

Aus dem ehemaligen Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie

(Prof. Dr. med. G. Burckhardt em.)

im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Einflüsse der Serum- und Glukokortikoidkinasen 1 und 3  
auf den humanen Na<sup>+</sup>- Dikarboxylat- Transporter NaDC3**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Andrea Dzikowski

aus

Braunschweig

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer  
Referent/ in: Prof. Dr. phil. nat. B. C. Burckhardt  
Ko-Referent/ in: Prof. Dr. rer. nat. A. R. Asif

Datum der mündlichen Prüfung: 22.08.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Einflüsse der Serum- und Glukokortikoidkinasen 1 und 3 auf den humanen Na<sup>+</sup>- Dikarboxylat- Transporter NaDC3“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 27.02.2017

---

(Unterschrift)

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	4
Tabellenverzeichnis .....	5
Abkürzungsverzeichnis .....	6
1 Einleitung .....	7
1.1    Aufbau und Funktion der Nieren .....	7
1.2    Transportsysteme der zellulären Membran.....	9
1.3    Natrium-Dikarboxylat-Transporter 3 (NaDC3).....	10
1.3.1    Der humane Natrium-Dikarboxylat-Transporter (hNaDC3/ SLC13A3) und weitere Mitglieder dieser Genfamilie .....	10
1.3.2    NaDC3 versus NaDC1 .....	14
1.3.3    Struktur, Lokalisation und Funktion des humanen NaDC3 .....	16
1.4    Serum- und Glukokortikoidkinase (sgk) 1 und 3 .....	17
1.4.1    Einleitung .....	17
1.4.2    Regulation der sgk.....	20
1.4.3    Regulation der sgk-Aktivität .....	21
1.4.4    Rolle der sgk in der Regulation der molekularen und zellulären Funktion... ..	22
1.4.5    Molekulare Funktionsmechanismen der sgk .....	25
1.5    Ziele der Arbeit.....	26
2 Material und Methoden .....	27
2.1    Material.....	27
2.1.1    Geräteliste.....	27
2.1.2    Chemikalien.....	28
2.1.3    Testlösungen.....	28
2.2    Methoden .....	29
2.2.1    Elektrophysiologischer Messplatz.....	29
2.2.2    Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik (TEVC) .....	30
2.2.3    Mikroelektroden .....	31
2.2.4    Entnahme und Präparation der Oozyten.....	33
2.2.5    Injektion der cRNA und weitere Behandlung .....	35
2.2.6    Elektrophysiologische Messung.....	38
2.2.7    Registrierung der Messwerte .....	39
2.2.8    Versuche zur Aufnahme von [ <sup>14</sup> C]-markiertem Succinat .....	40
2.2.9    Tierhaltung .....	41
3 Ergebnisse .....	42
3.1    Untersuchungen mit hNaDC3 und sgk1 .....	42

3.1.1	Strom-Spannungskennlinien (I-V-Kennlinien) $\alpha$ KG-induzierbarer Ströme ohne und mit Koexpression von <i>sgk1</i> .....	42
3.1.2	Einfluss der <i>sgk1</i> auf die Aufnahme radioaktiv-markierten Succinates .....	47
3.1.3	Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter.....	48
3.1.4	I-V-Kennlinien $\alpha$ KG-induzierbarer Ströme ohne und mit Koexpression von <i>sgk1</i> während der Perfusion mit Natrium-freien oder Lithium-haltigen Lösungen .....	49
3.2	Untersuchungen mit hNaDC3 und <i>sgk3</i> .....	51
3.2.1	I-V-Kennlinien $\alpha$ KG-induzierbarer Ströme ohne und mit Koexpression von <i>sgk3</i> .....	51
3.2.2	Einfluss der <i>sgk3</i> auf die Aufnahme radioaktiv-markierten Succinates .....	54
3.2.3	Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter.....	55
3.2.4	I-V-Kennlinien $\alpha$ KG-induzierbarer Ströme ohne und mit Koexpression von <i>sgk3</i> während der Perfusion mit Natrium-freien oder Lithium-haltigen Lösungen .....	56
4	Diskussion .....	59
4.1	Vorteile der <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten als Expressionsmodell .....	59
4.1.1	Endogene Transporter in <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten .....	59
4.1.2	<i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten als Expressionsmodell.....	61
4.2	Vergleich der Einflüsse der <i>sgk</i> auf hNaDC3 und rNaDC1 .....	63
4.3	Einfluss von Lithium .....	64
4.3.1	Medizinische Anwendung von Lithium .....	64
4.3.2	Lithiumergebnisse des hNaDC3 im Vergleich zum hNaDC1.....	65
4.4	Relevanz des hNaDC3 und der <i>sgk</i> im Alterungsprozess .....	66
4.4.1	Einfluss des hNaDC3 auf den Alterungsprozess.....	66
4.4.2	Einfluss der <i>sgk</i> auf den Alterungsprozess.....	68
5	Zusammenfassung .....	69
6	Literaturverzeichnis.....	70

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Nephrons .....	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Querschnittes des proximalen Tubulus .....	10
Abbildung 3: Aminosäuresequenz des humanen NaDC3-Transporters.....	16
Abbildung 4: Strukturmodell des hNaDC3 .....	16
Abbildung 5: Stammbaum der Kinaseklassen.....	20
Abbildung 6: Elektrophysiologischer Messplatz .....	30
Abbildung 7: Elektrophysiologischer Messplatz (vergrößert) .....	30
Abbildung 8: Ersatzschaltbild der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme .....	31
Abbildung 9A-B: Darstellung des DMZ-Universal-Pullers.....	32
Abbildung 10A-B: Entnahme der Ovarläppchen .....	33
Abbildung 11: Entnommene Ovarläppchen .....	34
Abbildung 12A-B: Oozytenstadien nach Dumont .....	35
Abbildung 13A-D: Injektion der cRNA in die <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyte.....	37
Abbildung 14: Geräteaufbau zur Registrierung der Messwerte .....	39
Abbildung 15A-B: Tierhaltung .....	41
Abbildung 16A-B: I-V-Kennlinie hNaDC3-Oozyten .....	43
Abbildung 17A-B: I-V-Kennlinie Wasser-Oozyten.....	44
Abbildung 18A-B: I-V-Kennlinie hNaDC3+sgk1-Oozyten .....	45
Abbildung 19A-B: I-V-Kennlinie sgk1-Oozyten.....	46
Abbildung 20: Zusammenfassung der Abbildungen 16 - 19.....	47
Abbildung 21: Aufnahme des [ <sup>14</sup> C]-markierten Succinates (sgk1).....	48
Abbildung 22A-D: Natriumabhängigkeit der sgk1 .....	50
Abbildung 23A-D: Lithiumabhängigkeit der sgk1 .....	51
Abbildung 24A-B: I-V-Kennlinie hNaDC3-Oozyten .....	52
Abbildung 25A-B: I-V-Kennlinie hNaDC3+sgk3-Oozyten .....	53
Abbildung 26A-B: I-V-Kennlinie sgk3-Oozyten.....	53
Abbildung 27: Zusammenfassung der Abbildungen 24 - 26.....	54
Abbildung 28: Aufnahme des [ <sup>14</sup> C]-markierten Succinates (sgk3).....	55
Abbildung 29A-D: Natriumabhängigkeit der sgk3 .....	57
Abbildung 30A-B: Lithiumabhängigkeit der sgk3.....	58

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der 52 <i>solute carrier</i> -/ SLC-Transporter .....	11
Tabelle 2: SLC13-Transporterfamilie und analoge Bezeichnungen .....	12
Tabelle 3: Expression des SLC13 in unterschiedlichen Geweben .....	12
Tabelle 4: Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen hNaDC1 und hNaDC3.....	15
Tabelle 5: Substratspezifität des hNaDC3.....	17
Tabelle 6: Enzymklassen.....	18
Tabelle 7: Regulation von Transportproteinen durch die <i>sgk1</i> .....	23
Tabelle 8: Regulation von Transportproteinen durch die <i>sgk3</i> .....	24
Tabelle 9: Geräteliste.....	27
Tabelle 10: Verwendete Chemikalien .....	28
Tabelle 11: Rezept der Oozyten-Ringer-Lösung (ORi) .....	28
Tabelle 12: Affinität und maximale Transportrate <i>sgk1</i> .....	48
Tabelle 13: Überprüfung der Natriumabhängigkeit <i>sgk1</i> .....	49
Tabelle 14: Affinität und maximale Transportrate <i>sgk3</i> .....	56
Tabelle 15: Überprüfung der Natriumabhängigkeit <i>sgk3</i> .....	56
Tabelle 16: Endogene Transportsysteme der <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten .....	59
Tabelle 17: Ruhemembranpotentiale der Stadien V und VI nach Dumont.....	62
Tabelle 18: Intrazelluläre Ionenkonzentrationen von Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> und Cl <sup>-</sup> .....	62

## Abkürzungsverzeichnis

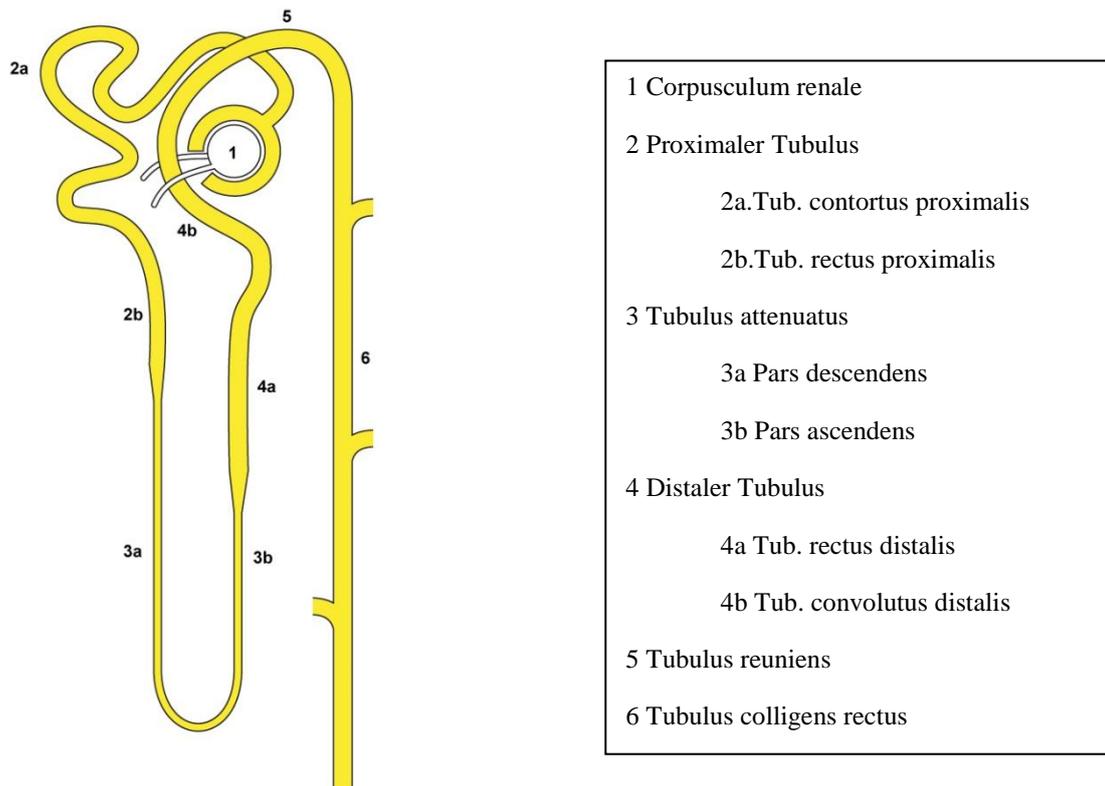
$\alpha$ KG	alpha-Ketoglutarat
ATP	Adenosintriphosphat
<i>C. elegans</i>	Caenorhabditis elegans
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cRNA	<i>complementary</i> RNA
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethanolulfonat
hNaDC3	humaner Natrium-abhängiger Dikarboxylat-Transporter 3
$\Delta I$	Differenzstrom
IEG	<i>immediate early gene</i>
Indy	Akronym für: <i>I am not dead yet</i> (Noch bin ich nicht tot)
$K_i$	Inhibitionskonstante
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
NMDG	<i>N</i> -Methyl-D-Glucamin
OA	organische Anionen
OAT	organische Anionen-Transporter
ORi	Oozyten-Ringer, Kontrolllösung
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase 1
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
rNaDC1	NaDC1 der Ratte
sgk	Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase
SLC	<i>solute carrier</i>
Succ	Succinat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
$V_c$	Klemmpotential
$V_{max}$	Maximalgeschwindigkeit

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau und Funktion der Nieren

Der menschliche Körper vollzieht unentwegt die verschiedensten Stoffwechselprozesse. Hierbei entstehen Endprodukte, die durch die Lungen abgeatmet (Kohlendioxid) oder über die Galle, den Darm und die Nieren ausgeschieden werden. Die Nieren (Niere: lat. ren, griech. nephros) haben neben dem Ausscheiden harnpflichtiger Substanzen oder Medikamente noch eine regulatorische Funktion bezüglich des Wasser-, Elektrolyt-, Mineral- und Säuren-Basen-Haushaltes (Pape et al. 2014). Diese regulatorischen Aufgaben erklären den komplexen Aufbau der Nieren. Die Nieren sind ein paarig angelegtes Organ, das sich im Retroperitonealraum (Spatium retroperitoneale) in den Fossae lumbales auf Höhe des 12. Brustwirbel- bis zum 3. Lendenwirbelkörper befinden. Um in dieser Lage zu verbleiben und nicht Beckenwärts zu wandern, ist jede Niere in einer Fettkapsel (Capsula adiposa) und einem Faszien­sack (Fascia renalis) eingebettet. Das Nierenparenchym ist von einer geflechtartigen und straffen Bindegewebskapsel (Capsula fibrosa) umgeben. Die einzelne Niere besitzt eine bohnenförmige Form mit einem Gewicht von 120 bis 300 Gramm. Das einzelne Organ hat eine Länge von 10 – 12 cm, eine Breite von 5 – 6 cm und eine Dicke von etwa 4 cm. An der medialen Seite befindet sich eine zentrale Einziehung, das Hilum renale, in die Nerven und Arterien eintreten und Venen, Lymphgefäße und der Ureter austreten (Fritsch und Kühnel 2003). Im Nierenparenchym lassen sich zwei Bereiche unterscheiden. Im äußeren Bereich befindet sich der Kortex, der sich als dunkle Rinde darstellt. Im inneren Bereich liegt die Medulla. Diese ist das hellere gestreifte Mark. Jede Niere besteht aus etwa 1 bis 1,5 Millionen Nephronen, die in ihrem Aufbau stets identisch sind. Es beginnt mit dem Nierenkörperchen (Corpusculum renale/ Glomerulus) und setzt sich mit dem Tubulussystem fort. Das Tubulussystem wird in vier Abschnitte unterteilt. In den proximalen, intermediären und distalen Tubulus. Darauf folgt ein Verbindungstubulus, Tubulus reuniens. Mehrere Tubuli münden in ein gemeinsames Sammelrohr. Der proximale Tubulus wird seinerseits in zwei Abschnitte unterteilt. Der erste Abschnitt ist der längere Abschnitt, liegt in gewundener Form vor und befindet sich überwiegend im Cortex. Sein zweiter Abschnitt ist die Pars recta. Die Pars recta des proximalen Tubulus (Abb. 1; 2b), der intermediäre Tubulus (Abb. 1; 3a,b) und die Pars recta des distalen Tubulus (Abb. 1; 4b) bilden die Henle-Schleife. Die Wand des proximalen Tubulus besteht aus kubischem bis hochprismatischem Epithel. Die Zellen weisen große, runde, euchromatinreiche Kerne auf. In 24 Stunden bilden die Nieren eines

gesunden Erwachsenen etwa 180 l Primärharn. Das heißt, dass die gesamte Extrazellulärflüssigkeit des Organismus etwa zehn Mal pro Tag der Kontrolle der Nieren unterworfen wird. Dem Tubulussystem gelingt es, dieses Ultrafiltrat auf den Endharn mit einem Volumen von etwa 1 bis 1,5 l Volumen zu konzentrieren.



### Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Nephrons

Ein Nephron besteht aus zwei funktionellen Einheiten, dem Nierenkörperchen (Corpusculum renale) und dem Harnkanälchensystem (Tubulus renalis); der Tubulus renalis lässt sich in verschiedene Abschnitte unterteilen, bis er über den Verbindungstubulus (Tubulus reuniens) in das Sammelrohr (Tubulus colligens rectus) mündet; hierbei kann ein Sammelrohr bis zu zehn Nephrene aufnehmen (modifiziert nach Fritsch und Kühnel 2003, S. 235; die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Thieme-Verlags).

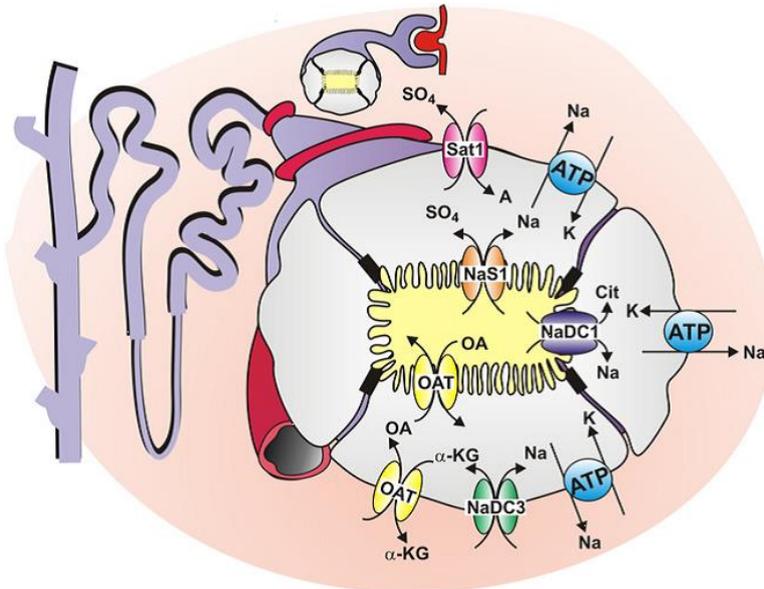
Der proximale Tubulus gilt als der Nephronabschnitt mit der größten Resorptionsleistung und dem größten Energieverbrauch. Am Ende des proximalen Tubulus sind circa 65% des Primärharns zurückresorbiert (Zhuo und Li 2013). Diese große Reabsorptionsleistung

gelingt den Nieren durch eine Vielzahl verschiedenster Membrantransporter. Die hierfür benötigte Energie wird durch eine große Anzahl an Mitochondrien gewährleistet, die in der Nähe der basolateralen Membran lokalisiert sind. Die Reabsorptionsmechanismen ähneln hierbei den Mechanismen anderer transportierender Epithelien, wie beispielsweise denen des Dünndarmes. Eine zentrale Aufgabe der Nieren ist die Exkretion anionischer Endprodukte des körpereigenen Stoffwechsels sowie die Entsorgung exogener Substanzen, wie beispielsweise Medikamente und Toxine. Im proximalen Tubulus erfolgt ein wichtiger Teil dieser direkten Ausscheidung. Die aktive transzelluläre Exkretion einiger organischer Anionen erfolgt über spezielle Transporter, die „Organischen Anionen Transporter (OATs)“. OAT1 (SLC22A6) und OAT3 (SLC22A8) sind basolateral lokalisiert und nehmen ein organisches Anion im Gegenzug zu einem Dikarboxylat, bevorzugt alpha-Ketoglutarat ( $\alpha$ KG), in die proximale Tubuluszelle auf (siehe Abbildung 2). Das Dikarboxylat wird durch die Natrium-abhängigen Dikarboxylat-Transporter 1 und 3 (NaDC1 und 3) bereitgestellt. Damit ist der hNaDC3 ein wichtiger Transporter in der Ausscheidung organischer Anionen (Dantzer 2002).

## 1.2 Transportsysteme der zellulären Membran

Beim Transport über die Zellmembran werden zwei Systeme grundsätzlich unterschieden: passiver und aktiver Transport. Der passive Transport läuft entlang eines Konzentrationsgefälles, beispielsweise entlang eines Ionengradienten zwischen intra- und extrazellulär. Der elektrochemische Gradient ist hierbei der Energielieferant. Hierfür dienen Proteine in Form von Ionenkanälen und Transportern. Der aktive Transport beschreibt Transportvorgänge, die in Gegenrichtung eines Konzentrationsgradienten erfolgen und hierfür eine Energiequelle benötigen. Beim aktiven Transport unterscheidet man drei verschiedene Mechanismen. Wird die Energiequelle direkt verbraucht, so spricht man von einem primär aktiven Transport. Ein bekanntes Beispiel ist die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase. Der sekundär aktive Transport koppelt einen thermodynamisch ungünstigen Transport gegen einen Konzentrationsgradienten mit einem Substrat, das in Richtung des Konzentrationsgradienten transportiert wird. Diesen Vorgang nennt man sekundär aktiven Transport, da kein direkter Verbrauch einer Energiequelle stattfindet, sondern in einem vorhergehenden Schritt Energie für den Aufbau des Konzentrationsgradienten verbraucht werden musste. Die dritte Form des aktiven Transportes ist der tertiär aktive Transport. Hierbei dient der

Konzentrationsgradient, der durch einen sekundär aktiven Transport aufgebaut wurde, als Antrieb (Pape et al. 2014).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Querschnittes des proximalen Tubulus**

Zu sehen ist das Lumen des proximalen Tubulus mit vier angeschnittenen Tubuluszellen. Der für die Natrium-abhängigen Transporter erforderliche Natriumgradient wird durch basolateral gelegene  $3\text{Na}^+-2\text{K}^+$ -ATPasen (blau) aufgebaut. Zu sehen ist der in dieser Arbeit relevante Natrium-Dikarboxylat-Transporter-3 (hNaDC3) (grün), der dank des Natriumgradienten im Kotransport drei  $\text{Na}^+$ -Ionen und ein alpha-Ketogluarat ( $\alpha\text{KG}$ ) transportiert. Das intrazellulär vorhandene  $\alpha\text{KG}$  wird über organische Anionen-Transporter (OATs, gelb) im Gegenzug mit einem organischen Anion ausgeschleust. Die OAT-Transporter sind somit tertiär aktive Transporter, wohingegen die  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -ATPase ein primär aktiver und der NaDC3 ein sekundär aktiver Transporter ist (Bergeron et al. 2013; die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags).

### 1.3 Natrium-Dikarboxylat-Transporter 3 (NaDC3)

#### 1.3.1 Der humane Natrium-Dikarboxylat-Transporter (hNaDC3/ SLC13A3) und weitere Mitglieder dieser Genfamilie

Der humane Natrium-Dikarboxylat-Transporter-3 (hNaDC3) gehört zur SLC-Genfamilie. Unter dem Begriff der SLC-Genfamilie (*solute carrier*-Familie) verbirgt sich eine

Einteilung von Membrantransportern, die von der Human Genome Organisation (HUGO) entwickelt wurde. Diese Liste umfasst im Jahr 2016 52 Transporterfamilien mit insgesamt circa 400 Transportern. Die folgende Tabelle (Tab. 1) zeigt die in dieser Liste verzeichneten Transporter (Stand Juli 2016).

