. *Arch Biochem Biophys* 341: 193-199, 1997.

138. **Roux A, Uyhazi K, Frost A, and De Camilli P.** GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* 441: 528-531, 2006.

139. **Rubio-Aliaga I, Frey I, Boll M, Groneberg DA, Eichinger HM, Balling R, and Daniel H.** Targeted disruption of the peptide transporter Pept2 gene in mice defines its physiological role in the kidney. *Mol Cell Biol* 23: 3247-3252, 2003.

140. **Saad S, Stevens VA, Wassef L, Poronnik P, Kelly DJ, Gilbert RE, and Pollock CA.** High glucose transactivates the EGF receptor and up-regulates serum glucocorticoid kinase in the proximal tubule. *Kidney Int* 68: 985-997, 2005.

141. **Schniepp R, Kohler K, Ladewig T, Guenther E, Henke G, Palmada M, Boehmer C, Rothstein JD, Broer S, and Lang F.** 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: 1442-1449, 2004.

142. **Scriver CR.** Hartnup Disease: A Genetic Modification of Intestinal and Renal Transport of Certain Neutral Alpha-Amino Acids. *N Engl J Med* 273: 530-532, 1965.
143. **Seeböhm G, Strutz-Seeböhm N, Baltaev R, Korniychuk G, Knirsch M, Engel J, and Lang F.** Regulation of KCNQ4 potassium channel prepulse dependence and current amplitude by SGK1 in *Xenopus* oocytes. *Cell Physiol Biochem* 16: 255-262, 2005.
144. **Seow HF, Broer S, Broer A, Bailey CG, Potter SJ, Cavanaugh JA, and Rasko JE.** Hartnup disorder is caused by mutations in the gene encoding the neutral amino acid transporter SLC6A19. *Nat Genet* 36: 1003-1007, 2004.
145. **Shelly C, and Herrera R.** Activation of SGK1 by HGF, Rac1 and integrin-mediated cell adhesion in MDCK cells: PI-3K-dependent and -independent pathways. *J Cell Sci* 115: 1985-1993, 2002.
146. **Shen H, Ocheltree SM, Hu Y, Keep RF, and Smith DE.** Impact of genetic knockout of PEPT2 on cefadroxil pharmacokinetics, renal tubular reabsorption, and brain penetration in mice. *Drug Metab Dispos* 35: 1209-1216, 2007.
147. **Shenolikar S, Voltz JW, Cunningham R, and Weinman EJ.** Regulation of ion transport by the NHERF family of PDZ proteins. *Physiology (Bethesda)* 19: 362-369, 2004.
148. **Shojaiefard M, Christie DL, and Lang F.** Stimulation of the creatine transporter SLC6A8 by the protein kinases SGK1 and SGK3. *Biochem Biophys Res Commun* 334: 742-746, 2005.
149. **Shu C, Shen H, Hopfer U, and Smith DE.** Mechanism of intestinal absorption and renal reabsorption of an orally active ace inhibitor: uptake and transport of fosinopril in cell cultures. *Drug Metab Dispos* 29: 1307-1315, 2001.
150. **Sitaraman SV, Wang L, Wong M, Bruewer M, Hobert M, Yun CH, Merlin D, and Madara JL.** The adenosine 2b receptor is recruited to the plasma membrane and associates with E3KARP and Ezrin upon agonist stimulation. *J Biol Chem* 277: 33188-33195, 2002.
151. **Smith DE, Pavlova A, Berger UV, Hediger MA, Yang T, Huang YG, and Schnermann JB.** Tubular localization and tissue distribution of peptide transporters in rat kidney. *Pharm Res* 15: 1244-1249, 1998.
152. **Steel A, Nussberger S, Romero MF, Boron WF, Boyd CA, and Hediger MA.** Stoichiometry and pH dependence of the rabbit proton-dependent oligopeptide transporter PepT1. *J Physiol* 498 (Pt 3): 563-569, 1997.
153. **Stichel CC, Schoenebeck B, Foguet M, Siebertz B, Bader V, Zhu XR, and Lubbert H.** sgk1, a member of an RNA cluster associated with cell death in a model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 21: 301-316, 2005.
154. **Sun F, Hug MJ, Bradbury NA, and Frizzell RA.** Protein kinase A associates with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via an interaction with ezrin. *J Biol Chem* 275: 14360-14366, 2000.
155. **Sun F, Hug MJ, Lewarchik CM, Yun CH, Bradbury NA, and Frizzell RA.** E3KARP mediates the association of ezrin and protein kinase A with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway cells. *J Biol Chem* 275: 29539-29546, 2000.
156. **Takenaka M, Preston AS, Kwon HM, and Handler JS.** The tonicity-sensitive element that mediates increased transcription of the betaine