**Tabelle 1: Liste der 52 *solute carrier*-/ SLC-Transporter**

HGNC= HUGO *Nomenclature Committee*; der in dieser Arbeit untersuchte hNaDC3 gehört zur Genfamilie SLC13 und ist rot hervorgehoben; die in Abb. 2 genannten OATs gehören zur Familie der SLC22 und sind ebenfalls rot hervorgehoben; die Liste wurde mir freundlicherweise vom Institut für Biochemie und Molekulare Medizin der Universität Bern unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Hediger zur Verfügung gestellt (modifiziert nach <http://slc.bioparadigms.org/>).

SLC1: High-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family	SLC27: Fatty acid transporter family
SLC2: Facilitative GLUT transporter family	SLC28: Na <sup>+</sup> -coupled nucleoside transport family
SLC3: Heavy subunits of the heteromeric amino acid transporters	SLC29: Facilitative nucleoside transporter family
SLC4: Bicarbonate transporter family	SLC30: Zinc efflux family
SLC5: Sodium glucose cotransporter family	SLC31: Copper transporter family
SLC6: Sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family	SLC32: Vesicular inhibitory amino acid transporter family
SLC7: Cationic amino acid transporter/glycoprotein-associated family	SLC33: Acetyl-CoA transporter family
SLC8: Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> exchanger family	SLC34: Type II Na <sup>+</sup> -phosphate cotransporter family
SLC9: Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger family	SLC35: Nucleoside-sugar transporter family
SLC10: Sodium bile salt cotransport family	SLC36: Proton-coupled amino acid transporter family
SLC11: Proton-coupled metal ion transporter family	SLC37: Sugar-phosphate/phosphate exchanger family
SLC12: Electroneutral cation-coupled Cl cotransporter family	SLC38: System A and System N sodium-coupled neutral amino acid transporter family
<b>SLC13: Human Na<sup>+</sup>-sulfate/carboxylate cotransporter family</b>	SLC39: Metal ion transporter family
SLC14: Urea transporter family	SLC40: Basolateral iron transporter family
SLC15: Proton oligopeptide cotransporter family	SLC41: MgtE-like magnesium transporter family
SLC16: Monocarboxylate transporter family	SLC42: Rh ammonium transporter family
SLC17: Vesicular glutamate transporter family	SLC43: Na <sup>+</sup> -independent, system-L-like amino acid transporter family
SLC18: Vesicular amine transporter family	SLC44: Choline-like transporter family
SLC19: Folate/thiamine transporter family	SLC45: Putative sugar transporter family
SLC20: Type III Na <sup>+</sup> -phosphate cotransporter family	SLC46: Folate transporter family
SLC21: Organic anion transporter family	SLC47: Multidrug and Toxin Extrusion (MATE) family
<b>SLC22: Organic cation/anion/zwitterion transporter family</b>	SLC48: Heme transporter family
SLC23: Na <sup>+</sup> -dependent ascorbic acid transporter family	SLC49: FLVCR-related transporter family
SLC24: Na <sup>+</sup> /(Ca <sup>2+</sup> -K <sup>+</sup> ) exchanger family	SLC50: Sugar efflux transporters
SLC25: Mitochondrial carrier family	SLC51: Transporters of steroid-derived molecules
SLC26: Multifunctional anion exchanger family	SLC52: Riboflavin transporter family RFVT/ SLC52

Die SLC13-Genfamilie umfasst fünf Transportproteine, die in zwei Gruppen unterteilt werden: die Natrium-Sulfat- (SLC13A1 und SLC13A4) und die Natrium-Dikarboxylat-Transporter (SLC13A2, SLC13A3 und SLC13A5). Für den NaDC3 sowie für die anderen Transporter dieser Familie finden sich in der Literatur vielfältige Bezeichnungen. Diese werden hier, um einen vollständigen Überblick zu erhalten, aufgeführt (Tab. 2). In der vorliegenden Dissertation verwende ich den populärsten Begriff, nämlich NaDC3. Die Benennung A1 bis A5 ergab sich durch die Reihenfolge ihrer Entdeckung (Pajor 2006). Diese Transporter finden sich nicht nur beim Menschen. So wurden Orthologe bei Wirbeltieren, wie Ratte, Kaninchen, Maus, aber auch bei Insekten, Pflanzen, Hefen und Bakterien, beispielsweise gramnegativen Bakterien und Cyanobakterien nachgewiesen (Markovich und Murer 2004).

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Mitglieder der SLC13-Genfamilie mit den bisherigen Erkenntnissen bezüglich der Spezies und dem Gewebe, in dem sie exprimiert werden, wobei der Nachweis teilweise über PCR- aber auch Antikörperstudien erfolgte.

**Tabelle 2: SLC13-Transporterfamilie und analoge Bezeichnungen**

Gen	Protein	International gebräuchliche Bezeichnungen
SLC13A1	NaS1/ NaSi-1	<i>Na<sup>+</sup>-dependent inorganic sulphate transporter-1</i>
SLC13A2	NaC1/NaDC1/SDCT1 NaDC2 ( <i>Xenopus</i> )	<i>low-affinity Na<sup>+</sup>-dependent dicarboxylate transporter-1</i>
SLC13A3	NaC3/NaDC3/SDCT2	<i>high-affinity Na<sup>+</sup>-dependent dicarboxylate transporter-3</i>
SLC13A4	NaS2/ SUT-1	<i>sulphate transporter-1</i>
SLC13A5	NaC2/ NaCT	<i>Na<sup>+</sup>-coupled citrate transporter, low-affinity Na<sup>+</sup>-carboxylate cotransporter, sodium-dependent transporter for citrate and dicarboxylate</i>

Tabelle 3: Expression des SLC13 in unterschiedlichen Geweben

Gen	Expression
SLC13A1	<p><b>Mensch:</b> Niere (Lee et al. 2000)</p> <p><b>Ratte:</b> Niere, Dünndarm (Markovich et al. 1993)</p> <p><b>Maus:</b> Niere, Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon, Caecum, Testes, Nebenniere, Fettgewebe (Beck und Markovich 2000)</p>
SLC13A2	<p><b>Mensch:</b> Niere, Darm (Pajor 1996)</p> <p><b>Ratte:</b> Dünndarm, Dickdarm, Niere, Leber, Lunge und Epididymus (Sekine et al. 1998; Chen et al. 1998)</p> <p><b>Maus:</b> Niere, Darm (Pajor und Sun 2000)</p> <p><b>Kaninchen:</b> Niere, Jejunum, Leber (Pajor 1995)</p> <p><b>Xenopus laevis:</b> Darm (Bai und Pajor 1997)</p>
SLC13A3	<p><b>Mensch:</b> Leber, Pankreas, Plazenta, Basolateralmembran der prox. Nierentubuluszelle, Gehirn (Wang et al. 2000)</p> <p><b>Ratte:</b> Niere, Leber, Gehirn, Plazenta (Chen et al. 1999; Kekuda et al. 1999)</p> <p><b>Maus:</b> Niere, Gehirn (Pajor et al. 2001)</p>
SLC13A4	<p><b>Mensch:</b> Plazenta, Tonsilliepithel, Testes, Herz (Girard et al. 1999)</p> <p><b>Ratte:</b> Gehirn, Leber (Pajor 2006; Dawson et al. 2005)</p>
SLC13A5	<p><b>Mensch:</b> Leber, Gehirn, Testes (Inoue et al. 2002a)</p> <p><b>Maus:</b> Leber, Gehirn, Testes (Inoue et al. 2002b)</p>

Die Proteine der SLC13-Genfamilie bestehen je nach Spezies aus 572 – 627 Aminosäuren (Markovich und Murer 2004) und besitzen zwischen 8 – 13 Transmembrandomänen. Die fünf Proteine stimmen in ihrer Proteinsequenz zu 40 – 50% überein (Pajor 2006). Ein weiteres gemeinsames Charakteristikum ist, dass sie alle als Natrium-gekoppelte Transporter dem Transport von Anionen, vorzugsweise Sulfat und Oxyanionen bzw. Di- und Trikarboxylaten, über die Zellmembran dienen. Sie transportieren im Symport Natriumionen, bevorzugt drei Natriumionen, mit einem divalent oder trivalent geladenen anionischen Substrat. Eine Ausnahme stellt der SLC13A5/ NaC2 dar, er transportiert vier Natriumionen mit einem trivalenten Anion (Pajor 2006). Aus dieser Stöchiometrie resultiert ein positives Nettoladungsplus nach intrazellulär. Es wird angenommen, dass die Bindung der Natriumionen vor der Bindung des Anions erfolgt (Pajor 2000). Für den

hNaDC1 wird dies wie folgt beschrieben: Zunächst findet die Bindung der drei Natriumionen statt, dadurch erfolgt eine Konformationsänderung des Transportproteins mit Auswirkungen auf die Substrataffinität. Nun folgt die Substratbindung mit einer weiteren Konformationsänderung, wodurch sich nun die Ionen und das Substrat intrazellulär befinden und freigesetzt werden (Pajor und Randolph 2005).

Die Natriumsulfat-Transporter (SLC13A1 und A4) bevorzugen Tetraoxyanionen (z.B. Sulfat, Selenat und Thiosulfat); die Natrium-Dikarboxylat-Transporter (SLC13A2, A3 und A5) präferieren Krebszyklus-Zwischenstufen wie Mono-, Di- und Trikarboxylate (z.B. Succinat, Citrat,  $\alpha$ KG). Die einzelnen Orthologe zeigen Unterschiede in der Substrataffinität. So kann man nicht sagen, dass der NaDC3 bei allen Spezies, ob nun Mensch, Ratte oder Pflanze, die gleiche Substrataffinität zu den Kosubstraten wie Succinat,  $\alpha$ KG oder Citrat aufweist (Pajor 2006; Bergeron et al. 2013).

### 1.3.2 NaDC3 versus NaDC1

Der NaDC1-Transporter wurde vor dem NaDC3-Transporter entdeckt. Beide transportieren jeweils drei Natriumionen im Symport mit einem Dikarboxylat und stimmen in ihrer Proteinsequenz zu 43% überein. Sie unterscheiden sich zum einem in ihrer Lokalisation in der Zelle des proximalen Tubulus sowie in ihrer Affinität zum Dikarboxylat. Der NaDC1 wird in der luminalen Membran exprimiert und ist ein wichtiger Bestandteil in der Regulation der Citratkonzentration des Urins (Yao und Pajor 2000). Citrat dient als Chelator für Calcium. Eine Hypocitraturie gilt als Risikofaktor für die Entwicklung von Nierensteinen (Pak 1991). Der NaDC3 ist in der basolateralen Membran lokalisiert und dient, wie bereits erwähnt, der Bereitstellung von Dikarboxylaten, die für die Exkretion organischer Anionen erforderlich sind. Die  $K_m$  für Succinat liegt beim NaDC1 speziesabhängig zwischen 0,3 und 1 mM und so entstand der ebenfalls gebräuchliche Begriff „niedrigaffiner Dikarboxylat-Transporter“. Die  $K_m$  für Succinat liegt beim NaDC3 speziesabhängig zwischen 10 und 140  $\mu$ M und so entstand die Bezeichnung „hochaffiner Dikarboxylat-Transporter“. In einer Studie aus dem Labor des Instituts für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie konnten  $K_{0,5}$ -Werte für Succinat von  $25 \pm 16$   $\mu$ M und für  $\alpha$ KG von  $43 \pm 13$   $\mu$ M ermittelt werden (Burckhardt et al. 2004). Diese Werte liegen im Bereich der Plasmakonzentrationen für Succinat und  $\alpha$ KG, die der Literatur nach zu 10 und 40  $\mu$ M bestimmt wurden. Die wichtigsten Eigenschaften und Unterschiede zwischen NaDC1 und NaDC3 sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4: Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen hNaDC1 und hNaDC3**

(TMD: Transmembrandomänen, AS: Aminosäuren)

	<b>hNaDC1 (SLC13A2)</b>	<b>hNaDC3 (SLC13A3)</b>
Chromosom	17p11.1 - q11.1	20q12 - 13.1
Expressionsgewebe	Nieren, Darm	Nieren, Plazenta, Gehirn, Leber, Pankreas
Lokalisation in den Nieren	Luminale Membran proximaler Tubuli	basolaterale Membran proximaler Tubuli
Protein	592 AS, 11 TMD, <i>N</i> -Glycosylierungs- und PKC- <i>sites</i>	602 AS, 11 TMD, <i>N</i> -Glycosylierungs-, PKC-, PKA- und PKG- <i>sites</i>
Transport-Modus	3 Na <sup>+</sup> und 1 zweiwertiges Succinat	3 Na <sup>+</sup> und 1 zweiwertiges Succinat ( $\alpha$ -Ketoglutarat)



Im Jahr 2004 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um BC Burckhardt Ergebnisse zur Substrataffinität von hNaDC3. Daraus folgte die Vermutung, dass das natürliche Substrat des Transporters höchstwahrscheinlich  $\alpha$ KG ist. Die Untersuchungen dieser Doktorarbeit erfolgten daraus resultierend mit dem Substrat  $\alpha$ KG und nicht mit dem so häufig verwendeten Succinat. Eine weitere Untersuchung, durchgeführt durch Kaufhold und Kollegen im Jahr 2011, konnte zeigen, dass für das Transportsystem, bestehend aus NaDC3, OAT1 und OAT3, eine gemeinsame hohe Affinität für  $\alpha$ KG besteht (Kaufhold et al. 2011), so dass man vermuten kann, dass  $\alpha$ KG das bevorzugte Substrat ist.

**Tabelle 5: Substratspezifität des hNaDC3**

(nach Burckhardt 2004);  $K_{0.5}$  ist die Substratkonzentration, bei der die halb-maximalen Ströme erreicht werden,  $\Delta I_{max}$  ist der Substrat-induzierbare Strom bei gesättigter Substratkonzentration. Der Quotient  $\Delta I_{max}/K_{0.5}$  beschreibt die Transporteffizienz eines Transporters für ein bestimmtes Substrat. Je höher der Quotient, um so effizienter arbeitet der Transporter.

<b>Substrat</b>	<b><math>K_{0.5}</math>, <math>\mu</math>M</b>	<b><math>\Delta I_{max} / K_{0.5}</math>, nA/<math>\mu</math>M</b>
<b>Succinat</b>	<b>25<math>\pm</math>16</b>	<b>1.38<math>\pm</math>0.56</b>
<b>Glutarat</b>	<b>40<math>\pm</math>12</b>	<b>1.23<math>\pm</math>0.33</b>
<b>alpha-Ketoglutarat</b>	<b>45<math>\pm</math>13</b>	<b>0.63<math>\pm</math>0.20</b>

## 1.4 Serum- und Glukokortikoidkinase (sgk) 1 und 3

### 1.4.1 Einleitung

Seit der Entdeckung der Serum- und Glukokortikoidkinasen (sgk) wurde festgestellt, dass diese Kinasen an zahlreichen unterschiedlichen physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen beteiligt sind. Dazu zählen der Metabolismus, die Nierenfunktion und der Salzappetit sowie gastrointestinale, kardiovaskuläre und neuromuskuläre Funktionen. Weiterhin beeinflussen sie Epithel-assoziierte Erkrankungen, Tumorwachstum, Hypertonie, neuronale Erkrankungen, Fibrose-assoziierte Erkrankungen und die Ischämie. Zahlreiche Forschungsgruppen untersuchen die genauen Mechanismen. Ein wichtiges Ziel ist es hierbei, neue Ansatzpunkte zur therapeutischen Behandlung diverser Erkrankungen zu entwickeln.

Entdeckt wurde das Gen, kodierend für die *sgk1*, erstmals 1993 von Webster und Kollegen (Webster et al. 1993a/b). In diesem Screening wurde die Tumorzelllinie des Brustgewebes einer Ratte auf Glukokortikoid-induzierbare Transkripte untersucht. Die menschliche Isoform wurde als ein durch Zellschrumpfung hochreguliertes Gen 1997 von Waldegger und Kollegen entdeckt. Im weiteren Verlauf wurden zwei weitere Isoformen gefunden, *sgk2* und *sgk3*, die in der Aminosäuresequenz ihrer katalytischen Domäne mit der *sgk1* in etwa 80% übereinstimmen (Kobayashi et al. 1999). Die *sgk3* ist identisch mit CISK (*cytokine-independent survival kinase*) (Liu et al. 2000).

Das für die *sgk1* kodierende Gen befindet sich auf dem Chromosom 6q23 (Waldegger et al. 1998), das *sgk2*-Gen auf Chromosom 20q12 (Lang und Cohen 2001). Auf dem Chromosom 8q12.3 befindet sich ein *SGK-like* Gen (SGKL), das für ein Protein kodiert, das in der Aminosäuresequenz mit der *sgk3* übereinstimmt (Dai et al. 1999; Lang et al. 2006). Bei den Enzymen hat sich die EC-Klassifikation (Enzyme Commission Numbers) der Enzymkommission der International Union of Biochemistry (IUB) etabliert. Hier werden die Enzyme je nach ihrer Funktion einer der sechs Enzymklassen zugeordnet und anschließend in weitere Untergruppen unterteilt.

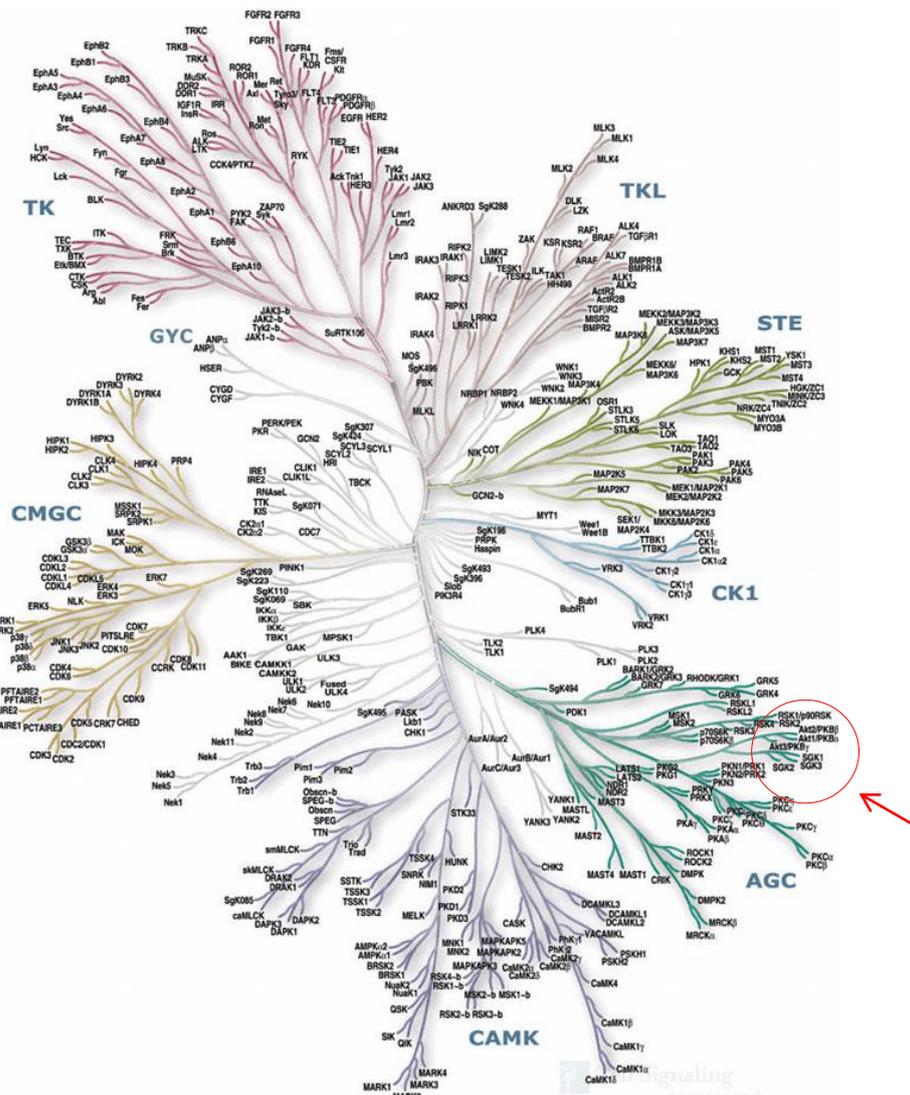
**Tabelle 6: Enzymklassen**

(modifiziert nach Berg et al., 2014: S. 253f und nach der International Union of Biochemistry).

Enzymklasse	Bezeichnung	Aufgabe/ Katalysierung
EC 1	Oxidoreduktase	Redoxreaktion
EC 2	Transferase	Übertragung einer funktionellen Gruppe
EC 3	Hydrolasen	hydrolytische Spaltung
EC 4	Lyasen	nicht-hydrolytische Addition oder Eliminierung von Molekülgruppen
EC 5	Isomerasen	intramolekulare Umwandlung, z.B. Isomerisierung
EC 6	Ligasen	kovalente Verknüpfung mittels energiereicher Kofaktoren

Bei *sgk1* und *3* handelt es sich um Phosphotransferasen. Sie übertragen eine Phosphatgruppe an das Zielprotein. Dies entspricht der Enzymklasse EC 2.7. Durch die Übertragung einer Phosphatgruppe an ein Protein wird dessen Funktionalität beeinflusst.

Die Regulation enzymatischer Aktivität durch die Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren wurde in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts entdeckt. Untersucht wurde damals die Synthese und der Abbau des Glykogens in der Leber (Sutherland und Wosilait 1955). Die erste Proteinkinase, die gereinigt und charakterisiert wurde, war das Enzym Phosphorylase-Kinase (Krebs et al. 1959). Heute sind etwa 518 Proteinkinasen bekannt, die in verschiedene Untergruppen systematisch eingeordnet werden. Sgk1, -2 und -3 gehören zu den AGC-Kinasen. Der Begriff der AGC-Kinasen wurde durch die Wissenschaftler Hanks und Hunter im Jahre 1995 geprägt, aufgrund der Sequenzähnlichkeit der katalytischen Domäne zur PKA, PKG und PKC. 60 der 518 bekannten Proteinkinasen fallen unter die Subgruppe der AGC-Kinasen. Die sgk1 und sgk3 zeigen im Vergleich zur sgk2 eine breitere Gewebeverteilung. Allerdings unterscheiden sich die Transkriptniveaus zwischen den verschiedenen Gewebetypen, wie beispielsweise Gehirn-, Augen-, Lungen- oder Nierengewebe (Lang et al. 2003). Laut Lang et al. (2006) ist die Expression der sgk1 im proximalen Tubulus der gesunden Niere gering. Nichtsdestotrotz ist sie ein wichtiges Regulativ in den verschiedenen Stoffwechselprozessen. Die Stärke der sgk1-Expression scheint durch Mineralo- und Glukokortikoide beeinflusst zu werden, während die sgk3 unabhängig gleichmäßig exprimiert wird (Grahammer et al. 2006). Die subzelluläre Verteilung der sgk1 ist unterschiedlich. So konnte sgk1 im Nukleus, im Zytoplasma und an der Plasmamembran lokalisiert werden (Alliston et al. 2000; Coric et al. 2004; Buse et al. 1999; Pearce 2001; Maiyar et al. 2003). Es wird vermutet, dass die Lokalisation hierbei abhängig von der jeweiligen Signalkaskade bzw. vom jeweiligen Stimulus ist (Loffing et al. 2006).



**Abbildung 5: Stammbaum der Kinaseklassen**

Der Pfeil weist auf die in dieser Doktorarbeit untersuchten sgks hin. Die sgk1, -2 und -3 gehören zu den AGC-Kinasen. Der Begriff der AGC-Kinasen wurde durch die Wissenschaftler Hanks und Hunter im Jahre 1995 geprägt aufgrund der Sequenzähnlichkeit der katalytischen Domäne zur PKA, PKG und PKC. 60 der 518 bekannten Proteinkinasen fallen unter die Subgruppe der AGC-Kinasen.

Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung durch Cell Signaling Technology (<http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=kinases-human-protein>).

### 1.4.2 Regulation der sgk

Die sgks und besonders die sgk1 werden durch eine Vielzahl von Signalmolekülen streng reguliert. Ansatzpunkte sind hierbei:

1. das Expressionsniveau bzw. die Expressionshöhe,
2. die Kinaseaktivität und
3. die subzelluläre Lokalisation (Loffing et al. 2006).

Die Regulation der Transkription des *sgk1*-Gens wurde ausführlich studiert. In der Promotorregion der *sgk1* zeigen sich Ansatzpunkte für verschiedene Regulatoren. Es gibt mehrere Bindungsstellen für Glukokortikoide sowie einzelne Bindungsstellen für p53, das *Sp1-responsive DNA element*, das *cAMP-responsive element binding*-Protein und Mineralokortikoide (Webster et al. 1993b; Itani et al. 2002; Maiyar et al. 1997). Über die genomische Regulation der *sgk2* und *sgk3* ist bisher nur wenig bekannt (Lang et al. 2006). *Sgk1* wird induziert durch eine Vielzahl an Stimuli. Diese beinhalten Glukokortikoide (Webster et al. 1993b; Leong et al. 2003), Serum (Webster et al. 1993b), Aldosteron (Chen et al. 1999; Náráy-Fejes-Tóth et al. 1999), Zellschrumpfung (Waldegger et al. 1997; Wárntges et al. 2002), Zellschwellung (Rozansky et al. 2002), TGF- $\beta$  (Waldegger et al. 1999), chronische virale Hepatitis (Fillon et al. 2002), Vitamin D3 (Akutsu et al. 2001), Glukose (Khan et al. 2005), oxidativer Stress (Leong et al. 2003) und Follikelstimulierendes Hormon (FSH) (Alliston et al. 1997). Viele dieser Stimuli sind sehr zellspezifisch, so zum Beispiel für Aldosteron, das nur an Aldosteron-sensitiven Epithelien einen stimulierenden Effekt auf die *sgk1* Expression besitzt (Loffing et al. 2006).

#### 1.4.3 Regulation der *sgk*-Aktivität

Die *sgks* bedürfen einer Phosphorylierung, um in den aktiven Zustand überzugehen. Dies ist bislang ausführlich für die *sgk1* untersucht. Die Ergebnisse zur Regulierung der Aktivität der *sgk2* und *sgk3* sind rar. Regulation der *sgk1*: Dies geschieht durch eine Signalkaskade über die PI3-Kinase, die 3-phosphoinositid(PIP3)-abhängige Kinase PDK1 und eine bis jetzt unidentifizierte, aber ebenfalls PIP3-abhängige Kinase, die als PDK2 oder *hydrophobic motif* (H-motif)-Kinase bezeichnet wird (Lang et al. 2006). Die maximale Stimulierung der *sgk1*-Aktivität bedarf der PDK1-abhängigen Phosphorylierung an 256Thr innerhalb des Aktivierungsloops (T-loop) und die Phosphorylierung an 422Ser im hydrophoben Motiv am COOH-Terminus durch die PDK2/ H-Motiv-Kinase (Kobayashi und Cohen 1999; Kobayashi et al. 1999; Park et al. 1999). Über die PI3-Signalkaskade wird die *sgk1* durch Insulin (Kobayashi und Cohen 1999; Perrotti et al. 2001), IGF-I (Hayashi et al. 2001; Kobayashi und Cohen 1999; Kumari et al. 2001), hepatischem

Wachstumsfaktor (HGF) (Shelly und Herrera 2002) und das Follikel-stimulierende Hormon (FSH) (Richards et al. 2002) aktiviert. Weiterhin kann sgk1 durch *bone marrow kinase*, die extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 5 (BK/ ERK5) oder durch p38 $\alpha$  aktiviert werden. Diese Kinasen phosphorylieren sgk1 nicht an 256Thr, sondern an 78Ser, was sich außerhalb der katalytischen Domäne befindet (Hayashi et al. 2001; Meng et al. 2005). Wie diese Phosphorylierung zur Aktivität führt ist bisher unbekannt. Weiterhin kann sgk1 über einen Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration mit subsequenter Aktivierung der Calmodulin-abhängigen Proteinkinase ((CaMKK) (Imai et al. 2003)), small G-Protein Rac1 (Shelly und Herrera 2002), neuronale Depolarisation (Kumari et al. 2001), cAMP (Kumari et al. 2001; Perrotti et al. 2001; Thomas et al. 2004), Lithium (Kumari et al. 2001), Oxidation (Kobayashi und Cohen 1999; Prasad et al. 2000) und Adhäsion von Fibronectin (Shelly und Herrera 2002) aktiviert werden. Sgk2 und sgk3 werden ebenfalls durch Oxidation, Insulin und IGF-I über Signalkaskaden aktiviert, die die PI3-Kinase sowie die PDK1 und PDK2/H-Motiv Kinase beinhalten (Kobayashi und Cohen 1999; Virbasius et al. 2001).

#### 1.4.4 Rolle der sgk in der Regulation der molekularen und zellulären Funktion

Wurden die Serum- und Glukokortikoidkinasen (sgks) aufgrund einer Signalkaskade aktiviert, spielen sie durch die nun folgende Phosphorylierung der Zielproteine eine wichtige Rolle in der Regulation der molekularen und zellulären Funktion. So weiß man bisher über ihren Einfluss auf den epithelialen Transport via Phosphorylierung von Ionenkanälen, Transportern und Pumpen nur relativ wenig. Weiterhin sind regulative Einflüsse auf die Enzymaktivität, auf verschiedene Transkriptionsfaktoren und auf die Hormonausschüttung bekannt. Darüber hinaus konnte man feststellen, dass die sgks in die Regulation des Zellvolumens, der Zellproliferation und -apoptose eingebunden sind. Ihre Aufgabe nehmen sie dadurch wahr, dass sie Bestandteil einzelner Signalkaskaden sind (Loffing et al. 2006) oder Zielproteine direkt phosphorylieren und in ihrer Aktivität beeinflussen. Die folgenden Tabellen 7 und 8 geben eine Übersicht über alle bisher untersuchten Transporter, die durch sgk1 und sgk3 reguliert werden.

**Tabelle 7: Regulation von Transportproteinen durch die *sgk1***

angegeben sind die zuletzt erschienenen Übersichtsarbeiten (nach Loffing et al. 2006; Lang et al. 2006; Lang et al. 2009a)

TRANSPORTPROTEIN/ FUNKTION	REFERENZ
Epithelialer Na <sup>+</sup> -Kanal (ENaC)	Lang et al. 2006
Renaler epithelialer Ca <sup>2+</sup> -Kanal (TRPV5)	Lang et al. 2006
Epithelialer Ca <sup>2+</sup> -Kanal (TRPV6)	Boehmer et al. 2007
Na <sup>+</sup> -Kanal (SCN5A)	Lang et al. 2006
NaCl-Kotransporter (NCC)	Fejes-Toth et al. 2008
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup> -Kotransporter (NKCC2)	Lang et al. 2006
Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup> -Austauscher (NHE3)	Yun et al. 2002
Na <sup>+</sup> -Dikarboxylat-Transporter (NaDC1)	Boehmer et al. 2004a
Na <sup>+</sup> -Myoinositol-Kotransporter (SMIT)	Klaus et al. 2008
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase	Lang et al. 2006
K <sup>+</sup> -Kanal ROMK1	Lang et al. 2006
KCNE1/KCNQ1	Embark et al. 2003
KCNQ4	Seebohm et al. 2005
Kv1.3	Lang et al. 2006
Kv1.5	Boehmer et al. 2008a
Kv4.3	Baltaev et al. 2005
Cl <sup>-</sup> -Kanal CIC-K <sub>a</sub> /Barttin	Embark et al. 2004a
CIC2	Palmada et al. 2004b
Kationen-Kanal (4F2/LAT)	Wagner et al. 2000a
Glucose-Transporter SGLT1	Dieter et al. 2004
GLUT1	Palmada et al. 2006
GLUT4	Jeyaraj et al. 2007
Glutamin-Transporter (SN1)	Lang et al. 2006
Glutamat-Rezeptor (GluR6)	Strutz-Seebohm et al. 2005b
Aminosäure-Transporter EAAT1	Boehmer et al. 2003a
EAAT2	Boehmer et al. 2006
EAAT3	Schniepp et al. 2004
EAAT4	Boehmer et al. 2004b
EAAT5	Boehmer et al. 2005

Aminosäure-Transporter ASCT2	Jeyaraj et al. 2007
Peptid-Transporter (PepT2)	Boehmer et al. 2008a/b
Kreatinin-Transporter (CreaT)	Shojaiefard et al. 2005
Phosphat-Transporter (NaPi1b)	Lang et al. 2006
säuresensitiver Ionen-Kanal (ASIC1)	Arteaga et al. 2008
Volumen-sensitiver Osmolyt- und Anionenkanal (VSOAC)	Lang et al. 2006
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)	Wagner et al. 2001

**Tabelle 8: Regulation von Transportproteinen durch die *sgk3***

angegeben sind die zuletzt erschienenen Übersichtsarbeiten (nach Loffing et al. 2006; Lang et al. 2006; Lang et al. 2009a)

TRANSPORTPROTEIN/ FUNKTION	REFERENZ
Kaliumkanäle	Gamper et al. 2002; Henke et al. 2004
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase	Henke et al. 2002
Glutamat-Transporter (EAAT1)	Boehmer et al. 2003a
kardialer spannungsgesteuerter Na <sup>+</sup> -Kanal (SCN5A)	Boehmer et al. 2003b
Epithelialer Na <sup>+</sup> -Kanal (ENaC)	Friedrich et al. 2003
Na <sup>+</sup> -Dikarboxylat-Transporter (NaDC1)	Boehmer et al. 2004a
Cl <sup>-</sup> -Kanal CIC-K <sub>a</sub> /Barttin	Embark et al. 2004a
CIC2	Palmada et al. 2004b
Epithelialer Ca <sup>2+</sup> -Kanal (TRPV5)	Embark et al. 2004b
K <sup>+</sup> -Kanal KCNE1/KCNQ1	Embark et al. 2003
Kv1.3	Lang et al. 2006
Kv1.5	Boehmer et al. 2008a
Kv4.3	Baltaev et al. 2005
Na <sup>+</sup> -Phosphat-Kotransporter (NaPi1b)	Palmada et al. 2004a
Aminosäure-Transporter (ASCT2)	Palmada et al. 2005
Glutamat-Rezeptor GluR1	Strutz-Seebohm et al. 2005a
Kreatinin-Transporter (CreaT)	Shojaiefard et al. 2005

#### 1.4.5 Molekulare Funktionsmechanismen der sgk

Die Einflüsse der sgk auf den epithelialen Natrium-Kanal (ENaC) gehören zu den bisher am besten erforschten. Aufgrund dessen möchte ich an diesem Beispiel einen Teil der bisher bekannten Funktionsmechanismen der sgk erläutern. Experimente in heterologen Expressionssystemen zeigten, dass die Koexpression von ENaC und sgk1 eine erhebliche Steigerung der Aktivität des ENaC zur Folge hat (Chen et al. 1999; Náráy-Fejes-Tóth et al. 1999). Sgk2 und sgk3 stimulieren ebenfalls den ENaC (Friedrich et al. 2003). Der stimulierende Effekt der sgk1 auf den ENaC geht hierbei auf drei Mechanismen zurück. Erstens wurde festgestellt, dass sgk1 die ENaC-Transkription stimuliert (Boyd und Náráy-Fejes-Tóth 2005). Weiterhin führt die sgk1 zu einem erhöhten ENaC-Proteinanteil in der Plasmamembran über den Umweg der Nedd4-2-Phosphorylierung (Lang et al. 2000; Debonneville et al. 2001; Loffing et al. 2001; Alvarez de la Rosa et al. 1999). Sgk1 (Lang et al. 2006) und sgk3 (Palmada et al. 2004b) sind in der Lage, die Ubiquitinligase Nedd4-2 zu phosphorylieren. Nedd4-2 ubiquitiniert Kanal- und Transportproteine, um sie für die Entfernung von der Zellmembran zu markieren bzw. vorzubereiten. Das phosphorylierte Nedd4-2 ist durch die Phosphorylierung an 14-3-3 gebunden und damit nicht mehr in der Lage, seine Zielproteine zu ubiquitieren (Bhalla et al. 2005; Ichimura et al. 2005; Liang et al. 2006; Nagaki et al. 2006). Dadurch kommt es beispielsweise zu einer erhöhten Expression des Transportproteins an der Zellmembran und zu einer gesteigerten Transportaktivität. Zuletzt wurde festgestellt, dass es zu einer Aktivierung bereits in der Membran vorhandener ENaC-Kanäle kommen kann (Diakov und Korbmacher 2004; Vuagniaux et al. 2002).

## 1.5 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung der humanen Kinasen *sgk1* und *sgk3* auf den humanen Natrium-Dikarboxylat-Transporter-3 (*hNaDC3*) untersucht.

Wie bereits am *ENaC* exemplarisch dargestellt, besitzen die ubiquitär exprimierten *sgks* die Fähigkeit, intrazelluläre Transportvorgänge zu beeinflussen. Boehmer und Kollegen untersuchten die Einflüsse der *sgk1* und *sgk3* auf den *NaDC1* der Ratte (Boehmer et al. 2004a). In Anlehnung daran folgt nun die Untersuchung am *NaDC3*; abweichend zu Boehmer am humanen Orthologen. Zur Untersuchung werden elektrophysiologische Messmethoden und Tracer-Aufnahme-Untersuchungen am Expressionsmodell *Xenopus laevis* angewendet.

Darüber hinaus finden Untersuchungen in An- und Abwesenheit von Lithium statt. Diese Untersuchungen sind von Bedeutung, da bei einigen psychiatrischen Erkrankungen eine Medikation mit Lithiumsulfat oder -carbonat (bspw. Lithioflor oder Quilonum ret.) indiziert ist. Lithium wird hierbei über die Nieren ausgeschieden. Bei einer Überdosierung wurden nephrotoxische Nebenwirkungen beobachtet, deren Ätiologie bislang noch unbekannt ist.

Abschließend wird zu neueren Forschungsergebnissen Stellung genommen, die sich mit der Lebensspanne von Organismen befassen. Es konnte gezeigt werden, das nahe Verwandte des *NaDC3* und der *sgk* hier einen Einfluss haben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräteliste

Tabelle 9: Geräteliste

Gerät	Hersteller/ Bezugsquelle	Modellbezeichnung
Borosilikatglaskapillaren, Sodaklarglas	BioMedical Instruments, Deutschland	Innendurchmesser/ Wandstärke 0,8/ 0,1 mm
DMZ-Universal-Puller	Narishige, Japan	Typ PE-2
Elektrodenhalter Spannung	Warner Instrument Corp., USA	ESW-F15V, ESP-F15V
Elektrodenhalter Strom	Warner Instrument Corp., USA	E45W
Faraday-Käfig	Eigenbau: Werkstatt des Instituts	
Flachbrettschreiber	Kipp & Zonen, Niederlande	2-Kanal Modell BD 112
Glasgeräte (Glaskolben etc.)	Schott, Deutschland	Duran
Arbeitstisch mit Vestolit- Puffer	Eigenbau: Werkstatt des Instituts	Vestolit-Puffer (Leica)
Kaltlichtlampen	Schott, Deutschland	KL 1500 electronic
Mikromanipulatoren	Zeiss, Deutschland	Model M
Oozyteninkubator (Kühlschrank)	Liebherr, Deutschland (Umbau in der Werkstatt des Instituts auf 18-20°)	
Perfusionskammer	Eigenbau: Labor	
Perfusionssystem	Eigenbau: Labor	
Stereomikroskop	Wild/ Zeiss, Deutschland	Serie M3
Voltage-Clamp-Verstärker	Warner Instrument Corp., USA	Model OC-725 A Oocyte clamp
24-Well-Tissue-Culture-Plate	Sarstedt, Deutschland	
Szintillationscounter	TRI-CARB 2900 TR	Packard BioScience, USA
Schüttler	Typ 4020	Köttermann GmbH, Deutschland

## 2.1.2 Chemikalien

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller
$\alpha$ -Ketoglutarat, Natriumsalz	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich
Gentamycin	Applichem
Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonat (HEPES)	Carl Roth GmbH
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH
Kollagenase Typ CLS II	Biochrom
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich
Succinat, Natriumsalz	Sigma-Aldrich
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth GmbH
<i>N</i> -Methyl-D-Glucamin	Carl Roth GmbH
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH
[ <sup>14</sup> C]-Succinat	Perkin Elmer
Trishydroxymethyl-Aminomethan HCl (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH

## 2.1.3 Testlösungen

## a) Rezept der Oozyten-Ringer-Lösung (ORi)

Der pH-Wert des ORi wurde bei Raumtemperatur mit Tris auf pH 7,5 eingestellt. Zum Aufbewahren der Oozyten wurden dem ORi noch Gentamycin (12 mg/l) und Natriumpyruvat (2,5 mM) hinzugegeben.

Tabelle 11: Rezept der Oozyten-Ringer-Lösung (ORi)

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Konzentration der Lösung (mmol/l)
CaCl <sub>2</sub>	147,02	2
HEPES	238,3	5
KCl	74,56	3
NaCl	58,44	110

b) Testlösungen zur Verwendung in den [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat-Aufnahmeversuchen

Stammlösung:

1,8 mM [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat; 250  $\mu\text{Ci}$ / 1 ml

2,5  $\mu\text{Ci}$  = 10  $\mu\text{l}$  auf 1 ml ORi. Entspricht 18  $\mu\text{M}$  = 1:100 Verdünnung

Inkubationspuffer bei [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinataufnahme:

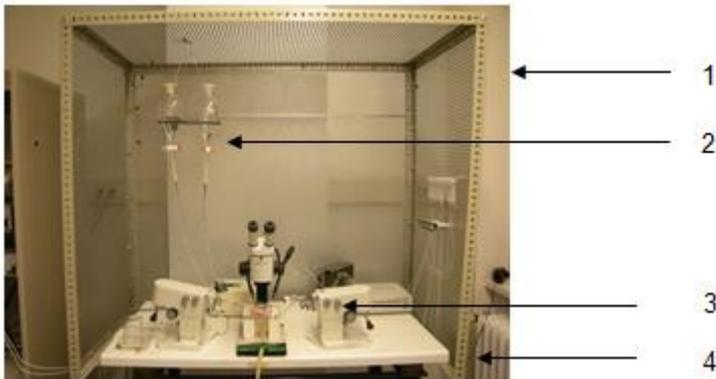
4,158 ml ORi + 42  $\mu\text{l}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Elektrophysiologischer Messplatz

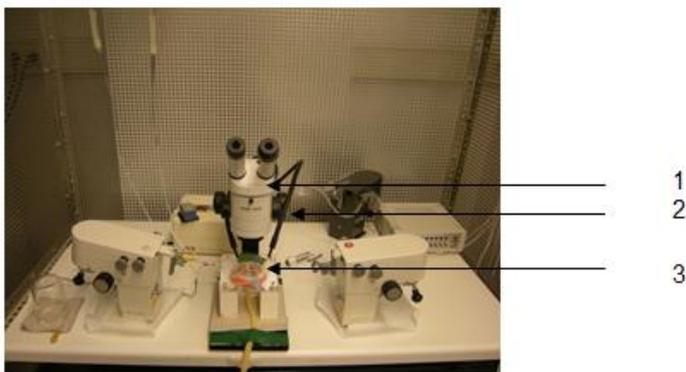
Alle Messungen erfolgen bei Raumtemperatur. Der gesamte Messplatz ist von einem Faraday-Käfig umgeben. Zur Aufzeichnung der einzuspeisenden Ströme wird ein Voltage-Clamp-Verstärker sowie ein Schreiber benötigt. Diese sind neben dem Faraday-Käfig positioniert. Der Messplatz besteht aus einer stoß- und erschütterungssicheren Arbeitsplatte, auf der sich mehrere Apparaturen befinden, sowie einem Haltesystem, welches im oberen Bereich des Käfigs montiert ist. Das Haltesystem dient der Befestigung der Vorratsbehälter des Perfusionssystems. Weitere Details werden im späteren Verlauf beschrieben. Zu den auf der Arbeitsplatte befindlichen Apparaturen zählt eine Kaltlichtlampe, die als Lichtquelle dient. Daneben benötigt man ein Stereomikroskop, um das Einstechen der Oozyte unter Sicht durchführen zu können, um so eine Beschädigung der Oozyte möglichst zu verhindern. Weiterhin benötigt man zwei Elektrodenhalter, die jeweils über einem Mikromanipulator bewegt werden. In den Elektrodenhaltern stecken die Mikroelektroden zur Spannungsmessung und zum Einspeisen des Stroms, der zur Konstanthaltung der eingestellten Spannung benötigt wird. Um die verschiedenen Testlösungen unkompliziert verwenden zu können, wird ein aus mehreren Elementen bestehendes Perfusionssystem eingesetzt. Es besteht zum einen aus zwei Vorratsbehältern, die etwa 60 cm oberhalb der Arbeitsplatte im Haltesystem des Faraday-Käfigs angebracht sind und ein Fassungsvermögen von jeweils 500 ml haben. Diese werden mit den Testlösungen gefüllt. Über Polyethylenschläuche gelangt die Testlösung in eine Perfusionskammer, in der sich die zu untersuchende Oozyte befindet. Im Anschluss fließt

die Testlösung über eine Öffnung in der Perfusionskammer in einen Auffangbehälter, der sich unterhalb der Arbeitsplatte befindet. Die Geschwindigkeit, mit der die Perfusionslösung durch das System läuft, liegt bei etwa 4 ml/min.