transporter gene in response to hypertonic stress. *J Biol Chem* 269: 29379-29381, 1994.

157. **Tamura G, Ando K, Suzuki S, Takatsuki A, and Arima K.** Antiviral activity of brefeldin A and verrucarin A. *J Antibiot (Tokyo)* 21: 160-161, 1968.

158. **Thwaites DT, Kennedy DJ, Raldua D, Anderson CM, Mendoza ME, Bladen CL, and Simmons NL.** H/dipeptide absorption across the human intestinal epithelium is controlled indirectly via a functional Na/H exchanger. *Gastroenterology* 122: 1322-1333, 2002.

159. **Ullrich S, Berchtold S, Ranta F, Seebohm G, Henke G, Lupescu A, Mack AF, Chao CM, Su J, Nitschke R, Alexander D, Friedrich B, Wulff P, Kuhl D, and Lang F.** Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) mediates glucocorticoid-induced inhibition of insulin secretion. *Diabetes* 54: 1090-1099, 2005.

160. **Urrutia R, Henley JR, Cook T, and McNiven MA.** The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases? *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 377-384, 1997.

161. **Urtti A, Johns SJ, and Sadee W.** Genomic structure of proton-coupled oligopeptide transporter hPEPT1 and pH-sensing regulatory splice variant. *AAPS PharmSci* 3: E6, 2001.

162. **von Wowern F, Berglund G, Carlson J, Mansson H, Hedblad B, and Melander O.** Genetic variance of SGK-1 is associated with blood pressure, blood pressure change over time and strength of the insulin-diastolic blood pressure relationship. *Kidney Int* 68: 2164-2172, 2005.

163. **Wada M, Miyakawa S, Shimada A, Okada N, Yamamoto A, and Fujita T.** Functional linkage of H⁺/peptide transporter PEPT2 and Na⁺/H⁺ exchanger in primary cultures of astrocytes from mouse cerebral cortex. *Brain Res* 1044: 33-41, 2005.

164. **Wade JB, Liu J, Coleman RA, Cunningham R, Steplock DA, Lee-Kwon W, Pallone TL, Shenolikar S, and Weinman EJ.** Localization and interaction of NHERF isoforms in the renal proximal tubule of the mouse. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C1494-1503, 2003.

165. **Waerntges S, Klingel K, Weigert C, Fillon S, Buck M, Schleicher E, Rodemann HP, Knabbe C, Kandolf R, and Lang F.** Excessive transcription of the human serum and glucocorticoid dependent kinase hSGK1 in lung fibrosis. *Cell Physiol Biochem* 12: 135-142, 2002.

166. **Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, and Broer S.** The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem* 10: 1-12, 2000.

167. **Wagner CA, Lang F, and Broer S.** Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C1077-1093, 2001.

168. **Waldegger S, Barth P, Forrest JN, Jr., Greger R, and Lang F.** Cloning of sgk serine-threonine protein kinase from shark rectal gland - a gene induced by hypertonicity and secretagogues. *Pflugers Arch* 436: 575-580, 1998.