**Abbildung 6: Elektrophysiologischer Messplatz**

1: Faraday-Käfig, 2: Perfusionssystem: Haltesystem mit Vorratsbehältern und Polyethylenschläuchen, 3: Mikromanipulator mit Elektrodenhalter, 4: stoß- und erschütterungssichere Arbeitsplatte



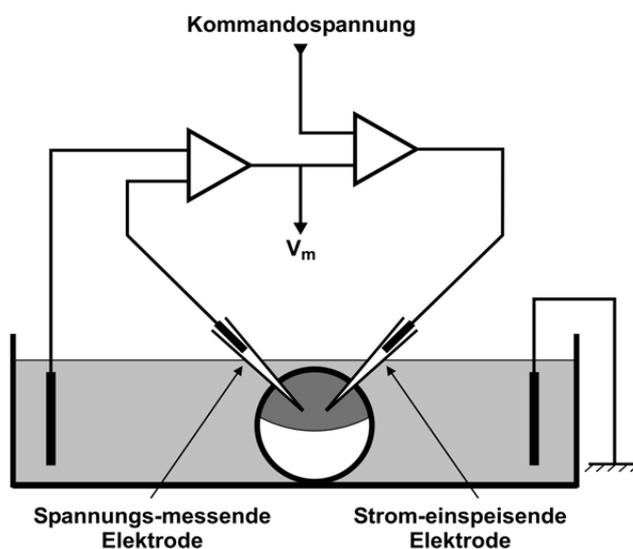
**Abbildung 7: Elektrophysiologischer Messplatz (vergrößert)**

1: Stereomikroskop, 2: Kaltlichtlampe, 3: Perfusionskammer

### 2.2.2 Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik (TEVC)

Durch die Aktivität des hNaDC3-Transporters kommt es zu transmembranären Ionenflüssen, die sich mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik (Two-Electrode-Voltage-Clamp (TEVC)) bestimmen lassen und es so ermöglichen, Rückschlüsse auf die Substratspezifität, den Transportmodus und die Aktivität des Transporters zu ziehen. Diese elektrophysiologische Methode ist die am häufigsten angewendete Technik zur quantitativen Bestimmung von Strömen, die durch die in

*Xenopus-laevis*-Oozyten exprimierten Transporter und Kanäle induziert werden (Wagner et al. 2000b). Der Grund-aufbau der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme besteht daraus, dass zwei Mikroelektroden in die zu untersuchende Oozyte eingestochen werden. Die eine Elektrode misst das Membranpotential, die zweite Elektrode speist Strom ein, um das auf dem Verstärker eingestellte Potential zu halten. Diese Elektrode liefert die Daten zur Auswertung der Ergebnisse. In der folgenden Abbildung ist das Ersatzschaltbild der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik zu sehen.



**Abbildung 8: Ersatzschaltbild der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme**

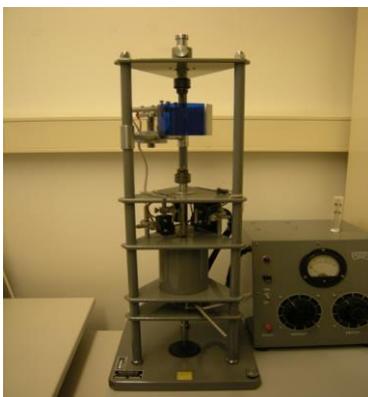
Die „Spannungsmessende Elektrode“ misst den Verlauf des Zellpotentials. Die „Strom-einspeisende Elektrode“ dient der Stromapplikation in die Zelle, um die Sollspannung konstant zu halten. Durch diese Elektrode fließt in umgekehrter Richtung genau so viel Strom wie über die gesamte Membranoberfläche der Zelle.

### 2.2.3 Mikroelektroden

Zur Messung der Ströme an der Oozytenmembran werden Mikroelektroden verwendet. Eine Mikroelektrode besteht aus drei Elementen: Glas-Mikropipette, chlorierter Silberdraht und KCl-Lösung. Die Glas-Mikropipette wird aus Borosilikatglaskapillaren hergestellt.

Diese Kapillaren sind 10 cm lang, besitzen ein Filament und haben einen Innendurchmesser von 0,8 mm und eine Wandstärke von 0,1 mm. Die Kapillare wird in einen DMZ-Universal-Puller eingesetzt und anschließend „gezogen“ (Abbildung 9A und B). Die so entstandene Glas-Mikropipette besitzt eine Spitze mit einem Durchmesser der kleiner ist als  $1/50$  bis  $1/70$  des Zelldurchmessers der Oozyte. Diese dünne Spitze ist erforderlich, um Leckströme zu verhindern. Die so hergestellte Glas-Mikropipette wird mit einer 3-molaren KCl-Lösung unter Anwendung einer flexiblen und feinkanuligen Spritze gefüllt. Wichtig ist, dass sich in der gefüllten Pipette keinerlei Luftbläschen befinden. Dies gelingt zum einem durch ein aufmerksames Befüllen der Pipette mit der Spritze. Empfohlen wird hier ein möglichst tiefes Einführen der Kanüle in den spitzzulaufenden Teil der Pipette. Zum anderen können nach Abschluss der Befüllung durch vorsichtiges Klopfen der Pipette, letzte kleine Luftbläschen entfernt werden. Der chlorierte Silberdraht wird separat an den Elektrodenhaltern befestigt. Im Anschluss wird die mit KCl-Lösung gefüllte Glas-Mikropipette über den Silberdraht gestülpt. Zu beachten ist hierbei, dass sich während der Versuchsreihe durch das KCl am Silberdraht Kristalle bilden und diese nach Beenden der Versuche unter fließendem Wasser entfernt werden sollten. Die chlorierten Silberdrähte werden insgesamt über einen langen Zeitraum immer wieder verwendet, wohingegen die Glas-Mikropipetten nach jeder durchgeführten Versuchsreihe in speziellen Behältern zu entsorgen sind, die vor einer Verletzung des Experimentators durch die Glasspitze schützen.

A



B



**Abbildung 9A-B: Darstellung des DMZ-Universal-Pullers**

Kapillarziehgerät (Narishige PE-2) A: mit Steuergerät; B: in Vergrößerung

### 2.2.4 Entnahme und Präparation der Oozyten

Die Entnahme der Oozyten wurde nicht von mir, sondern von einer Mitarbeiterin des Institutes durchgeführt. Für diese lag eine Ausnahmegenehmigung nach § 9 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes vor. Um aber eine möglichst vollständige Beschreibung zu gewährleisten, werden die Entnahme und die weitere Präparation im folgenden Abschnitt beschrieben. Die operative Entnahme einiger Ovarlappchen mit den in ihnen enthaltenen Oozyten erfolgt unter Anästhesie des Frosches. Hierfür wird das ausgewählte reife *Xenopus-laevis*-Weibchen zunächst in einen mit Eiswasser gefüllten Behälter gelegt. Unterstützend wurde dem Eiswasser Tricain (0,2%) zugefügt. Die Dauer bis zu der vollständigen Anästhesie beträgt etwa 40 – 45 Minuten. Im Anschluss wird das *Xenopus-laevis*-Weibchen mit seiner dorsalen Seite auf ein vorbereitetes Eisbett gelegt und in dieser Position operiert.

A



B

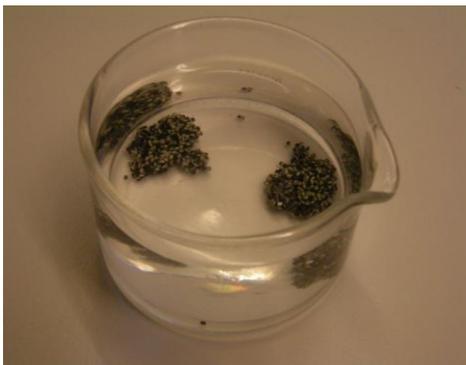


#### Abbildung 10A-B: Entnahme der Ovarlappchen

A: zur Entnahme der Ovarlappchen wurde der Frosch nach circa 40 – 45-minütiger Anästhesie auf seine dorsale Seite in ein Eisbett gelegt; zur operativen Entfernung liegen das Operationsbesteck sowie Nahtmaterial zum Verschluss des abdominalen Schnittes bereit; B: zu sehen ist ein nach außen gestülptes Ovarlappchen. Mit Hilfe einer Pinzette wird dieses in ausreichender Menge dem Frosch entnommen und zur weiteren Aufbereitung der darin befindlichen Oozyten abgetrennt.

Im linken Unterbauch erfolgt mittels eines Skalpells ein gerader Schnitt mit einer Länge von etwa 0,6 bis 1,0 cm, der sowohl Haut- als auch Muskelschicht durchtrennt. Das Ovar besteht aus ungefähr 24 Lappchen (Dumont 1972), von denen nun einige mittels einer

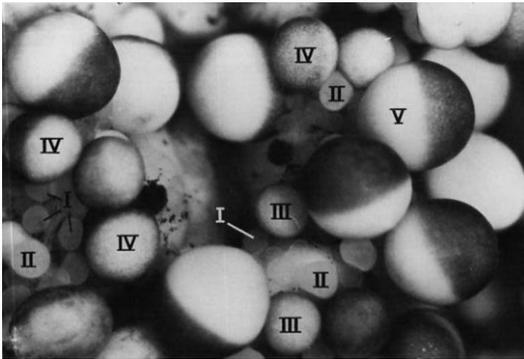
Sonde vorsichtig aus dem Bauchraum hervorgeholt werden. Einige dieser Läppchen werden abgeschnitten und in ein mit Oozyten-Ringer gefülltes Becherglas zur weiteren Verwendung gegeben. Die verbleibenden Läppchen werden vorsichtig wieder in den Bauchraum zurückgeschoben. Anschließend wird die Schnittstelle mit je einer separaten Haut- und Muskelnahnt verschlossen. Bevor das *Xenopus-laevis*-Weibchen zurück in das Aquarium gegeben wird, erfolgt eine Erholungsphase in einem mit 16 – 18°C warmen Wasser gefüllten Behälter. Die in den Ovarläppchen befindlichen Oozyten sind von einer festen Bindegewebsschicht umgeben, die entfernt werden muss, um an die zur Messung tauglichen Oozyten der Stadien V bzw. VI nach Dumont zu gelangen (Abbildung 11 und 12A-B). Hierfür wird dem Oozyten-Ringer (ORi) das Enzym Kollagenase (7 µg/ 20 ml ORi, Typ CLS 2, Biochrom, Berlin, Deutschland) zugefügt, welches in einer 12 – 15-stündigen Inkubation bei etwa 18°C das Bindegewebe enzymatisch andaut. Verbliebene bindegewebartige Strukturen werden durch ein zehn Minuten dauerndes Bad in Ca<sup>2+</sup>-freiem ORi gelöst. Zum Schluss erfolgt ein mehrmaliges Waschen der nun zum größten Teil vereinzelt Oozyten in Oozyten-Ringer mit dem Ziel, die letzten Follikelzellreste und verbliebenes Bindegewebe zu entfernen. Anschließend erfolgt aus diesem Oozytenpool die Aussortierung der zur Versuchsdurchführung tauglichen Oozyten der Stadien V und VI nach Dumont. Bis zur darauf folgenden Injektion der cRNA werden die ausgewählten Oozyten in ORi in einem Inkubator bei 16 – 18°C in ORi aufbewahrt.



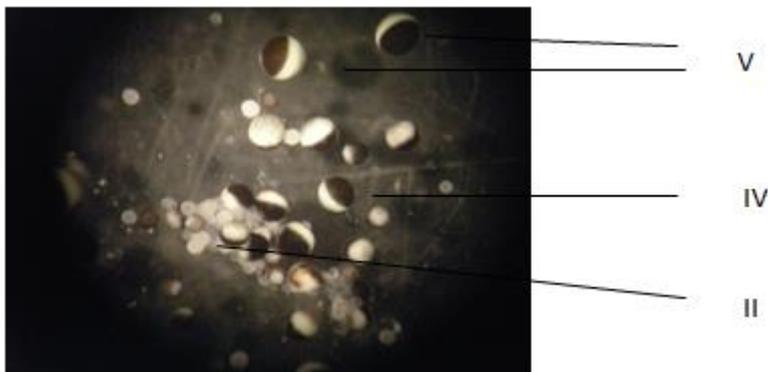
**Abbildung 11: Entnommene Ovarläppchen**

Entnommene Ovarläppchen. Die Oozyten sind noch durch Bindegewebe miteinander verbunden. Es folgt die enzymatische Verdauung des Bindegewebes, welches die Oozyten umgibt (12 – 15 Stunden Inkubation bei 18°C unter Anwendung einer kollagenasehaltigen ORi-Lösung).

A



B



**Abbildung 12A-B: Oozytenstadien nach Dumont**

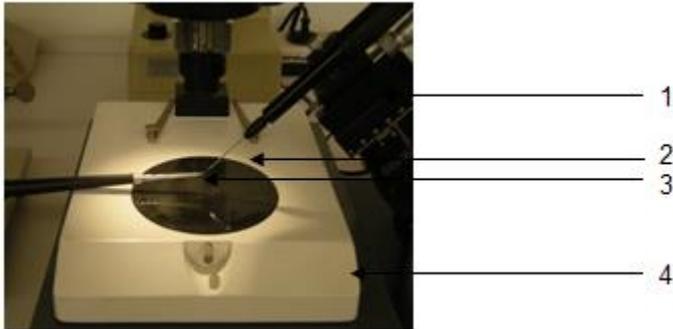
A: Originalabbildung aus Dumont 1972 mit Benennung der Oozytenstadien I-V. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung durch das Journal of Morphology ©Wiley Periodicals, Inc.; B: Darstellung verschiedener Oozytenstadien und ihre Einteilung in Stadien nach Dumont, exemplarisch Stadium II, IV und V; Stadium VI nach Dumont kommt in beiden Abbildungen nicht zur Darstellung.

### 2.2.5 Injektion der cRNA und weitere Behandlung

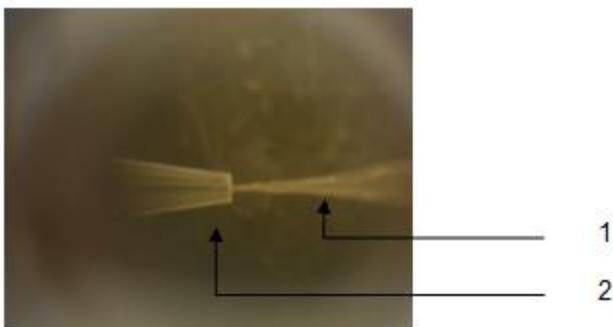
Die cRNA, die für den hNaDC3, die *sgk1* und die *sgk3* kodierte, wurde mir von Mitarbeitern des Instituts für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie zur Verfügung gestellt. Die Injektion dieser unterschiedlichen cRNAs erfolgte entweder alleine oder in Kombination. Als Kontrolle diente RNase-freies Wasser. Die Injektion der cRNA erfolgt mittels einer auf einem Mikromanipulator, installierten Mikropumpe. Auf diese Mikropumpe wird eine mineralölgefüllte Glaskapillare gesetzt. Die Glaskapillare wird aus Soda-klarglas auf dem DMZ-Universal-Puller gezogen und mittels einer feinkanuligen Spritze

mit dem Öl gefüllt. Die auf der Mikropumpe befindliche Kapillare wird unter Sicht mittels eines Stereomikroskops mit einer feinen Schere soweit gekürzt, dass ein kontrolliertes Pumpen des Öles aus der Kapillarspitze möglich ist. Der Durchmesser der Kapillarspitze beträgt anschließend etwa 10 µm. Dieses Vorgehen ist notwendig, um im Anschluss ein mengengenaues Injizieren der cRNA in die Oozyte zu gewährleisten. Nun folgt die Aufnahme der in Wasser gelösten cRNA in die Kapillarspitze. Hierfür wird die cRNA-Lösung zunächst in einer 0,5 – 10 µl Pipette aufgenommen und diese anschließend an einem Stativ befestigt. Unter mikroskopischer Sicht wird nun die Spitze der Glaskapillare in das Lumen der Pipettenspritze eingeführt. Die Aufnahme der cRNA-Lösung in die Kapillare erfolgt durch Betätigung der Mikropumpe. Die ausgewählten Oozyten der Stadien V und VI werden zur Injektion in eine mit ORi gefüllte Injektionskammer gegeben. Unter mikroskopischer Sicht erfolgt anschließend die Injektion der cRNA-Lösung. Hierbei wird auf die Positionierung der Kapillare in der Oozyte geachtet. Empfohlen wird die Injektion der cRNA im Bereich der Äquatorialebene, um eine Injektion in den Zellkern zu vermeiden. Pro Oozyte werden 23 nl der jeweiligen Lösung injiziert. Dabei sollte auf ein regelmäßiges Aufdehnen der Oozyte während des Injektionsvorganges geachtet werden. Bei zu starker Deformität oder beim Ausbleiben des Aufdehnens und dem daraus resultierenden Verdacht einer fehlerhaften Injektion, wird die Oozyte aussortiert. Anschließend folgt das Übersetzen der injizierten Oozyten in eine mit ORi plus Gentamycin und Natriumpyruvat gefüllte *24-Well-Tissue-Culture-Plate* (Sarstedt). Gentamycin und Natriumpyruvat werden dem ORi zugesetzt, um eine optimale Umgebung für die nun den Transporter exprimierenden Oozyten zu schaffen. Pro *well* werden fünf bis sechs Oozyten platziert. Bis zum Zeitpunkt der Messungen werden die Oozyten täglich mittels einer Pipette in eine frische ORi-Lösung umgesetzt. Hierbei werden defekte oder Reifezeichen aufweisende Oozyten aussortiert. Beschädigte Oozyten können durch ihren Verlust von Salzen zu einem Schaden an noch intakten Oozyten führen.

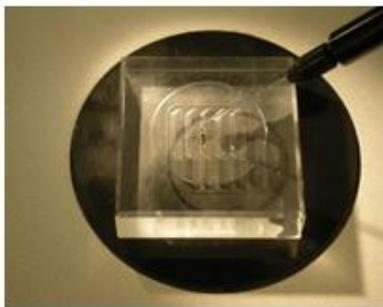
A



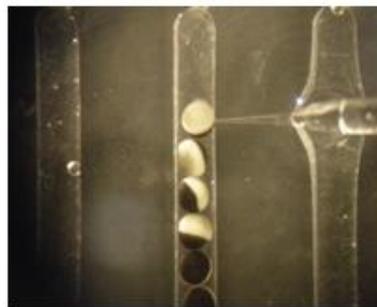
B



C



D



**Abbildung 13A-D: Injektion der cRNA in die *Xenopus-laevis*-Oozyte**

A: Übersicht der benötigten Geräte: 1: Mikromanipulator, 2: Mineralöl-gefüllte Glaskapillare, 3: Pipette mit zur Injektion gefüllter cRNA-Lösung, 4: Stereomikroskop; B: Detailaufnahme des Aufziehens der cRNA-Lösung aus der Pipette in die für die Oozyten-Injektion vorgesehene Glaskapillare: 1: Mineralöl-gefüllte Glaskapillare, 2: Pipette mit zur Injektion gefüllter cRNA-Lösung; C: Injektion der cRNA in die Oozyten mittels Glaskapillare; D: Detailaufnahme der cRNA-Injektion in eine Oozyte, hierbei ist darauf zu achten die Injektion in der Äquatorialebene der Oozyte durchzuführen, um eine Injektion in den Zellkern zu vermeiden.

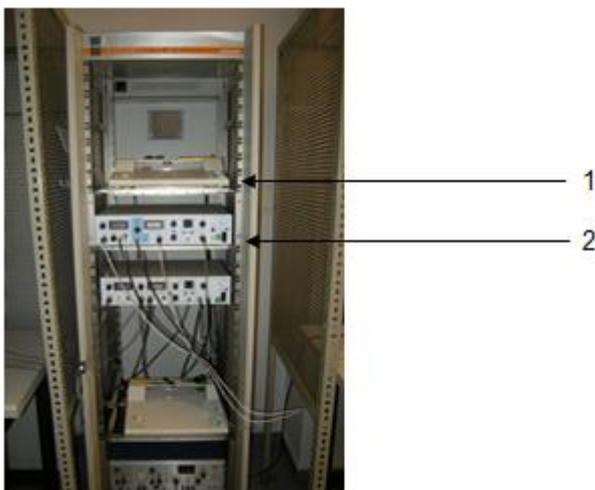
### 2.2.6 Elektrophysiologische Messung

Ziel der Messung ist das Erhalten einer Strom-Spannungs-Kennlinie (I-V-Kennlinie) der einzelnen Oozyten in einem Spannungsbereich zwischen  $-90$  mV und  $0$  mV unter aspektspezifischen Bedingungen. Dieses ergibt die Grundlage der anschließenden Auswertung und der daraus resultierenden Schlussfolgerungen des zugrunde liegenden Dissertationsthemas. Zu beachten ist zunächst, dass alle Materialien auf ihre Funktionsfähigkeit überprüft werden und frei von Verunreinigungen und Defekten sind, sowie Perfusionslösungen und Oozytenmaterial auf Zimmertemperatur erwärmt sind. Weiterhin ist eine freie Perfusion der Testlösungen durch das Perfusionssystem zu überprüfen. Gelegentlich kann es zu Blockierungen kommen, die die komplikationslose Perfusion behindern. Vor dem Einstechen der zu untersuchenden Oozyte sind die Mikroelektroden auf einen Wert von  $\pm 1$  mV zu abzugleichen (virtuelle Null). Dies gelingt durch das Eintauchen der beiden Mikroelektroden in die fließende ORi-Lösung; dies ist notwendig, um ein korrektes Klemmpotential der Oozyten zu sichern (Wagner et al. 2000b). Nach dem Abgleich der Mikroelektroden wird die Perfusion gestoppt und die zu untersuchende Oozyte in die Perfusionskammer gegeben. Nun folgt das Einstechen der Mikroelektroden in die Oozyte. Um eine Beschädigung der Oozyte zu vermeiden, wird dies unter Beleuchtung in Anwendung der Kaltlichtlampe und wegen der besseren Beobachtbarkeit, mittels des Stereomikroskops, durchgeführt. Die Mikroelektroden befinden sich hierbei in den Elektrodenhaltern und diese wiederum in den Mikromanipulatoren. Dieser Aufbau ermöglicht ein über die ganze Dauer der Messung beinahe störungsfreies Verbleiben der Mikroelektroden und der Oozyte in einer konstanten Position und damit eine sichere Messung. Ist ein erfolgreiches Positionieren der Mikroelektroden gelungen, wird unter erneuter Perfusion mit ORi dem System ein gewisser Zeitraum zum Stabilisieren gegeben. Unter *current-clamp*-Bedingungen wird das Membranpotential der Oozyte registriert, das zwischen  $-35$  mV und  $-45$  mV liegt (Wagner et al. 2000b). Aufgrund der Strömung der Perfusionslösung kann es zu einer veränderten Lage der Oozyte mit einem „Verrutschen“ der Mikroelektroden kommen. Hierbei kann es mitunter zu einer Beschädigung der Oozyte kommen, beispielsweise in Form eines Zerreißen der Zellmembran an der scharfen Spitze der Glas-Mikropipette. Tritt eine Beschädigung ein, ist meist der Abbruch dieser Messung nicht mehr zu vermeiden und die Messung erfolgt unter Verwendung einer anderen Oozyte. Die sichere, das heißt strömungsstabile Positionierung der Oozyte und der in ihr befindlichen Mikroelektroden ist

deshalb eine wichtige Grundvoraussetzung der erfolgreichen Messung. Hat sich dieses System stabilisiert, erfolgt das Einstellen des Soll- bzw. Klemmpotentials auf  $-60$  mV, wobei der Strom registriert wird, der zur Aufrechterhaltung der Sollspannung erforderlich ist. Zur Aufnahme einer Strom-Spannungs-Kennlinie wird in je  $10$  mV Schritten die Oozyte von  $-60$  mV auf ein Klemmpotential von  $-90$  mV geklemmt und bei absteigenden Potentialen bis auf  $+10$  mV eingestellt. Berechtigterweise kann bei der Auswertung die Vermutung aufkommen, dass die Reaktion der Oozyte ein Spezifikum des einen *Xenopus*-Weibchens ist. Um dies zu widerlegen, wurden die jeweiligen Messreihen stets mit den Oozyten von mindestens drei verschiedenen Fröschen ausgeführt.

### 2.2.7 Registrierung der Messwerte

Zur Registrierung der Messwerte wird ein Flachbrettschreiber eingesetzt. Dieser transportiert in einer konstanten Geschwindigkeit das Schreibpapier. Die Geschwindigkeit kann hierbei zwischen  $0,1$  mm/min bis zu  $20$  mm/s variiert werden. Die Standardgeschwindigkeit zur Registrierung bei I-V-Kennlinien beträgt  $0,1$  mm/s. Zwei voneinander unabhängige Federn zeichnen die vorgegebene Potentialkennlinie und den dazu gehörigen Stromverlauf auf.



**Abbildung 14: Geräteaufbau zur Registrierung der Messwerte**

- 1: Flachbrettschreiber zur Aufzeichnung der I-V-Kennlinie,
- 2: Voltage-Clamp-Verstärker (00C725A)

2.2.8 Versuche zur Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-markiertem Succinat

Diese Versuche wurden nicht von mir, sondern von einem Mitarbeiter des Institutes durchgeführt, der eine Genehmigung zum Arbeiten mit radioaktiv markierten Substanzen besaß. Im folgenden Abschnitt werden diese Versuche dennoch beschrieben, um einen möglichst vollständigen Ablauf darzustellen. Zur Vorbereitung wurden in eine *24-Well-Tissue-Culture-Plate* (Sarstedt) je Vertiefung etwa zehn bis zwölf Oozyten mit je 1,5 ml ORI-Lösung gegeben. Pro Versuchsreihe gibt es vier verschiedene Gruppen:

- |    |   |    |   |
|----|---|----|---|
| 1. | hNaDC3-Oozyten<br><br>hNaDC3+hsgk1-Oozyten<br><br>hsgk1-Oozyten<br><br>H <sub>2</sub> O-Oozyten | 2. | hNaDC3-Oozyten<br><br>hNaDC3+hsgk3-Oozyten<br><br>hsgk3-Oozyten<br><br>H <sub>2</sub> O-Oozyten |
|----|---|----|---|

Anschließend werden die Oozyten gewaschen. Mittels einer Glaspipette werden hierfür die Oozyten zweimal in eine mit frischer ORI-Lösung gefüllte Vertiefung der *24-Well-Tissue-Culture-Plate* umgesetzt. Je Oozytengruppe wird nun ein Mehrzweckgefäß (mit Schnappdeckel) mit jeweils 1 ml der Inkubationslösung vorbereitet (Rezept der Inkubationslösung: siehe 2.1 Material). Je Versuchsbedingung werden 5 µl der Inkubationslösung für den Standard abgenommen.

Messung der Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat:

In jedes Mehrzweckgefäß werden zehn bis zwölf Oozyten einer Messgruppe gegeben. Anschließend findet eine Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler statt. Nach der Inkubation ist ein vorsichtiges Absaugen der Inkubationslösung erforderlich. Es findet zweimalig ein Waschen der Oozyten mit jeweils 4 ml ORI statt. Im Anschluss wird die Lösung wieder abgesaugt. Darauf folgend werden die Oozyten einzeln auf den Boden eines Szintillationsröhrchens gegeben und mit 100 µl NaOH bedeckt. Die Röhrchen werden für zwei Stunden auf einen Schüttler gegeben, bis die Oozyten vollständig lysiert sind. Zur Neutralisierung werden im Anschluss 100 µl HCl hinzugefügt.

Zur Messung werden 2,5 ml der Szintillationsflüssigkeit entnommen und mit einem für die [ $^{14}\text{C}$ ]-Messung angepassten Programm im TRI-CARB 2900 TR (Packard BioScience) gemessen.

### 2.2.9 Tierhaltung

Die *Xenopus-laevis*-Weibchen (Bezugsquelle: Nasco, Fort Atkinson, WI, USA) werden im Kellergeschoss des Institutes für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie der UMG gehalten. Die Haltung erfolgt in Glasaquarien zu je fünf bis sechs Tieren bei einer Wassertemperatur von 18°C und ständiger Sauerstoffzufuhr. Eine Zeitschaltuhr ermöglicht die Simulation eines 12 h-Tag-Nacht-Rhythmus. Fütterung und Pflege der Tiere erfolgt durch die Zentrale Tierexperimentelle Einheit (ZTE).

A



B



**Abbildung 15A-B: Tierhaltung**

Glasaquarien mit *Xenopus-laevis*-Weibchen

### 3 Ergebnisse

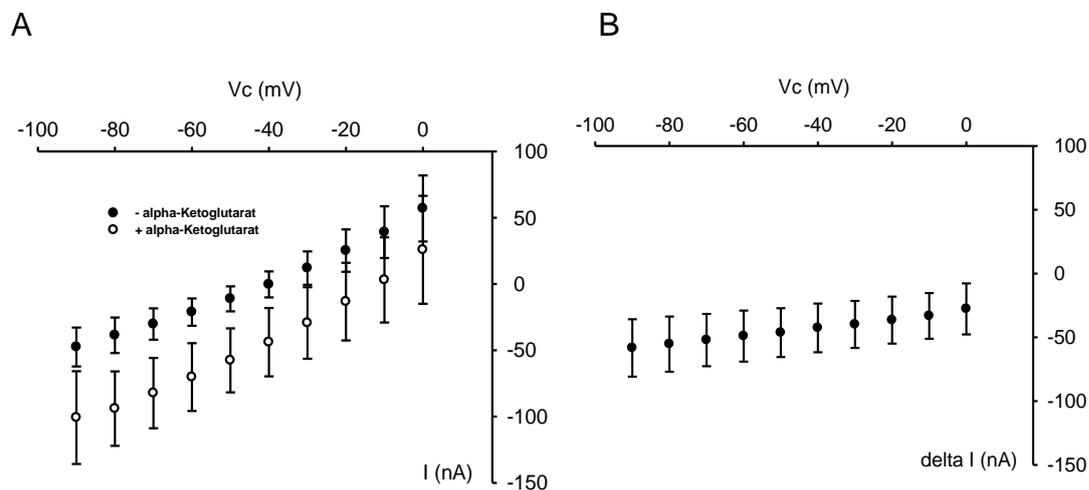
Drei bis vier Tage nach Injektion der jeweiligen cRNA war das entsprechende Protein in die Zellmembran der Oozyten eingebaut, und es konnte mit den elektrophysiologischen Messungen begonnen werden. Hierzu werden die beiden Mikroelektroden in die Oozyte eingestochen und die Oozyte im *current clamp*-Modus mit Oozyten-Ringer (ORi) umspült. Nach Stabilisierung des Membranpotentials wird in den Voltage-Clamp-Modus umgeschaltet. Das gewählte Haltepotential beträgt  $-60$  mV. Da das Membranpotential der Oozyte meist niedriger als  $-60$  mV ist, muss ein zusätzlicher Einwärtsstrom eingespeist werden, um ein Potential von  $-60$  mV zu halten. Nachdem sich ein konstanter Haltestrom eingestellt hat, wird die Perfusion von ORi auf ORi plus 1 mM Succinat umgestellt. Durch dieses Manöver wird ein zusätzlicher Einwärtsstrom induziert, der nur so lange anhält, wie die Oozyte mit ORi plus 1 mM Succinat überspült wird. Da der hNaDC3 drei Natriumionen mit einem zweiwertigen Succinat transportiert, muss zur Konstanthaltung des Haltepotentials Ladung eingespeist werden, die als Einwärtsstrom registriert wird. Bei Oozyten, die statt mit für den hNaDC3-kodierender cRNA mit einer äquivalenten Menge Wasser injiziert wurden, darf kein zusätzlicher Einwärtsstrom detektiert werden, da diese Oozyten keinen hNaDC3 exprimieren. Nach erfolgreicher Expression, dokumentiert durch Registrieren eines Succinat-induzierbaren Stroms, kann mit den eigentlichen Messungen begonnen werden.

#### 3.1 Untersuchungen mit hNaDC3 und *sgk1*

##### 3.1.1 Strom-Spannungskennlinien (I-V-Kennlinien) $\alpha$ KG-induzierbarer Ströme ohne und mit Koexpression von *sgk1*

In Abbildung 16A-B werden die I-V-Kennlinien hNaDC3-exprimierender Oozyten in Ab- und Anwesenheit von  $\alpha$ -Ketoglutarat ( $\alpha$ KG) gezeigt. Statt Succinat wurde in den eigentlichen Messungen  $\alpha$ KG benutzt, da es sehr wahrscheinlich das physiologische Substrat des hNaDC3 ist. Nach Einstellen eines konstanten Haltestroms unter Perfusion mit ORi bei  $-60$  mV wurde schrittweise das Haltepotential in 10 mV-Schritten auf  $-90$  mV erhöht und anschließend ebenfalls in 10 mV-Schritten auf 0 mV abgesenkt und wieder auf  $-60$  mV angehoben. Der jeweils einzuspeisende Haltestrom wird registriert und ist in Abbildung 16A durch das Symbol ● gekennzeichnet. Die Perfusion wird umgeschaltet auf

ORi plus 1 mM  $\alpha$ KG und das Haltepotential wird erneut im Bereich zwischen  $-90$  und  $0$  mV variiert, und die resultierenden Halteströme werden registriert (gekennzeichnet in Abb. 16A durch  $\circ$ ). Die unter diesen Versuchsbedingungen gemessenen Halteströme ( $I$ ) sind in Abbildung 16A als Funktion der angelegten Spannung ( $V_c$ ) aufgetragen. Unter ORi-Perfusion lag der Mittelwert des Einwärtsstromes bei einer Klemmspannung von  $-90$  mV bei  $-47,5 \pm 14,7$  nA, bei  $0$  mV bei  $+57,0 \pm 24,9$  nA. Das Nullstrom-Potential betrug  $-38,4 \pm 9,1$  mV (18 Oozyten/sechs Spender). Unter Perfusion mit ORi plus 1 mM  $\alpha$ KG wurde ein Einwärtsstrom von  $-100,8 \pm 35,0$  nA bei  $-90$  mV und von  $+25,8 \pm 40,7$  nA bei  $0$  mV registriert. Das Nullstrom-Potential fiel auf  $-10,4 \pm 14,6$  mV ab. Dies ist ein Hinweis für die durch  $\alpha$ KG-Applikation erfolgte Depolarisation der Oozyten.



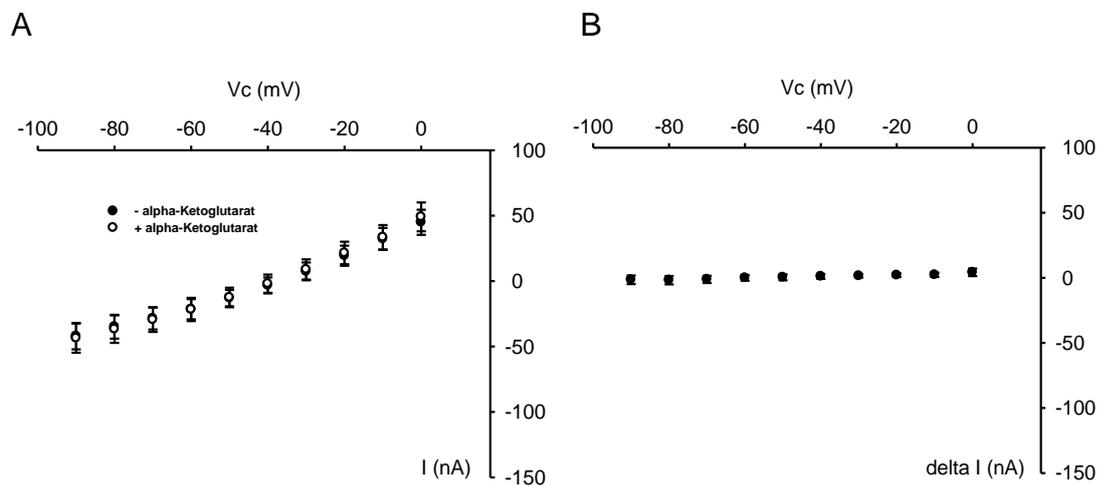
**Abbildung 16A-B: I-V-Kennlinie hNaDC3-Oozyten**

Strom-Spannungs- (I-V-) Kennlinien hNaDC3-exprimierender Oozyten in Ab- (●) und Anwesenheit von 1 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat (○) gelöst in ORi (A) und die aus (A) ermittelten Differenzströme, die sogenannten  $\alpha$ -Ketoglutarat-vermittelten Ströme (B). Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus Messungen an 18 Oozyten von sechs unterschiedlichen Spenderfröschen.

Durch Subtraktionsbildung der Ströme in An- und Abwesenheit von  $\alpha$ KG kann der  $\alpha$ KG-medierte Strom berechnet werden. Dieser ist in Abbildung 16B dargestellt. Seine Amplitude beträgt bei  $-90$  mV  $-58,3 \pm 22,5$  nA und fällt bei  $0$  mV auf  $-14,0 \pm 27,0$  nA ab.

Das Nullstrom-Potential liegt bei positiven Spannungen ( $20,2 \pm 24,2$  mV) und ist ein Hinweis dafür, dass der Strom Natrium-getragen ist.

Wasser-injizierte Oozyten antworten nicht mit einem Substrat-medierten Strom auf die Applikation von  $\alpha$ KG. Wie aus Abbildung 17A ersichtlich, liegen die Messpunkte für den Strom, der von ORi alleine erzeugt wurde (Abb. 17A, ●) und dem Strom der von 1 mM  $\alpha$ KG gelöst in ORi (Abb. 17A, ○) induziert wurde, nahe beieinander. Der sich aus der Differenz beider Ströme errechnete  $\alpha$ KG-medierte Strom (Abb. 17B) besitzt nur geringe Amplituden und zeigt nur eine geringfügige Spannungsabhängigkeit. Dieses Ergebnis zeigt, dass *Xenopus-laevis*-Oozyten keinen endogenen Natrium-abhängigen Dikarboxylat-transporter besitzen.

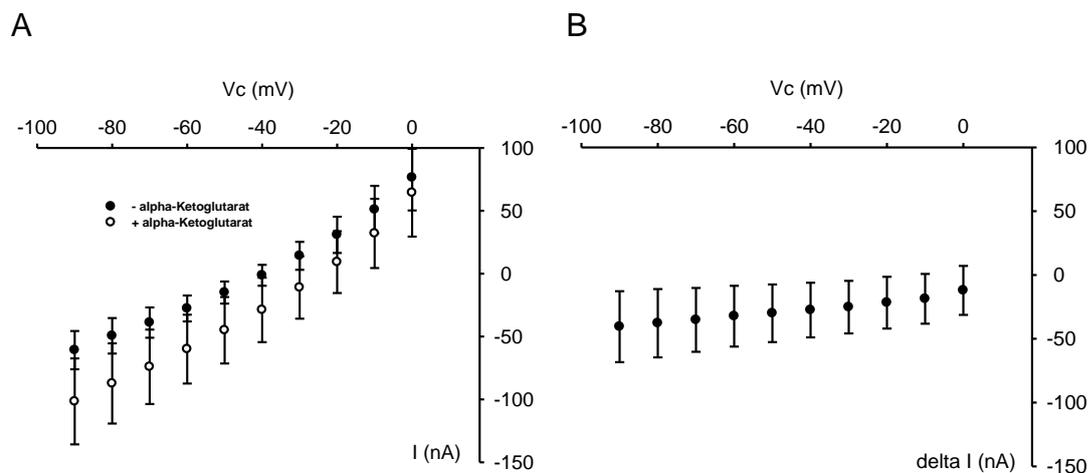


#### Abbildung 17A-B: I-V-Kennlinie Wasser-Oozyten

Strom-Spannungs- (I-V-) Kennlinien Wasser-injizierter Oozyten in Ab- (●) und Anwesenheit von 1 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat (○) gelöst in ORi (A) und die aus A errechneten  $\alpha$ -Ketoglutarat-vermittelten Ströme (B). Die Graphiken zeigen Mittelwerte aus 12 Messungen an Oozyten von sechs Spendertieren.

Die Koexpression von hNaDC3- und *sgk1*-kodierender mRNA in die Oozyten führte zu den in Abbildung 18A gezeigten Ergebnissen. Sowohl unter Perfusion mit ORi alleine (Abb. 18A, ●) als auch mit 1 mM  $\alpha$ KG gelöst in ORi (Abb. 18A, ○) wurden Potential-abhängige Ströme registriert, deren Amplitude bei Depolarisation abnahm. Bei  $-90$  mV

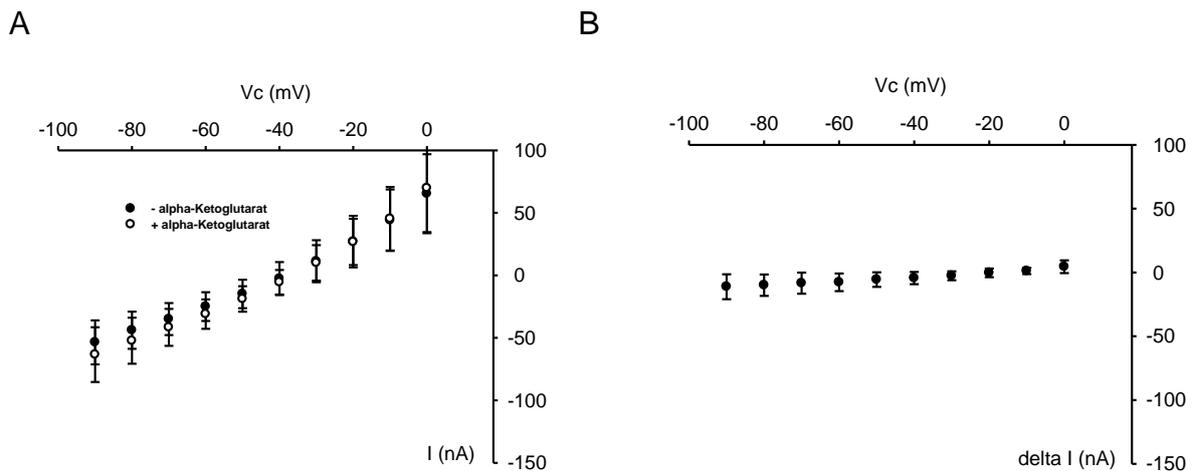
wurde an 20 Oozyten von sieben Tieren unter ORi ein Strom von  $-60,8 \pm 15,2$  nA und bei 0 mV ein Strom von  $+76,5 \pm 26,2$  nA detektiert. Die entsprechenden Werte unter  $\alpha$ KG und ORi betragen  $-101,6 \pm 34,2$  nA und  $+64,4 \pm 34,9$  nA. Die dazugehörigen  $\alpha$ KG-sensitiven Ströme sind in Abbildung 18B zusammengefasst. Im Unterschied zu den  $\alpha$ KG-sensitiven Strömen, die ohne Koexpression mit *sgk1* gemessen wurden (Abb. 16A-B), zeigen diese Ströme bei allen Potentialen eine geringere Amplitude. Außerdem ist das Nullstrompotential zu negativeren Potentialen verschoben. Es betrug nur noch  $+10,2 \pm 18,9$  mV.



**Abbildung 18A-B: I-V-Kennlinie hNaDC3+sgk1-Oozyten**

Strom-Spannungs- (I-V-) Kennlinien hNaDC3- plus *sgk1*-koinjizierter Oozyten in Ab- ( $\bullet$ ) und Anwesenheit von 1 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat ( $\circ$ ) gelöst in ORi (A) und die aus A errechneten  $\alpha$ -Ketoglutarat-vermittelten Ströme (B). Die Graphiken zeigen Mittelwerte aus 20 Messungen an Oozyten von sieben Spendertieren.

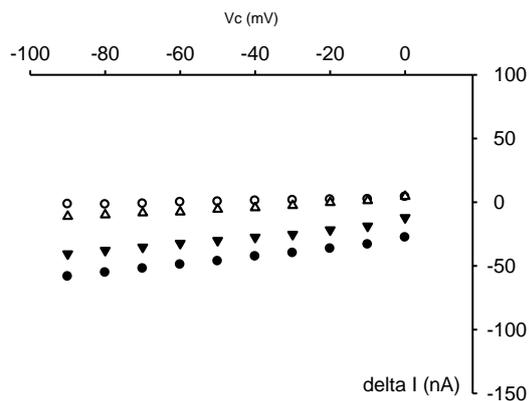
Als Kontrolle zu den Oozyten, die mit *sgk1* und hNaDC3 koinjiziert waren, mussten Kontrollen gemessen werden, in die ausschließlich *sgk1* alleine injiziert worden war. Diese Messungen sind in Abbildung 19A-B zusammengefasst.



#### Abbildung 19A-B: I-V-Kennlinie sgk1-Oozyten

Strom-Spannungs- (I-V-) Kennlinien sgk1-injizierter Oozyten in Ab- (●) und Anwesenheit von 1 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat (○) gelöst in ORi (A) und die aus A errechneten  $\alpha$ -Ketoglutarat-vermittelten Ströme (B). Die Graphiken zeigen Mittelwerte aus 13 Messungen an Oozyten von fünf Spendertieren.

Im Vergleich zu hNaDC3-exprimierenden Oozyten zeigen Oozyten, die mit sgk1 injiziert waren, bei allen Potentialen sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von  $\alpha$ KG geringere Halteströme. Ebenso ist die Amplitude des  $\alpha$ KG-sensitiven Stroms reduziert und ihre Potentialabhängigkeit ist fast vollständig verloren gegangen. Zur besseren Übersicht sind deshalb die  $\alpha$ KG-medierte Ströme aller vier Bedingungen noch einmal zusammengefasst in Abbildung 20 dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist auf die Standardabweichungen verzichtet worden und die Skalierung ist analog zu der in den ursprünglichen Abbildungen gewählt.