169. **Waldegger S, Barth P, Raber G, and Lang F.** 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: 4440-4445, 1997.

170. **Waldegger S, Erdel M, Nagl UO, Barth P, Raber G, Steuer S, Utermann G, Paulmichl M, and Lang F.** Genomic organization and chromosomal localization of the human SGK protein kinase gene. *Genomics* 51: 299-302, 1998.
171. **Waldegger S, Gabrysch S, Barth P, Fillon S, and Lang F.** h-sgk serine-threonine protein kinase as transcriptional target of p38/MAP kinase pathway in HepG2 human hepatoma cells. *Cell Physiol Biochem* 10: 203-208, 2000.
172. **Waldegger S, Klingel K, Barth P, Sauter M, Rfer ML, Kandolf R, and Lang F.** h-sgk serine-threonine protein kinase gene as transcriptional target of transforming growth factor beta in human intestine. *Gastroenterology* 116: 1081-1088, 1999.
173. **Webster MK, Goya L, and Firestone GL.** Immediate-early transcriptional regulation and rapid mRNA turnover of a putative serine/threonine protein kinase. *J Biol Chem* 268: 11482-11485, 1993.
174. **Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC, and Firestone GL.** Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol Cell Biol* 13: 2031-2040, 1993.
175. **Weinman EJ.** New functions for the NHERF family of proteins. *J Clin Invest* 108: 185-186, 2001.
176. **Weinman EJ, Lakkis J, Akom M, Wali RK, Drachenberg CB, Coleman RA, and Wade JB.** Expression of NHERF-1, NHERF-2, PDGFR-alpha, and PDGFR-beta in normal human kidneys and in renal transplant rejection. *Pathobiology* 70: 314-323, 2002.
177. **Weinman EJ, Minkoff C, and Shenolikar S.** Signal complex regulation of renal transport proteins: NHERF and regulation of NHE3 by PKA. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F393-399, 2000.
178. **Weinman EJ, Steplock D, Donowitz M, and Shenolikar S.** NHERF associations with sodium-hydrogen exchanger isoform 3 (NHE3) and ezrin are essential for cAMP-mediated phosphorylation and inhibition of NHE3. *Biochemistry* 39: 6123-6129, 2000.
179. **Wu MS, Biemesderfer D, Giebisch G, and Aronson PS.** Role of NHE3 in mediating renal brush border Na⁺-H⁺ exchange. Adaptation to metabolic acidosis. *J Biol Chem* 271: 32749-32752, 1996.
180. **Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, and Somero GN.** Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217: 1214-1222, 1982.
181. **Yoo D, Kim BY, Campo C, Nance L, King A, Maouyo D, and Welling PA.** Cell surface expression of the ROMK (Kir 1.1) channel is regulated by the aldosterone-induced kinase, SGK-1, and protein kinase A. *J Biol Chem* 278: 23066-23075, 2003.
182. **Yun CC, Chen Y, and Lang F.** Glucocorticoid activation of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger isoform 3 revisited. The roles of SGK1 and NHERF2. *J Biol Chem* 277: 7676-7683, 2002.
183. **Yun CC, Palmada M, Embark HM, Fedorenko O, Feng Y, Henke G, Setiawan I, Boehmer C, Weinman EJ, Sandrasagra S, Korbmacher C, Cohen P, Pearce D, and Lang F.** 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: 2823-2830, 2002.

184. **Yun CH, Oh S, Zizak M, Steplock D, Tsao S, Tse CM, Weinman EJ, and Donowitz M.** cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3010-3015, 1997.

185. **Zecevic M, Heitzmann D, Camargo SM, and Verrey F.** SGK1 increases Na,K-ATP cell-surface expression and function in *Xenopus laevis* oocytes. *Pflugers Arch* 448: 29-35, 2004.

186. **Zhou C, and Cammarata PR.** Cloning the bovine Na⁺/myo-inositol cotransporter gene and characterization of an osmotic responsive promoter. *Exp Eye Res* 65: 349-363, 1997.