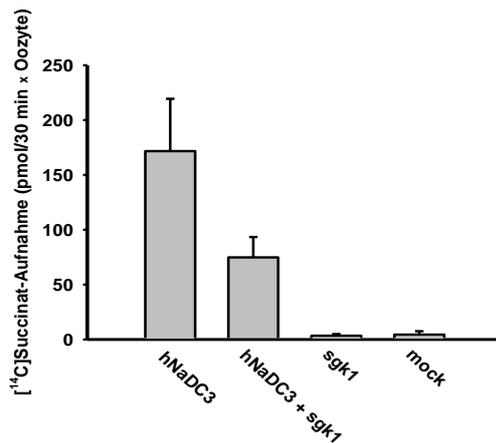


**Abbildung 20: Zusammenfassung der Abbildungen 16 - 19**

Abhängigkeit vom Klemmpotential  $\alpha$ -Ketoglutarat-vermittelter Ströme in hNaDC3- (●), hNaDC3 + sgk1- (▼), sgk1- (Δ) und mock- (○) exprimierenden Oozyten. Die Abbildung zeigt eine Zusammenfassung der in den Abbildungen 16, 17, 18 und 19 vorgestellten Daten.

### 3.1.2 Einfluss der sgk1 auf die Aufnahme radioaktiv-markierten Succinates

In einem zweiten Versuchsansatz wurde die Aufnahme von [ $^{14}$ C]-Succinat in Oozyten gemessen, die ausschließlich den hNaDC3 oder den hNaDC3 plus sgk1 exprimiert hatten. Als Kontrolle dienten wiederum Oozyten, die entweder mit einer entsprechenden Menge an Wasser oder an sgk1 alleine injiziert worden waren. In Analogie zu den elektrophysiologischen Experimenten war die Aufnahme an Succinat in den hNaDC3-exprimierenden Oozyten am höchsten. Sie betrug 171,7 pmol/30 min. Sgk1 reduzierte die Aufnahme von Succinat signifikant ( $p < 0,05$ ) auf 74,9 pmol/30 min. Die Aufnahme von Succinat in die jeweiligen Kontrollen war vernachlässigbar. Die Versuche zeigen, dass die sgk1 die Substrataufnahme über den hNaDC3 deutlich unabhängig vom Substrat (Succinat in den Experimenten mit radioaktiv-markiertem Succinat und  $\alpha$ KG in den elektrophysiologischen Experimenten) beeinflusst.



**Abbildung 21: Aufnahme des [<sup>14</sup>C]-markierten Succinates (sgk1)**

Dargestellt ist die Aufnahme des [<sup>14</sup>C]-markierten Succinates in hNaDC3-exprimierenden Oozyten mit und ohne Koexpression der sgk1. Die Daten stellen Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten mit jeweils zehn Oozyten pro experimentelle Gruppe dar.

### 3.1.3 Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter

Da sowohl die  $\alpha$ KG-induzierten Ströme als auch die Aufnahme von Succinat in Oozyten, die neben dem hNaDC3 zusätzlich die sgk1 exprimiert hatten, geringer war als in Oozyten, die ausschließlich mit hNaDC3-cRNA injiziert waren, musste untersucht werden, ob diese Änderungen auf geänderte Transportraten oder Affinitäten zurückzuführen sind. Aus diesem Grund wurden bei einem Klemmpotential von  $-60$  mV die durch aufsteigende Konzentrationen an  $\alpha$ KG hervorgerufenen Ströme an hNaDC3- und hNaDC3 plus sgk1-exprimierenden Oozyten gemessen. Die Ergebnisse, die an jeweils vier Oozyten von zwei Spendertieren gewonnen wurden, sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die Daten wurden mit einem modifizierten SigmaPlot-Programm berechnet. Bei Koexpression von sgk1- und hNaDC3-cRNA sind sowohl  $K_m$  als auch  $I_{max}$  reduziert.

**Tabelle 12: Affinität und maximale Transportrate sgk1**

Bestimmung der Affinität ( $K_m$ ) und der maximalen Transportrate ( $I_{max}$ )  $\alpha$ KG-induzierter Ströme gemessen an hNaDC3- und hNaDC3 plus sgk1-exprimierenden Oozyten. n: Anzahl der gemessenen Oozyten, m: Anzahl der Spendertiere.

Bedingung	$K_m$ ( $\mu$ M)	$I_{max}$ (nA)	n/m
hNaDC3	$45,7 \pm 21,1$	$-50,0 \pm 3,6$	4/2
hNaDC3, sgk1	$10,7 \pm 4,3$	$-34,5 \pm 9,2$	4/2

### 3.1.4 I-V-Kennlinien $\alpha$ KG-induzierbarer Ströme ohne und mit Koexpression von *sgk1* während der Perfusion mit Natrium-freien oder Lithium-haltigen Lösungen

Da der hNaDC3 ein Natrium-abhängiger Transporter ist und unbekannt ist, wie die *sgk1* auf Änderungen der Natriumkonzentration reagiert, musste der Einfluss von Natrium getestet werden. Zuerst wurde die Oozyte mit Natrium-haltigem ORi umspült bis sich ein konstanter Haltestrom eingestellt hatte. Anschließend wurde  $\alpha$ KG hinzugegeben und der  $\alpha$ KG-vermittelte Strom zur Überprüfung einer ausreichenden Expression des hNaDC3 gemessen. Anschließend wurde an derselben Oozyte die Natrium-haltige auf Natrium-freie Perfusion umgeschaltet, wobei Natrium durch *N*-Methyl-D-Glucamin ersetzt war. Nach Einstellen eines konstanten Haltestroms wurde die Perfusion auf  $\alpha$ -Ketoglutarat gelöst in *N*-Methyl-D-Glucamin-Ringer umgeschaltet. Unter diesen Bedingungen wurden I-V-Kennlinien in einem Spannungsbereich von  $-90$  mV bis  $0$  mV registriert. Insgesamt wurden die in Tabelle 13 aufgeführten Bedingungen untersucht.

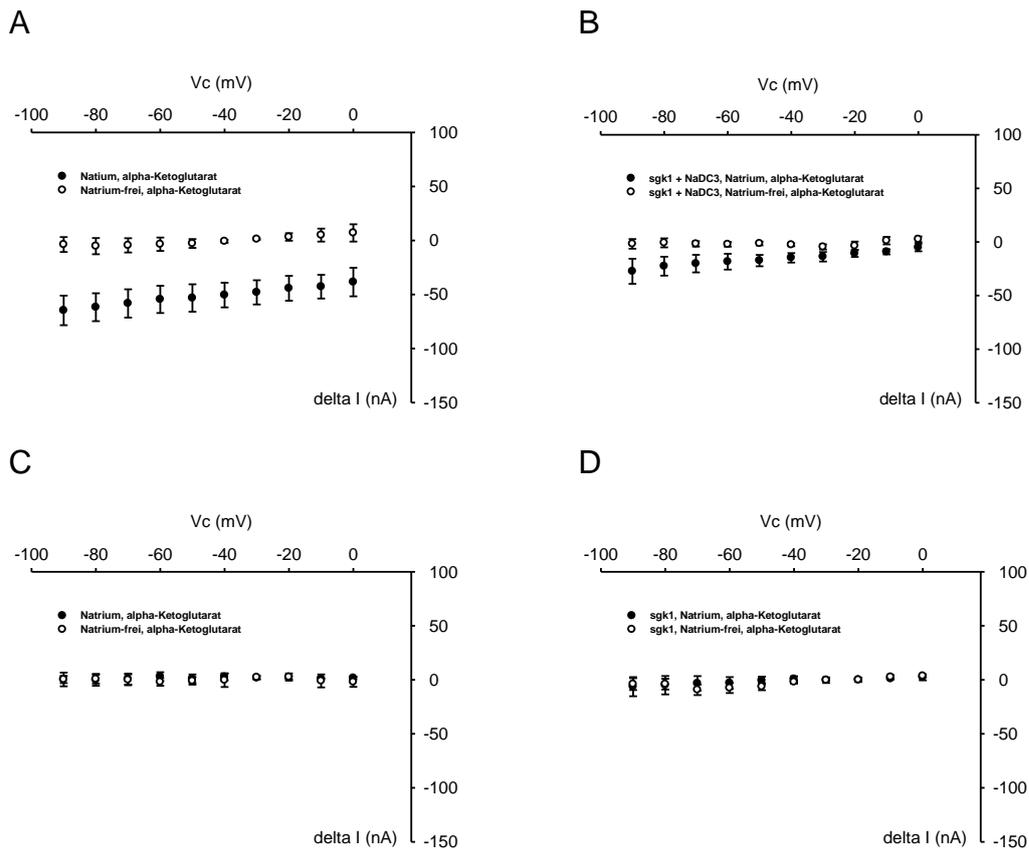
**Tabelle 13: Überprüfung der Natriumabhängigkeit *sgk1***

Übersicht über die zur Überprüfung der Natriumabhängigkeit durchgeführten Versuche.

$\alpha$ KG:  $\alpha$ -Ketoglutarat, NMDG: *N*-Methyl-D-Glucamin, mock: Wasser-injiziert.

	Natrium	Natrium, $\alpha$ KG	NMDG	NMDG, $\alpha$ KG
hNaDC3	✓	✓	✓	✓
hNaDC3, <i>sgk1</i>	✓	✓	✓	✓
mock	✓	✓	✓	✓
mock, <i>sgk1</i>	✓	✓	✓	✓

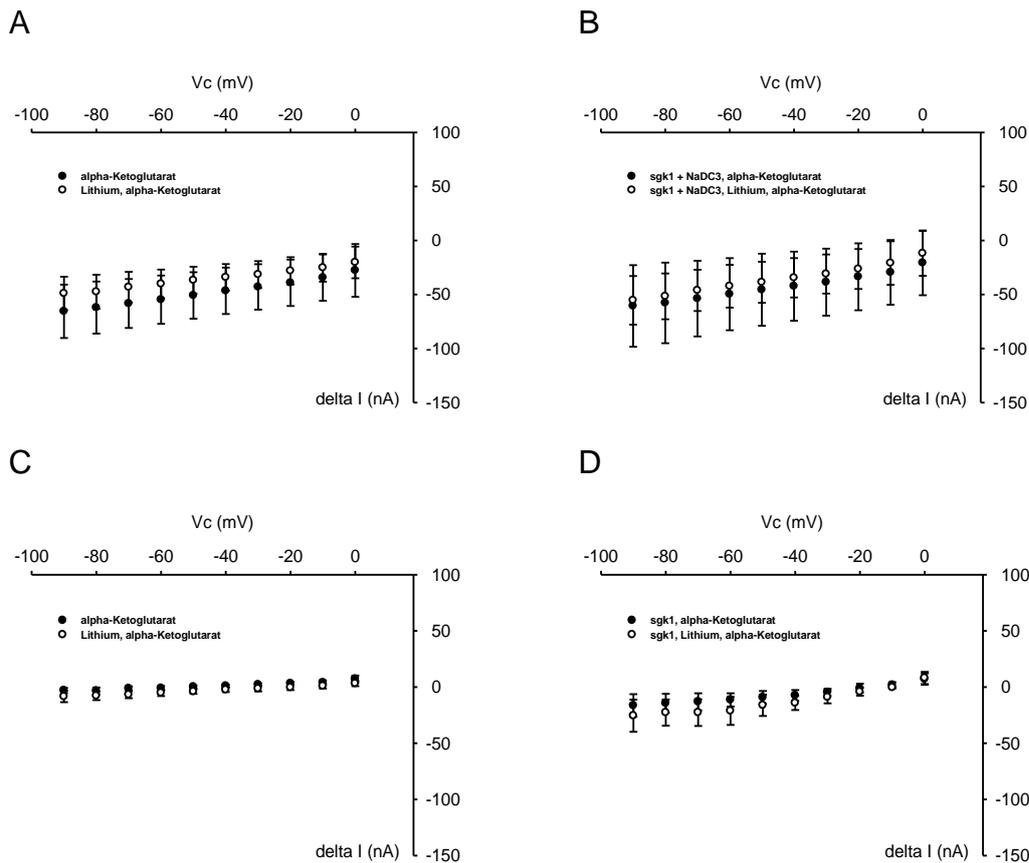
Pro Versuchsbedingung konnten jeweils nur vier bis fünf auswertbare Messungen erhalten werden, da die Oozyten auf eine Natrium-freie Perfusion mit sehr starken Fluktuationen antworteten. Wie jedoch aus Abbildung 22A-D ersichtlich, war unter Natrium-freien Bedingungen kein  $\alpha$ KG-vermittelter Strom mehr nachweisbar. Die Amplituden der Ströme lagen - unabhängig von der experimentellen Bedingung - zwischen  $-4$  und  $+2$  nA.



**Abbildung 22A-D: Natriumabhängigkeit der sgk1**

Dargestellt sind Mittelwerte  $\alpha$ KG-induzierbarer Ströme (delta I) in hNaDC3- (A), hNaDC3 + sgk1- (B) und den jeweiligen mock- (C) und sgk1- (D) injizierten Oozyten. Pro Bedingung konnten nur vier bis fünf Oozyten in die Auswertung genommen werden, da es in den meisten Versuchen, bedingt durch die Natrium-freie Perfusion, zu Fluktuationen der Oozyten kam.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, welchen Einfluss Lithium auf den  $\alpha$ KG-induzierten Strom hat. 2 mM Lithium wurden direkt in den  $\alpha$ KG-haltigen ORi eingewogen. Die Ergebnisse der Differenzströme sowohl für die hNaDC3-injizierten als auch für die Wasser-injizierten Oozyten sind in Abbildung 23A-D zusammengefasst. Lithium in einer Konzentration von 2 mM hat keinen Einfluss auf die Amplituden der  $\alpha$ -Ketoglutarat-vermittelten Ströme in hNaDC3- und hNaDC3 plus sgk1-exprimierenden Oozyten. Während die Substrat-induzierten Ströme bei Wasser-injizierten Oozyten in Ab- und Anwesenheit von Lithium weitgehend unabhängig vom Klemmpotential waren, konnte bei Wasser plus sgk1-injizierten Oozyten in Anwesenheit von Lithium eine geringfügige Potentialabhängigkeit der Ströme nachgewiesen werden.



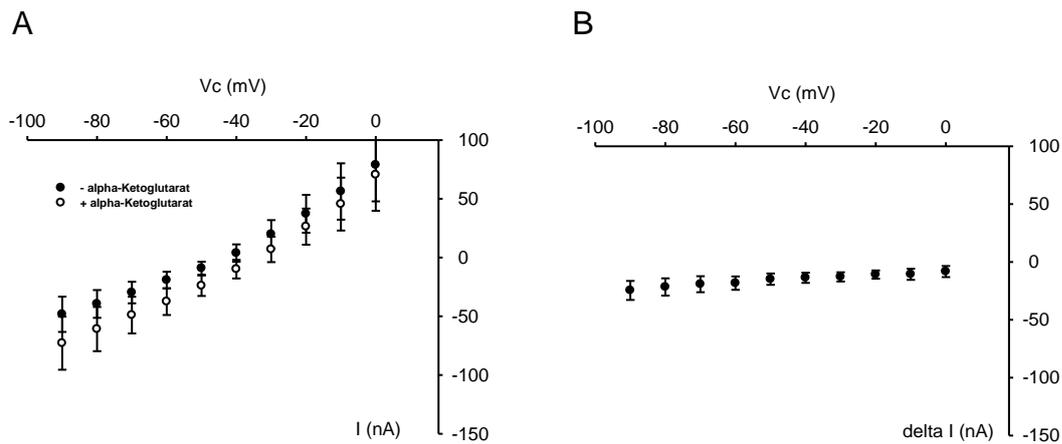
**Abbildung 23A-D: Lithiumabhängigkeit der sgk1**

Dargestellt sind Mittelwerte  $\alpha$ KG-induzierbarer Ströme (delta I) in hNaDC3- (A), hNaDC3 + sgk1- (B) und den jeweiligen mock- (C) und sgk1- (D) injizierten Oozyten. Pro Bedingung wurden zehn Oozyten von drei Spendertieren in die Auswertung genommen.

## 3.2 Untersuchungen mit hNaDC3 und sgk3

### 3.2.1 I-V-Kennlinien $\alpha$ KG-induzierbarer Ströme ohne und mit Koexpression von sgk3

Die Experimente zum Einfluss der sgk3 auf die  $\alpha$ KG-induzierten Ströme in hNaDC3-injizierten Oozyten wurden zeitlich versetzt zu den Experimenten, die sich mit der sgk1 befassen, durchgeführt. In dieser zweiten Versuchsperiode waren die  $\alpha$ KG-mediierten Ströme deutlich geringer als in der ersten Versuchsphase. Bei einem Klemmpotential von  $-60$  mV wurde in zehn Oozyten von neun Fröschen ein  $\alpha$ KG-medierter Strom von  $-37,5 \pm 11,5$  nA detektiert (Abb. 24A-B). In der ersten Versuchsperiode betrug dieser Strom noch  $-49,0 \pm 20,0$  nA (18 Oozyten von sechs Spendertieren).

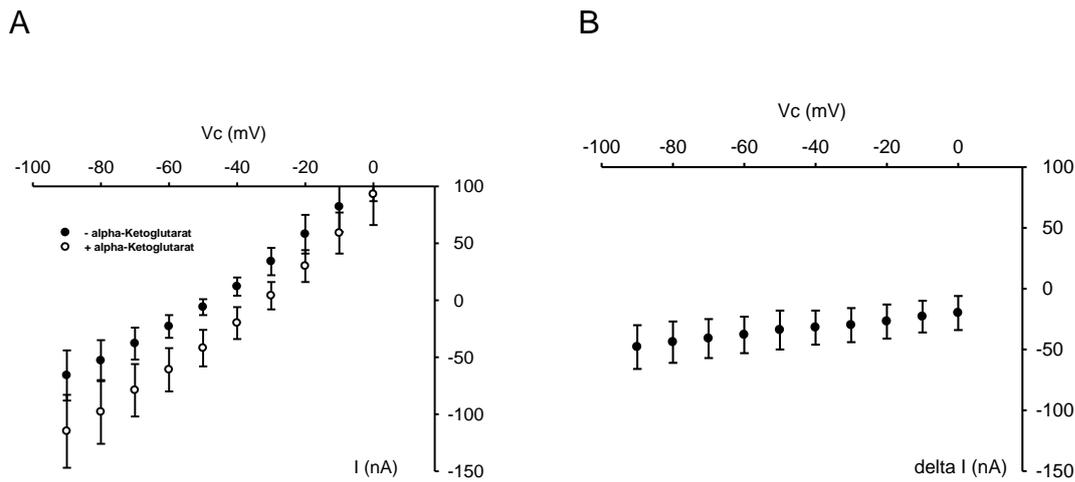


**Abbildung 24A-B: I-V-Kennlinie hNaDC3-Oozyten**

Strom-Spannungs- (I-V-) Kennlinien hNaDC3-exprimierender Oozyten in Ab- (●) und Anwesenheit von 1 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat (○) gelöst in ORi (A) und die aus (A) ermittelten Differenzströme, die sogenannten  $\alpha$ -Ketoglutarat-vermittelten Ströme (B). Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus Messungen an zehn Oozyten von neun unterschiedlichen Spenderfröschen.

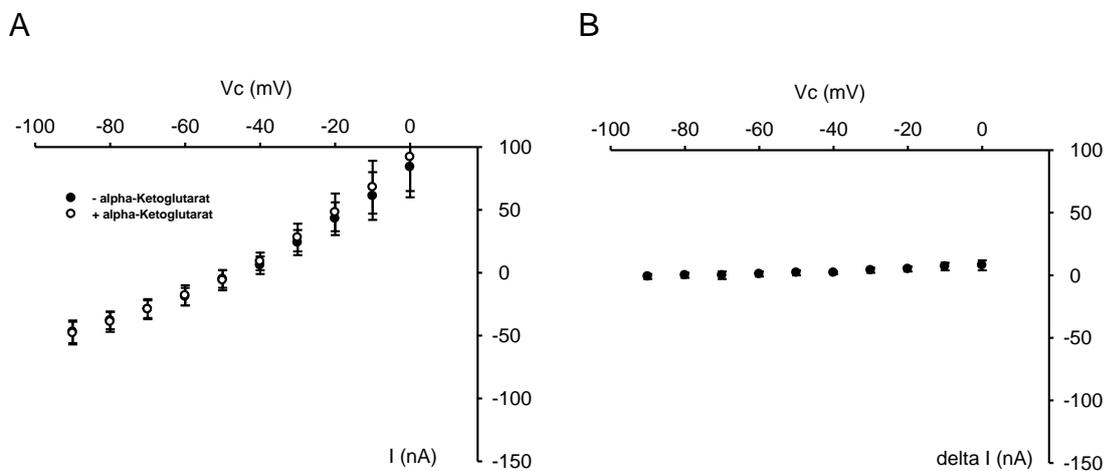
Die Koexpression mit *sgk3* führte bei einem Klemmpotential von  $-60$  mV zu einer Verdopplung des  $\alpha$ KG-induzierten Stromes von  $-37,5 \pm 11,5$  nA ohne Koexpression auf  $-71,0 \pm 19,1$  nA mit Koexpression der *sgk3*. Die Strom-Spannungskennlinien verlaufen demnach nach Koexpression mit *sgk3* steiler (Abb. 25A-B).

Die ausschließliche Injektion von *sgk3* (Abb. 26A-B) führte ähnlich wie die ausschließliche Injektion von *sgk1* (Abb. 19A-B) zu einem Potential-unabhängigen Strom kleiner Amplitude. Wasser-injizierte Oozyten zeigten ebenfalls – wie bereits in der Abbildung 17A-B gezeigte – vergleichbare Strom-Spannungskennlinien. Auf eine separate Abbildung wurde deshalb verzichtet.



### Abbildung 25A-B: I-V-Kennlinie hNaDC3+sgk3-Oozyten

Strom-Spannungs- (I-V-) Kennlinien hNaDC3 + sgk3-koinjizierter Oozyten in Ab- (●) und Anwesenheit von 1 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat (○) gelöst in ORi (A) und die aus A errechneten  $\alpha$ -Ketoglutarat-vermittelten Ströme (B). Die Graphiken zeigen Mittelwerte aus neun Messungen an Oozyten von acht Spendertieren.

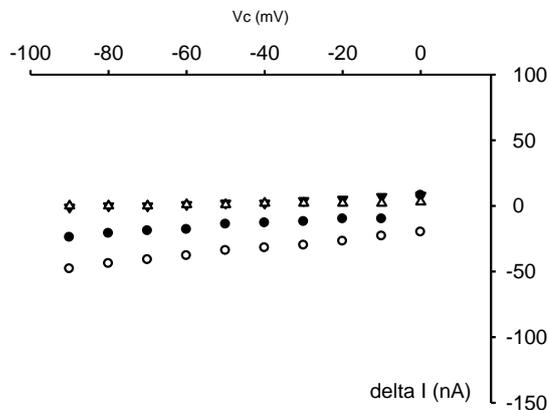


### Abbildung 26A-B: I-V-Kennlinie sgk3-Oozyten

Strom-Spannungs- (I-V-) Kennlinien sgk3-injizierter Oozyten in Ab- (●) und Anwesenheit von 1 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat (○) gelöst in ORi (A) und die aus A errechneten  $\alpha$ -Ketoglutarat-vermittelten Ströme (B). Die Graphiken zeigen Mittelwerte aus neun Messungen an Oozyten von acht Spendertieren.

Auch für diese Versuchsreihen wurden - aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit - die Daten noch einmal in einer gemeinsamen Abbildung (Abb. 27) zusammengefasst. Besonders deutlich sind die unterschiedlichen Steilheiten der I-V-Kennlinien bei den

unterschiedlichen Versuchsansätzen und die, im Vergleich zu hNaDC3-injizierten, größeren Stromamplituden der hNaDC3 plus sgk3-injizierten Oozyten zu erkennen.

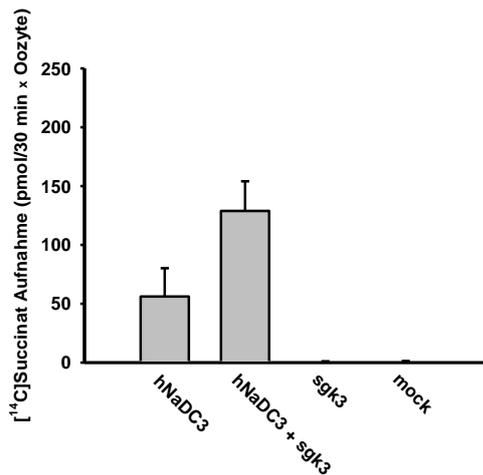


**Abbildung 27: Zusammenfassung der Abbildungen 24 - 26**

Abhängigkeit vom Klemmpotential  $\alpha$ -Ketoglutarat-vermittelter Ströme in hNaDC3 (●), hNaDC3 + sgk3- (○), sgk3- (△) und mock- (▼) exprimierenden Oozyten. Die Abbildung zeigt eine Zusammenfassung der in den Abbildungen 24, 25 und 26 vorgestellten Daten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist auf das Einzeichnen der Standardabweichungen verzichtet worden.

### 3.2.2 Einfluss der sgk3 auf die Aufnahme radioaktiv-markierten Succinates

Auch in dieser Versuchsperiode wurde die Aufnahme von [ $^{14}$ C]-Succinat in Oozyten gemessen, die ausschließlich den hNaDC3 oder den hNaDC3 und die sgk3 exprimiert hatten. Als Kontrolle dienten wiederum Oozyten, die entweder mit einer entsprechenden Menge an Wasser oder an sgk3 injiziert worden waren. Im Gegensatz zu den elektrophysiologischen Experimenten war die Aufnahme an Succinat in den hNaDC3-exprimierenden Oozyten niedriger als in den hNaDC3 plus sgk3-injizierten Oozyten. Sie betrug  $56,1 \pm 24,1$  pmol/30 min. Die Koexpression mit sgk3 erhöhte die Aufnahme von Succinat signifikant ( $p < 0,05$ ) auf  $128,9 \pm 25,2$  pmol/30 min. Die Aufnahme von Succinat in den jeweiligen Kontrollen war vernachlässigbar. Die Daten wurden aus drei voneinander unabhängigen Experimenten rekrutiert. Die Versuche zeigen, dass die sgk3 die Substrataufnahme über den hNaDC3 deutlich unabhängig vom Substrat (Succinat in den Experimenten mit radioaktiv-markiertem Succinat und  $\alpha$ -Ketoglutarat in den elektrophysiologischen Experimenten) beeinflusst.



**Abbildung 28: Aufnahme des [<sup>14</sup>C]-markierten Succinates (sgk3)**

Dargestellt ist die Aufnahme [<sup>14</sup>C]-markierten Succinates in hNaDC3-exprimierenden Oozyten mit und ohne Koexpression der sgk3. Die Daten stellen Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten mit jeweils zehn bis zwölf Oozyten pro experimentelle Gruppe dar.

### 3.2.3 Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter

Da sowohl die  $\alpha$ -Ketoglutarat-induzierten Ströme als auch die Aufnahme von Succinat in Oozyten, die neben dem hNaDC3 zusätzlich die sgk3 exprimiert hatten, höher war als in Oozyten, die ausschließlich mit hNaDC3-cRNA injiziert waren, musste in Analogie zu den Versuchen mit sgk1 untersucht werden, ob diese Änderungen auf geänderte Transportraten oder Affinitäten zurückzuführen sind. Deshalb wurden bei einem Klemmpotential von  $-60$  mV die durch aufsteigende Konzentrationen an  $\alpha$ -Ketoglutarat hervorgerufenen Ströme an hNaDC3- und hNaDC3 plus sgk3-exprimierenden Oozyten gemessen. Die Ergebnisse, die an jeweils drei bis vier Oozyten von drei Spendertieren gewonnen wurden, sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Die Daten wurden mit einem modifizierten SigmaPlot-Programm berechnet. Sie zeigen einen Anstieg von  $I_{\max}$ , aber keine Veränderung der  $K_m$  durch die sgk3 an.

**Tabelle 14: Affinität und maximale Transportrate sgk3**

Bestimmung der Affinität ( $K_m$ ) und der maximalen Transportrate ( $I_{max}$ )  $\alpha$ KG-induzierter Ströme gemessen an hNaDC3- und hNaDC3 plus sgk3-exprimierenden Oozyten. n: Anzahl der gemessenen Oozyten, m: Anzahl der Spendertiere.

Bedingung	$K_m$ ( $\mu$ M)	$I_{max}$ (nA)	n/m
hNaDC3	$16,3 \pm 4,8$	$-39,0 \pm 2,5$	3/3
hNaDC3, sgk3	$23,5 \pm 6,5$	$-87,5 \pm 15,6$	4/3

### 3.2.4 I-V-Kennlinien $\alpha$ KG-induzierbarer Ströme ohne und mit Koexpression von sgk3 während der Perfusion mit Natrium-freien oder Lithium-haltigen Lösungen

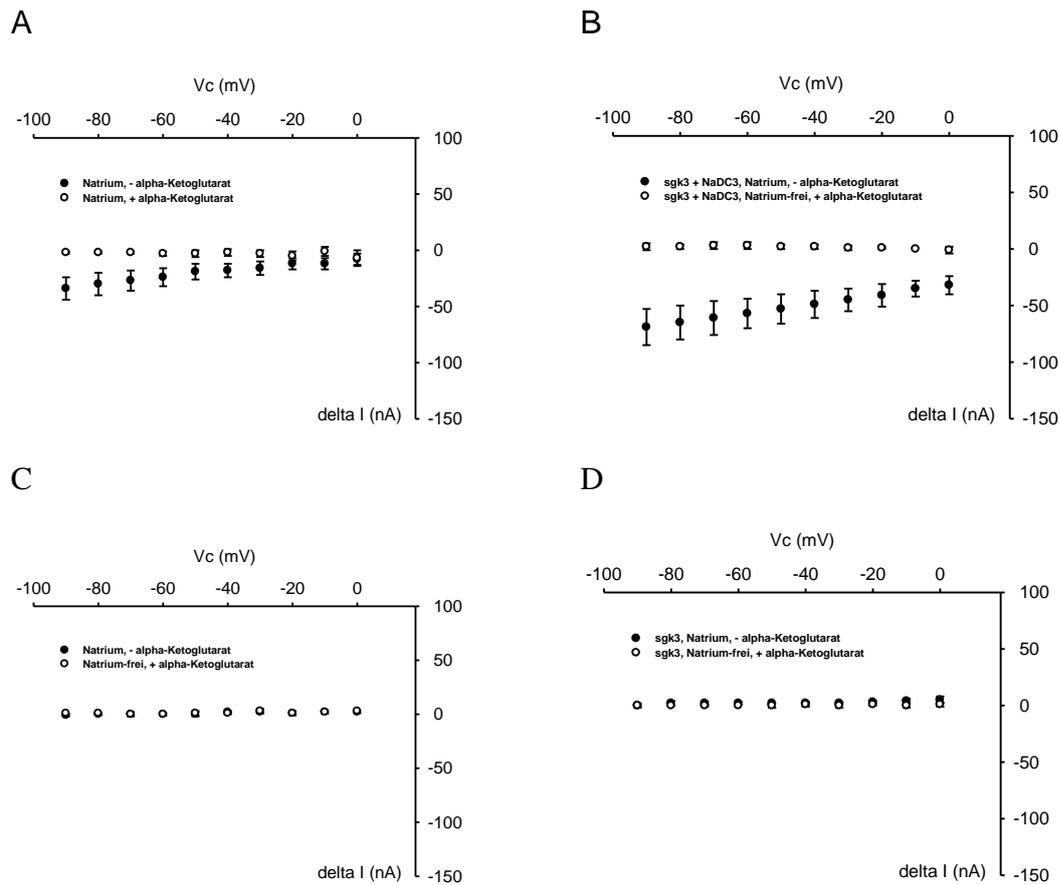
Da der hNaDC3 ein Natrium-abhängiger und teilweise Lithium-sensitiver Transporter ist und unbekannt ist, welchen Einfluss die sgk3 auf Änderungen der Natrium- und Lithiumkonzentration im Perfusionsmedium hat, wurde ein ähnliches Protokoll, wie schon bei der sgk1 erprobt, durchgeführt.

**Tabelle 15: Überprüfung der Natriumabhängigkeit sgk3**

Übersicht über die zur Überprüfung der Natriumabhängigkeit durchgeführten Versuche.

$\alpha$ KG:  $\alpha$ -Ketoglutarat, NMDG: N-Methyl-D-Glucamin, mock: Wasser-injiziert.

	Natrium	Natrium, $\alpha$ KG	NMDG	NMDG, $\alpha$ KG
hNaDC3	✓	✓	✓	✓
hNaDC3, sgk3	✓	✓	✓	✓
mock	✓	✓	✓	✓
mock, sgk3	✓	✓	✓	✓



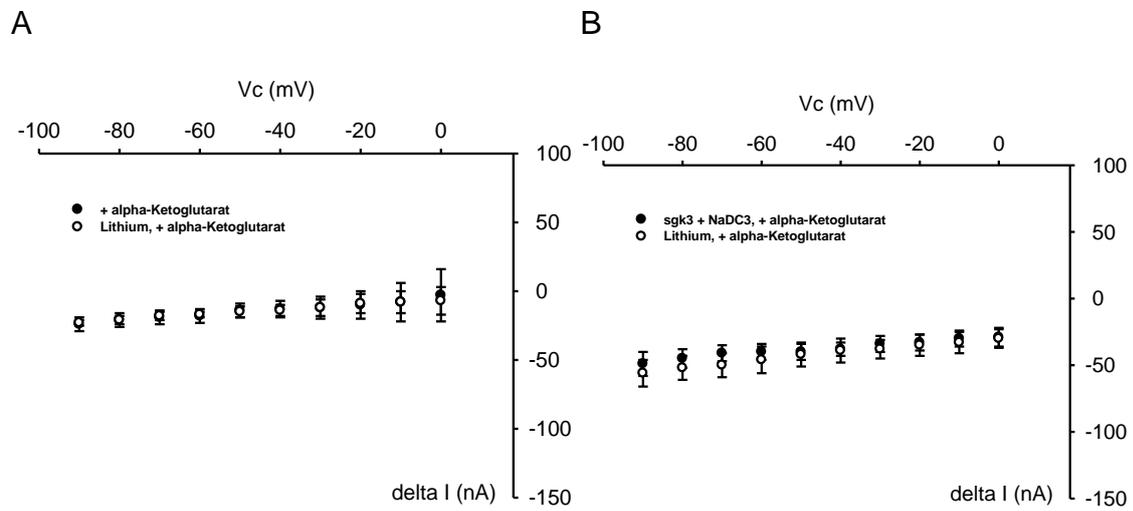
#### Abbildung 29A-D: Natriumabhängigkeit der *sgk3*

Dargestellt sind Mittelwerte  $\alpha$ -Ketoglutarat-induzierbarer Ströme ( $\Delta I$ ) in hNaDC3- (A), hNaDC3 + *sgk3*- (B) und den jeweiligen mock- (C) und *sgk3*- (D) injizierten Oozyten. Pro Bedingung konnten nur drei Oozyten in die Auswertung genommen werden, da in den meisten Versuchen, bedingt durch die Natrium-freie Perfusion, zu große Fluktuationen der Oozyten registriert wurden, sodass eine Auswertung nicht möglich war.

Die Versuche bestätigen die Natriumabhängigkeit der Substrat-induzierbaren Ströme für den hNaDC3. Der nach Koexpression mit der *sgk3* beobachtete angestiegene Einwärtsstrom ist ebenfalls Natrium-abhängig und kommt nach Superfusion der Oozyte mit NMDG-haltiger Lösung zum Erliegen.

Die simultane Applikation von 2 mM Lithium und 1 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat gelöst in ORI führt bei gleichem Klemmpotential nur zu einem marginalen Abfall der Stromamplitude. Nach Koexpression mit *sgk3* steigt, wie bereits in früheren Versuchen gesehen und in den Abbildungen 30A-B dargestellt, der  $\alpha$ -Ketoglutarat-medierte Strom an. Dieser bleibt jedoch von Lithium unbeeinflusst. Da die Wasser- und Wasser plus *sgk3*-injizierten

Oozyten nur Ströme geringfügiger Amplitude induzierten, wurde auf eine separate Darstellung verzichtet.



#### Abbildung 30A-B: Lithiumabhängigkeit der sgk3

Dargestellt sind Mittelwerte  $\alpha$ -Ketoglutarat-induzierbarer Ströme (delta I) in Ab- und Anwesenheit von Lithium in hNaDC3- (A) und hNaDC3 + sgk3-injizierten Oozyten (B). Pro Bedingung wurden drei Oozyten in die Auswertung genommen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Vorteile der *Xenopus-laevis*-Oozyten als Expressionsmodell

#### 4.1.1 Endogene Transporter in *Xenopus-laevis*-Oozyten

*Xenopus-laevis*-Oozyten sind in der Forschung zu einem bevorzugten heterologen Expressionsmodell für Ionenkanäle, Rezeptoren und Transporter geworden. Ihr Ursprung als Expressionsmodell geht auf die von Gurdon im Jahre 1971 gemachten und in Nature veröffentlichten Schlüsselbeobachtungen (Gurdon et al. 1971) zurück. Er stellte die Vermutung auf, dass die Oozyten als ein generell suffizientes Expressionsmodell für fremde, in die *Xenopus-laevis*-Oozyten injizierte, messenger RNA dienen könnten und zeigte dies an der Translation von Hämoglobin. Gundersen und Miledi nutzten 1983 erstmals die *Xenopus-laevis*-Oozyten als Expressionssystem von Rezeptoren und Ionenkanälen (Gundersen et al. 1983; Miledi et al. 1983). Bei der Auswertung der Messergebnisse ist zu berücksichtigen, dass die Oozyten ebenfalls über endogene Transporter verfügen, die gegebenenfalls mit den heterologen Proteinen interferieren und so auf die Messergebnisse einen Einfluss haben können. Eine Übersichtsarbeit von Sobczak aus dem Jahre 2010 geht auf die bis dato untersuchten endogenen Transportsysteme der *Xenopus-laevis*-Oozyten ein. Sie beschreibt passive sowie aktive endogene Transporter (Sobczak et al. 2010).

**Tabelle 16: Endogene Transportsysteme der *Xenopus-laevis*-Oozyten**

nach Sobczak et al. 2010; die Abkürzungen wurden aus den Originalarbeiten übernommen.

Passive Transporter	Referenz (Erstbeschreiber, sofern möglich)
Isoform des Insulin-sensitiven Glucose-Carriers GLUT4	Panayotova-Heiermann et al. 1997
Riboflavin-Carrier	Dyer und Said 1995
Phosphat-Carrier	Eckard und Passow 1987
Ammonium-Carrier	Boldt et al. 2003
Protonen-Carrier	Burckhardt et al. 1992
Carrier für sekundäre und tertiäre Amine	Burckhardt und Frömter 1992

Ionenkanäle	
Anionenkanäle	
Ca <sup>2+</sup> -aktivierter Chloridkanal (CaC-C)	Miledi 1982
Volumensensitiver Chloridkanal (Cl <sup>-</sup> vol)	Ackerman et al. 1994
Hyperpolarisationsaktivierter Chloridkanal	Jentsch et al. 1990
Ca <sup>2+</sup> -inaktivierter Chloridkanal (CaIC)	Weber et al. 1995
Kationenkanäle	
Kaliumkanäle	Parker und Ivorra 1990
Natriumkanäle	Baud et al. 1982
Spannungsabhängige Ca <sup>2+</sup> -Kanäle (VDCC)	
L-Typ	Dascal et al. 1986
T-Typ	Lory et al. 1990
N-Typ	Lacerda et al. 1994
Store-operated Ca <sup>2+</sup> -Kanäle (SOCC)	Lacerda et al. 1994; Berridge 1988
Nichtselektive Kationenkanäle (NSCC)	Kowdley et al. 1994
Mechanosensitive Kationenkanäle; <i>Stretch-activated cation channels</i> (MSCC)	Sakmann et al. 1985
Wasserkanäle/ Aquaporine	Virkki et al. 2002
Aktive Transporter	
Primär-aktive Transporter	
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase	Lafaire und Schwarz 1986
Ca <sup>2+</sup> -ATPase	Gillo et al. 1996
sekundär-aktive Transporter	
Natrium-Glucose-Kotransporter	Weber et al. 1989
Natrium-Alanin-Kotransporter	Jung et al. 1984a,b; Richter et al. 1984
Natrium-Glutamin-Kotransporter	Mackenzie et al. 1994
Natrium-Glutamat-Kotransporter	Bellé et al. 1976
Natrium-Arginin-Kotransporter	Taylor et al. 1989
Natrium-Leucin-Kotransporter	Mackenzie et al. 1994
Natrium-Phosphat-Kotransporter	Eckard und Passow 1987
Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup> -Antiporter	Burckhardt et al. 1992
Na <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Antiporter	Schlieff und Heinemann 1995

Insgesamt führen diese endogenen Transporter der oozytären Zellmembran zu keinen bzw. nur sehr geringen Strömen, wenn es sich um elektrogene Transporter handelt. Das Ruhemembranpotential ist stabil, solange sich die Oozyte in der Ringer-Lösung befindet. Laut Dascal (1987) sei die Zahl der endogen exprimierten zur Anzahl der heterolog exprimierten Proteinen sehr gering. Im Jahre 1995 berechneten Zampighi et al., dass eine mit cRNA injizierte Oozyte zwischen  $10^{10}$  und  $10^{11}$  Kopien des zu exprimierenden heterologen Proteins enthält. Diese heterologen Proteine sind, wiederum soweit es sich um elektrogene Transporter handelt, für den wesentlichen Anteil des messbaren Stromes über die Oozytenmembran verantwortlich und maskieren, die durch die endogenen Transporter entstehenden Ströme. Dies wird auch durch eine, in dieser Dissertation beschriebene Messreihe deutlich: Die Oozyten, in die statt einer proteinkodierenden cRNA nur Wasser injiziert wurde, zeigten bei der Zugabe von Succinat,  $\alpha$ KG, Lithium etc. keine oder kaum nachweisbare Ströme bzw. der Haltestrom bleibt konstant. Daraus lässt sich schließen, dass die zugeführten Substanzen keinen Einfluss auf die endogenen Transporter der *Xenopus-laevis*-Oozyte haben und so zu keinen messbaren Strömen führen. Dies zeigt, dass keine ergebnisrelevante Beeinflussung der endogenen Transporter auf die Messergebnisse stattgefunden hat.

#### 4.1.2 *Xenopus-laevis*-Oozyten als Expressionsmodell

Die Beliebtheit als Expressionsmodell beruht auf zahlreichen Vorteilen. Zum einen sind die Oozyten mit einem Durchmesser von 1 bis 1,3 mm und einer Membranoberfläche von 18 – 20 mm<sup>2</sup> gut zu handhaben (Sigel 1990; Vasilets 1990). Des Weiteren sind die Oozyten sehr resistent (Sigel und Minier 2005) und exprimieren eine enorme Zahl an cRNA und cDNA, was möglicherweise auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass die Oozyten in ihrem üblichen Habitat sehr widrigen Umständen ausgesetzt sind. Der Krallenfrosch lebt in Südafrika in Teichen oder toten Flussarmen. So sind die Oozyten darauf angewiesen, die Vielzahl an notwendigen Organellen, Nährstoffen und Enzymen bereits in sich zu tragen. Die Oozyten tolerieren das Durchführen mehrerer experimenteller Bedingungen hintereinander, beispielsweise bei elektrophysiologischen Versuchen, soweit die applizierten Substanzen keine toxischen Wirkungen auf die Oozyten haben und ausreichend lange Auswaschphasen eingehalten werden. Dies mag auf die hohe mechanische Resistenz der Oozyten zurückzuführen sein. In der Genese der *Xenopus-laevis*-Oozyten lassen sich nach Dumont sechs Reifestadien unterscheiden (Dumont 1972). Im Ovar des Frosches finden sich zeitgleich alle Wachstumsstadien der Oozytengnese

(Smith et al. 1991). Für die Versuchsreihe wurden die Stadien V und VI ausgewählt, um eine möglichst homogene Proteinausstattung für die erforderliche Translation zu gewährleisten. Das Ruhemembranpotential einer intakten Oozyte kann zwischen  $-30$  und  $-70$  mV liegen (Weber 1999; siehe Tabelle 17).

**Tabelle 17: Ruhemembranpotentiale der Stadien V und VI nach Dumont**

Das Ruhemembranpotential der *Xenopus-laevis*-Oozyte unterliegt starken Schwankungen, die auf unterschiedliche Oozyten-Ringer-Lösungen zurückzuführen sind.

Ruhemembranpotential der Oozyte (mV)	Referenz
-27	Kusano et al. 1982
-41	Costa et al. 1989
-50	Weber et al. 1995
-47	Liebold et al. 1996
-59	Milovanovic et al. 1991

Membranpotentiale im Bereich zwischen  $-41$  und  $-59$  mV spiegeln das Nernst- bzw. das Kalium-Diffusionspotential wider. Dies lässt den Schluss zu, dass die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase der entscheidende Transporter zum Entstehen des Ruhemembranpotentials der Oozyte ist (Lafaire und Schwarz 1986).