187. **Zhu T, Chen XZ, Steel A, Hediger MA, and Smith DE.** Differential recognition of ACE inhibitors in *Xenopus laevis* oocytes expressing rat PEPT1 and PEPT2. *Pharm Res* 17: 526-532, 2000.

7 Anhang

7.1 Danksagung

Während meiner Zeit im Physiologischen Institut erfuhr ich von vielen Menschen Unterstützung. Jeder einzelne hat damit zum Erfolg meines Schaffens beigetragen. Deshalb möchte an erster Stelle vor allem andere ein großes Danke stellen.

Des Weiteren ist es mir ein Anliegen einigen Personen persönlich für ihr Engagement Dank auszusprechen. An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Florian Lang für die Überlassung des interessanten Themas und die Unterstützung dieser Arbeit danken. Durch seine Fachkompetenz und Begeisterungsfähigkeit konnte diese Arbeit erst entstehen. Ein herzliches Dankeschön an meine Betreuer Frau Prof. Dr. rer. nat. Monika Palmada und Herrn PD Dr. rer. nat. Christoph Böhmer. Ihnen verdanke ich meine Kenntnisse im Bereich der Elektrophysiologie und Biochemie. Bei entstehenden Problemen standen sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite und trugen damit für das Gelingen dieser Arbeit maßgeblich bei.

Meinem sehr guten Freund und Kollegen Jörg Laufer möchte ich ganz besonders danken. Durch seine professionelle Art war eine effektive und in den Ergebnissen ergiebige Laborarbeit sichergestellt.

Dem übrigen Laborteam danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Es sind dies Sankarganesh Jeyaraj, Ricco Lindner, Birgitta Noll und Elfriede Faber. Für die gute Organisation möchte ich mich bei Tanja Loch, Eva Unertl und Lejla Subasic bedanken. Herrn Peter Dürr gilt mein Dank für die technische Unterstützung.

Nicht zuletzt gilt natürlich besonderer Dank meiner Familie, meiner Freundin Mirjam, meinen Freunden und Bekannten, die Erfolgserlebnisse sowie Misserfolge mit mir teilten und so mit moralischer Unterstützung zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Fabian Klaus
Geburtsdatum: 12.09.1983
Geburtsort: Freiburg im Breisgau

Schulbildung:

1990 – 1994 Grundschule in Nendingen
1994 – 2003 Immanuel Kant Gymnasium in Tuttlingen
2000 vierwöchiger Schüleraustausch nach Ithaka, NY, USA
2003 „Chemie-Preis“ der Firma Aesculap

Zivildienst:

2003 – 2004 Kreisklinikum Tuttlingen

Studium / Beruf:

2004 – 2010 Humanmedizin-Studium an der Eberhard Karls Universität
Tübingen
2006 Erstes Staatsexamen
2006 – 2009 Forschungsarbeit im Physiologischen Institut unter Herrn
Prof. F. Lang
2008 Promotionsstipendium der Medizinischen Fakultät
2008 Posterpräsentation auf dem Kongress der Physiologischen
Gesellschaft in Köln

2009	Posterpräsentation auf dem Kongress der Physiologischen Gesellschaft in Giessen und Auszeichnung mit dem „DPG Young Investigator Award 2009“
2009	Praktisches Jahr: Erstes Tertial an der Chirurgische Klinik des Diakonie-Klinikums Stuttgart
2010	Praktisches Jahr: Zweites Tertial an der Medizinische Klinik des Kantospitals St. Gallen (Schweiz)
2010	Praktisches Jahr: Drittes Tertial in der Anästhesiologischen Abteilung des Diakonie-Klinikums Stuttgart
2010	Zweites Staatsexamen

7.3 Publikationsliste

Erstautorschaften:

- (1) **Klaus F**, Palmada M, Lindner R, Laufer J, Jeyaraj S, Lang F, Boehmer C. Up-regulation of hypertonicity-activated myo-inositol transporter SMIT1 by the cell volume-sensitive protein kinase SGK1. *J Physiol* 2008; 586:1539-1547
- (2) **Klaus F**, Laufer J, Czarkowski K, Strutz-Seebohm N, Seebohm G, Lang F. PIKfyve-dependent regulation of the Cl(-) channel ClC-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 381(3):407-411
- (3) **Klaus F**, Gehring EM, Zürn A, Laufer J, Lindner R, Strutz-Seebohm N, Tavaré JM, Rothstein JD, Boehmer C, Palmada M, Gruner I, Lang UE, Seebohm G, Lang F. Regulation of the Na⁺-coupled glutamate transporter EAAT3 by PIKfyve. *Neurochem int.* 2009; 54(5-6):372-7

Koautorschaften:

- (1) Boehmer C, Palmada M, Kenngott C, Lindner R, **Klaus F**, Laufer J, Lang F. Regulation of the epithelial calcium channel TRPV6 by the serum and glucocorticoid-inducible kinase isoforms SGK1 and SGK3. *FEBS Letters* 2007; 581:5586–5590
- (2) Boehmer C, Palmada M, **Klaus F**, Jeyaraj J, Lindner J, Laufer J, Daniel D, Lang F. The Peptide Transporter PEPT2 is targeted by the Protein Kinase SGK1 and the Scaffold Protein NHERF2. *Cell Physiol Biochem* 2008; 22:715-724
- (3) Boehmer C, Laufer J, Jeyaraj J, **Klaus F**, Lindner R, Lang F, Palmada M. Modulation of the Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.5 by the SGK1 Protein Kinase Involves Inhibition of Channel Ubiquitination. *Cell Physiol Biochem* 2008; 22:591-600
- (4) Laufer J, Boehmer C, Jeyaraj S, Knüwer M, **Klaus F**, Lindner R, Palmada M, Lang F. The C-Terminal PDZ-Binding Motif in the Kv1.5 Potassium Channel governs its Modulation by the Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor 2. *Cell Physiol Biochem* 2008; 23(1-3):25-36
- (5) Gehring EM, Zurn A, **Klaus F**, Laufer J, Sopjani M, Lindner R, Strutz-Seebohm N, Tavaré JM, Boehmer C, Palmada M, Lang UE, Seebohm G, Lang F. Regulation of the glutamate transporter EAAT2 by PIKfyve. *Cell Physiol Biochem*. 2009;24(5-6):361-8
- (6) Sopjani M, Kunert A, Czarkowski K, **Klaus F**, Laufer J, Föllner M, Lang F. Regulation of the Ca²⁺ channel TRPV6 by the kinases SGK1, PKB/Akt, and PIKfyve. *J Membr Biol*. 2010 Feb;233(1-3):35-41
- (7) Boehmer C, Sopjani M., **Klaus F**, Lindner R, Laufer J, Jeyaraj S, Lang F, Palmada M. The serum and glucocorticoid inducible kinases SGK1-3 stimulate neutral amino acid transporter SLC6A19. *Cell Physiol Biochem* 2010; 25(6):723-32
- (8) Alesutan IS, Ureche ON, Laufer J, **Klaus F**, Zürn A, Strutz-Seebohm N, Tavaré JM, Boehmer C, Palmada M, Lang UE, Seebohm G, Lang F. Regulation of the glutamate transporter EAAT4 by PIKfyve. *Cell Physiol Biochem* 2010; 25(2-3):187-94

- (9) Kempe DS, Ackermann TF, Boini KM, **Klaus F**, Umbach AT, Dörmaku-Sopjani M, Judenhofer MS, Pichler BJ, Capuano P, Stange G, Wagner CA, Birnbaum MJ, Pearce D, Föllner M, Lang F. Akt2/PKBbeta-sensitive regulation of renal phosphate transport. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010 Sep;200(1):75-85