**Tabelle 18: Intrazelluläre Ionenkonzentrationen von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$**

(modifiziert nach Sobczak et al. 2010)

Ion	Konzentration (mM)	Referenz
$\text{Na}^+$	6	Barish 1983
	9	Cougnon et al. 1996
	10	Costa et al. 1989
	23	Kusano et al.1982
$\text{K}^+$	76	Cougnon et al. 1996
	92	Barish 1983
	110	Costa et al. 1989
	148	Kusano et al.1982
$\text{Cl}^-$	24	Cougnon et al. 1996
	33	Barish 1983
	38	Costa et al. 1989
	62	Kusano et al. 1982

Das Ruhemembranpotential jeder lebenden Zelle entsteht durch die Ionenkonzentrationsunterschiede zwischen intra- und extrazellulär. Dass die Ionenkonzentrationen der Oozyten und das sich daraus errechenbare Membranpotential nicht konstant sind, könnte auf die unterschiedlichen Pufferlösungen oder saisonalbedingte Schwankungen hinweisen.

## 4.2 Vergleich der Einflüsse der sgk auf hNaDC3 und rNaDC1

Untersuchungen der sgk auf den humanen NaDC1 sind in der bisherigen Literatur nicht erfolgt. Boehmer untersuchte in 2004 am Oozyten-Expressionsmodell mittels Two-Electrode-Voltage Clamp ausführlich die Wirkung der humanen sgk1, 2 und 3 auf den NaDC1 der Ratte, rNaDC1, sowie einer „aktiven sgk1 (SGK1<sub>S422D</sub>)“ und einer „inaktiven sgk1 (K<sub>127N</sub>SGK1)“ (Boehmer et al. 2004a). In Abwesenheit von sgk1 wurden bei einem Haltepotential von  $-50$  mV Ströme von  $-41 \pm 4,1$  nA detektiert. Koexpression des rNaDC1 mit sgk1 zeigte eine Zunahme des Stromes auf  $-78,6 \pm 12,3$  nA, Koexpression mit sgk3 eine Stimulation auf  $-86,3 \pm 7,1$  nA. Wurde rNaDC1 mit SGK1<sub>S422D</sub> koexprimiert, erhöhte sich der Strom bei  $-50$  mV auf  $-118,8 \pm 5,2$  nA. Bei Koexpression mit der inaktiven Form K<sub>127N</sub>SGK1 lag der Strom bei  $-36,2 \pm 7,3$  nA. In Wasser-injizierten Oozyten konnten keine Substrat- und sgk1-spezifischen Ströme nachgewiesen werden. In der Versuchsreihe von Boehmer wurde gezeigt, dass die humane sgk1 und 3 (hsgk1 und 3) stimulierend auf die Funktion des rNaDC1 wirken. Im Gegensatz dazu war in meinen Versuchen sowohl der  $\alpha$ KG-vermittelte Strom als auch die Aufnahme radioaktiv-markierten Succinates durch hsgk1 gehemmt (Kapitel 3.1.1 Abb. 18 und Kapitel 3.1.2 Abb. 21). In Analogie zu Boehmer stimulierte hsgk3 sowohl den hNaDC3-vermittelten Strom als auch die Succinataufnahme (Kapitel 3.2.1 Abb. 25 und Kapitel 3.2.2 Abb. 28).

Diese Ergebnisse sind im Zusammenspiel der Transporter im proximalen Tubulus zu sehen. Wie bereits in Abbildung 2 in der Einleitung dargestellt, dienen der NaDC1 und 3 unter anderem der Bereitstellung von  $\alpha$ KG und anderen Dikarboxylaten, die die OATs zum Transport ihrer Anionen benötigen. Kaufhold et al. konnten 2011 zeigen, dass für OAT1, 3 und hNaDC3 eine gemeinsame hohe Affinität für  $\alpha$ KG besteht. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass  $\alpha$ KG das bevorzugte Substrat für dieses Transportsystem ist: hNaDC3 liefert OAT1 und OAT3 das erforderliche Substrat  $\alpha$ KG, welches aus der Zelle im Austausch für das aufzunehmende organische Anion ausgeschleust wird. Dantzer konnte in seinen Untersuchungen feststellen, dass der NaDC3 57% des für den

basolateralen Austausch organischer Anionen via OAT1 und 3 benötigten  $\alpha$ KG bereitstellt (Dantzer 2002). Zu überlegen wäre also eine Wiederholung des von Boehmer et al. durchgeführten Versuchs mit Änderungen einzelner Details. Zunächst sollte man statt des Homologen der Ratte den humanen NaDC1 wählen sowie möglicherweise  $\alpha$ KG statt Succinat. Immer wieder zeigen sich Speziesunterschiede in Hinsicht auf Affinität bzgl. Substraten, Inhibierung und Stimulierung, so dass eine Mischung zwischen humaner sgk und NaDC1 der Ratte nur der Anfang genauerer Untersuchungen sein kann (Pajor 2013).

Da hNaDC1 und hNaDC3 die „Substrat-Lieferanten“ für den transzellulären Anionentransport der OATs im proximalen Tubulus sind, wäre es interessant zu untersuchen, ob sgk1 und 3 einen direkten Einfluss auf Mitglieder der OAT/ SLC22 Transporter-Familie haben. Hier müssten sich die Messungen allerdings auf die Aufnahme radioaktiv markierter Substrate beschränken, da OAT1 und OAT3 in einem elektro-neutralen Modus verlaufen und sich deshalb elektrophysiologischen Nachweisverfahren entziehen.

### 4.3 Einfluss von Lithium

#### 4.3.1 Medizinische Anwendung von Lithium

Lithium befindet sich zum einem in geringer Menge physiologisch im menschlichen Körper ( $<0,2$  mEq/l) (Oliveira et al. 2010). Aufgrund seiner positiven Effekte auf Gemüts-erkrankungen nimmt man eine Wechselwirkung mit Neuronen an. Genaueres ist hierzu leider noch nicht bekannt. In der Therapie der bipolar-affektiven Störung ist Lithium ein wichtiges Medikament zur Phasenprophylaxe. Weitere Anwendungsgebiete sind der Alkoholismus im Formenkreis der Suchterkrankungen, die schizoaffektive Störung sowie der Clusterkopfschmerz. Erstmals fanden Lithiumsalze vor etwa 150 Jahren Verwendung in der Medizin. Im 19. Jahrhundert führten Garrod und Hammond Lithium in die Therapie der Gicht und zur Behandlung von Nierensteinen ein (Oliveira et al. 2010). Ab etwa 1880 wurde die Substanz, eingeleitet durch John Aulde und Carl Lange, in der Therapie der Depression eingesetzt (Shorter 2009). Es entwickelte sich eine breitgefächerte Anwendung dieser Substanz bis zur Verwendung in Tonika, Elixieren und als Salzersatz. Aufgrund seiner toxischen Wirkung sah man mit der Zeit von der weiteren Verwendung ab und die Substanz wurde nicht mehr medizinisch genutzt. Die Wiederentdeckung und die damit

verbundene erneute Anwendung sowie die wissenschaftliche Untersuchung des Lithiums begann unter Cade und Schou in den 1950er Jahren (Shorter 2009). Sie etablierten Lithium als ein wirkungsvolles Medikament in der Therapie der bipolar-affektiven Störung. Zu beachten ist hierbei eine enge therapeutische Breite. Grundsätzlich sollte der Blutplasmaspiegel zwischen 0,6 und 1,2 mEq/l liegen. Bei der Therapie einer akuten manischen Phase sind Plasmaspiegel bis 1,5 mEq/l tolerabel. Ab 1,5 mEq/l besteht die Gefahr einer Lithiumintoxikation, die im schlimmsten Fall mit einer akuten Hämodialyse behandelt werden muss (Timmer und Sands 1999). Die langfristige Lithiumbehandlung kann zu einer Nephropathie mit der Reduktion der glomerulären Filtrationsrate führen (Uwai Y et al. 2015). Lithium wird beinahe ausschließlich über die Nieren ausgeschieden. Die Lithiumclearance ist proportional zur Kreatininclearance und wird durch natriuretische und anti-natriuretische Faktoren beeinflusst (Rybakowski et al. 2012). Die Reabsorption von etwa 70 – 80% findet im proximalen Tubulus statt. Physiologische Untersuchungen konnten zeigen, dass Lithium sowohl Natrium als auch Kalium an Membrantransportern bzw. -kanälen ersetzen kann. So gelangt die Substanz in die Zelle. Da wohl kaum Wege zu einem Transport nach extrazellulär bestehen, kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation. Die genauen Möglichkeiten von Lithium, in Interaktion zu treten, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Die drei wichtigsten Membrantransporter der Niere, die einen Lithiumtransport ermöglichen, sind der Amilorid-sensitive Natriumkanal (ENaC), der  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -Austauscher und der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$ -Kotransporter (NKCC2, BSC1) (Timmer und Sands 1999). Weiterhin wurden der NaDC1- und NaDC3-Transporter auf ihre Interaktion mit Lithium untersucht, da man auch hier annahm, dass Natrium durch Lithium ersetzt werden könnte (Pajor und Sun 1996; Pajor et al. 1998; Burckhardt et al. 2004).

#### 4.3.2 Lithiumergebnisse des hNaDC3 im Vergleich zum hNaDC1

Pajor und Sun verglichen in ihrer Arbeit aus dem Jahr 1996 Funktionsunterschiede zwischen dem Kaninchen, NaDC1 (rNaDC1) im Vergleich zum humanen NaDC1 (hNaDC1). Hieraus ergeben sich folgende Ergebnisse für den hNaDC1. Der Succinattransport des hNaDC1 wird bei einer Lithiumkonzentration von 10 mM um ca. 20% gehemmt und bei 20 mM um ca. 50% (Pajor und Sun 1996). Im Vergleich dazu zeigt der Kaninchen NaDC1 bei einer Lithiumkonzentration von 2,5 mM bereits eine Inhibition von 60%. Bereits 2004 untersuchte die Arbeitsgruppe um BC Burckhardt den Einfluss von Lithium auf den humanen NaDC3. In diesen Untersuchungen wurde Succinat als Substrat verwendet. Zuvor erfolgte Untersuchungen an Ratten- und Flunder-NaDC3 zeigten in

Anwesenheit von Lithium eine deutliche Hemmung des Transports. Das Interesse galt nun der Erforschung der Auswirkungen auf den humanen Orthologen. Burckhardt BC veröffentlichte ihre Ergebnisse im Jahre 2004. Im Gegensatz zu den Orthologen der Ratte, Maus und Flunder fand am hNaDC3 durch die Lithiumanwesenheit bei gleichzeitiger Anwesenheit von Natrium und Succinat kaum eine Hemmung statt. Der Succinattransport wurde unter steigender Lithiumkonzentration von 0,1 bis 5 mM untersucht. War kein zusätzliches Lithium vorhanden, war ein üblicher Succinattransport zu verzeichnen. Mit steigender Lithium-Konzentration bis 5 mM nahm die Rate des messbaren Stromes nur in einem geringen Maße ab. In Anlehnung an diese Ergebnisse erfolgten die in dieser Arbeit durchgeführten weiterführenden Untersuchungen unter Berücksichtigung der Koexpression mit *sgk1* und *sgk3*. Die Ergebnisse zeigen bei einer Lithiumkonzentration von 2 mM keinen Einfluss auf die Aktivität des hNaDC3, hNaDC3 plus *sgk1* und hNaDC3 plus *sgk3* (Kapitel 3.1.4 Abb. 23 und Kapitel 3.2.4 Abb. 30). Dies lässt den Schluss zu, dass die Lithiumtherapie bei Berücksichtigung der therapeutischen Breite von 0,6 und 1,2 mEq/l (sowie 1,5 mEq/l in der akuten Phasen) zu keinen Störungen dieses Transportsystems führt.

Zu erwähnen bleibt nur ein Phänomen, das nicht genauer geklärt werden konnte: bei *sgk1*-injizierten Oozyten konnte in Anwesenheit von Lithium eine geringfügige Potentialabhängigkeit der Ströme nachgewiesen werden (Kapitel 3.1.4 Abb. 23). NaDC3 war in diesem Fall nicht injiziert worden. Möglich wäre eine Beeinflussung endogener Transporter der Oozytenmembran, die durch die Anwesenheit der *sgk1* erst möglich wird (bisher bekannte endogene Transporter der Oozyte: Tabelle 16).

#### **4.4 Relevanz des hNaDC3 und der *sgk* im Alterungsprozess**

##### **4.4.1 Einfluss des hNaDC3 auf den Alterungsprozess**

Der Alterungsprozess ist ein komplexer biologischer Vorgang. Diskutiert werden Zusammenhänge und Interaktionen zwischen genetischen Prozessen und verschiedenen Umwelteinflüssen beispielsweise der Kalorienrestriktion. In der Forschung kristallisieren sich zahlreiche Ansatzpunkte heraus, die zur Manipulation der Lebensdauer einzelner Spezies bereits geeignet sind oder in Zukunft geeignet sein könnten. Im Jahr 2000 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Rogina et al. Ergebnisse, in denen nahezu eine

Verdoppelung der Lebenszeit der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben wird (Rogina et al. 2000). Hierfür wurde ein Gen manipuliert und somit die Funktion des entsprechenden Proteins aufgehoben. Dieses Gen wurde Indy genannt und ist ein Akronym mit der Bedeutung: *I am not dead yet*. Übersetzt heißt dies: Noch bin ich nicht tot. Die Genmanipulation hat weder Auswirkungen auf die Fortpflanzungsfähigkeit noch auf die physische Aktivität der adulten Fruchtfliegen. Es wird diskutiert, ob die fehlende Funktion des Indy-Proteins zu einem Energiemangelzustand führt und somit der Verlängerung der Lebensspanne aufgrund nutritiver Kalorienrestriktion bei Wirbeltieren ähnelt (Rogina et al. 2000). Die lebensverlängernde Wirkung der Kalorienrestriktion auf zahlreiche Spezies ist bereits seit vielen Jahrzehnten bekannt, wobei der genaue Wirkmechanismus bisher ungeklärt geblieben ist (Wang et al. 2009). Erste wissenschaftlich untersuchte und publizierte Beobachtungen diesbezüglich gehen auf die 20er und 30er Jahre des 20. Jahrhunderts zurück. Das im Jahr 2000 beschriebene Indy-Protein gehört aufgrund seiner Aminosäuresequenzähnlichkeit zur Familie der SLC13-Gruppe. Die Ähnlichkeit zwischen dem *Drosophila*- Indy, drIndy und hNaDC1 beträgt 35% und zum hNaDC3 34% (Inoue et al. 2002a). Dennoch ist weder hNaDC1 noch hNaDC3 der Orthologe zu drIndy. Die Transportfunktion wurde 2002 von Inoue et al. identifiziert und beschrieben. Man stellte fest, dass das Indy-Protein drei wesentliche Unterschiede aufweist: Der Transport erfolgt  $\text{Na}^+$ -unabhängig, er ist elektroneutral und zeigt die höchste Selektivität für Citrat an (Inoue et al. 2002; Knauf et al. 2002). Rogers und Rogina sehen die größte Ähnlichkeit zu SLC13A5, dem NaCT. Es herrscht eine 34%-Identität und ca. 50% Ähnlichkeit (Rogers und Rogina 2015). Interessanter hingegen ist unter Berücksichtigung dieser Dissertation eine Untersuchung von Fei et al. aus dem Jahr 2003. Er klonete die Homologen des NaDC1 und NaDC3 aus *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). *C. elegans* bietet sich für experimentelle Untersuchungen zur Lebensspanne aus diversen Gründen an: die durchschnittliche Lebenszeit beträgt 15 Tage, und es gibt bereits etablierte Techniken zur Manipulation der Gene. Es konnten zwei Homologe geklont werden. CeNaDC1 (ceNAC-1) entspricht dem NaDC1 und ceNaDC2 (ceNAC-3) entspricht NaDC3. Es zeigte sich, dass die Manipulation von ceNaDC2, dem hochaffinen Transporter und Homologen zu NaDC3, zu einer signifikanten Lebenszeitverlängerung von *C. elegans* führte. Manipulationen am niedrig-affinen ceNaDC1 zeigten keine Auswirkungen auf die Lebenszeit (Fei et al. 2003). Dieser Aspekt zur anscheinend lebensverlängernden Wirkung bei Aufhebung der Transportaktivität der SLC13-Transporter ist aber unter Berücksichtigung des OAT-Transportsystems verwunderlich. So dienen die OATs u. a. schließlich der renalen

Exkretion zahlreicher Toxine, nicht benötigter Metabolite, Pharmaka, Lebensmittelerstoffsstoffe etc., so dass hier von einer protektiven Wirkung der OATs und damit auch der NaDCs auszugehen ist. Wie es hier aber bei einer Akkumulation dieser „Giftstoffe“ trotzdem zu einer Lebensverlängerung kommen kann, bleibt zunächst noch ein Widerspruch, dessen Lösung anderen vorbehalten bleibt.

#### 4.4.2 Einfluss der sgk auf den Alterungsprozess

Wie bereits in der Einleitung erläutert, gehört die sgk zur AGC-Familie der Serin-Threonin-Kinasen, welche durch ihre Beteiligung in zahlreichen intrazellulären Signalwegen das Überleben, das Wachstum, die Proliferation, den Metabolismus und Weiteres beeinflussen (Pearce et al. 2010). Hertweck konnte im Jahr 2004 in ihrer Versuchsreihe mit *C. elegans* zeigen, dass mittels RNA-Interferenz (Gen-Knockdown) der *sgk1* eine verlängerte Lebenszeit resultiert (Hertweck et al. 2004). Wird stattdessen eine *sgk1*-Null-Mutation (Gen-Knockout) durchgeführt, resultiert dies in einer verkürzten Lebensspanne der Spezies (Soukas et al. 2009; Alam et al. 2010; Kwon et al. 2010). Der Mechanismus, dem diese unterschiedliche Regulation der Lebenszeit zu Grunde liegt, ist bislang ungeklärt. Weitere Untersuchungen zur Beeinflussung der Lebensdauer durch Manipulationen der sgk liegen nicht vor.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation erfolgte die Untersuchung des hNaDC3 in Koexpression mit sgk 1 und 3. Hier konnte erstmalig festgestellt werden, dass eine sgk die Aktivität eines Transporters inhibieren kann. In den bisher vorliegenden Forschungsergebnissen wurde stets ein stimulierender Effekt auf Transporter festgestellt. Wie die sgk1 diesen Effekt erreicht, ist mit den erfolgten Untersuchungen nicht fassbar. Sgk3 zeigte den für die sgks üblichen Effekt der Stimulation. In der Diskussion erfolgte der Vergleich mit den Ergebnissen der Koexpression des rNaDC1 in Koexpression mit hsgk1 und 3 von Boehmer und Kollegen (Boehmer et al. 2004a). Eine ergänzende Untersuchung des humanen Orthologen NaDC1 mit der hsgk1 und 3 wäre wünschenswert.

Des Weiteren konnte erfreulicherweise festgestellt werden, dass in Bezug auf die Lithiumtherapie psychischer Erkrankung keine Beeinflussung des Transportsystems bei Berücksichtigung der therapeutischen Breite des Medikaments erfolgt. Die Aktivität des hNaDC3 in Koexpression mit sgk1 oder sgk3 blieb durch eine Lithiumsubstitution von 2 mM unbeeinflusst.

Die in Kapitel 4.4 diskutierten Ergebnisse u. a. von Fei et al. bezüglich der lebenszeitverlängernden Effekte der NaDC- und sgk-Manipulation verschiedener Spezies zeigten, welche überraschenden Zusammenhänge in Organismen vorherrschen. Ein Protein, dem wir bislang nur die Bereitstellung eines Substrates für den Transport organischer Anionen im proximalen Tubulus zugeordnet haben, zeigt bei seiner selektiven Aktivitätsminderung eine lebenszeitverlängernde Wirkung. Aussagen, die bereits von neuen pharmazeutischen Ansatzpunkten zur Verlängerung der Lebenszeit sprechen, sind allerdings zum jetzigen Zeitpunkt noch zu früh. Die Komplexität der zellulären Wirkmechanismen zu entschlüsseln wird noch einiger Zeit bedürfen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ackerman MJ, Wickman KD, Clapham DE (1994): Hypotonicity activates a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 103, 153 – 179
- Akutsu N, Lin R, Bastien Y, Bestawros A, Enepekides DJ, Black MJ, White JH (2001): Regulation of gene Expression by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its analog EB1089 under growth-inhibitory conditions in squamous carcinoma Cells. *Mol Endocrinol* 15, 1127 – 1139
- Alam H, Williams TW, Dumas KJ, Guo C, Yoshina S, Mitani S, Hu PJ (2010): EAK-7 controls development and life span by regulating nuclear DAF-16/FoxO activity. *Cell Metab* 12, 30 – 41
- Alliston TN, Maiyar AC, Buse P, Firestone GL, Richards JS (1997): Follicle stimulating hormone-regulated expression of serum/glucocorticoid-inducible kinase in rat ovarian granulosa cells: a functional role for the Sp1 family in promoter activity. *Mol Endocrinol* 11, 1934 – 1949
- Alliston TN, Gonzalez-Robayna IJ, Buse P, Firestone GL, Richards JS (2000): Expression and localization of serum/ glucocorticoid-induced kinase in the rat ovary: relation to follicular growth and differentiation. *Endocrinology* 141, 385 – 395
- Alvarez de la Rosa D, Zhang P, Náray-Fejes-Tóth A, Fejes-Tóth G, Canessa CM (1999): The serum and glucocorticoid kinase sgk increases the abundance of epithelial sodium channels in the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 274, 37834 – 37839
- Arteaga MF, Coric T, Straub C, Canessa CM (2008): A brain-specific SGK1 splice isoform regulates expression of ASIC1 in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4459 – 4464
- Bai L, Pajor AM (1997): Expression cloning of NaDC-2, an intestinal Na<sup>+</sup>- or Li<sup>+</sup>-dependent dicarboxylate transporter. *Am J Physiol* 273, G267 – G274
- Bai XY, Chen X, Sun AQ, Feng Z, Hou K, Fu B (2007): Membrane topology structure of human high-affinity, sodium-dependent dicarboxylate transporter. *FASEB J* 21, 2409 – 2417
- Baltaev R, Strutz-Seebohm N, Korniychuk G, Myssina S, Lang F, Seebohm G (2005): Regulation of cardiac shal-related potassium channel Kv 4.3 by serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* 450, 26 – 33
- Barish ME (1983): A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. *J Physiol* 342, 309 – 325

- Baud C, Kado RT, Marcher K (1982): Sodium channels induced by depolarization of the *Xenopus laevis* oocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 3188 – 3192
- Beck L, Markovich D (2000): The mouse Na<sup>+</sup>-sulfate cotransporter gene Nas1. Cloning, tissue distribution, gene structure, chromosomal assignment, and transcriptional regulation by vitamin D. *J Biol Chem* 275, 11880 – 11890
- Bellé R, Marot J, Ozon R (1976): Nature of progesterone action on amino acid uptake by isolated full-grown oocyte of *Xenopus laevis*. *Biochim Biophys Acta* 419, 342 – 348
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: Stryer Biochemie. 7. Auflage; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2014
- Bergeron MJ, Cléménçon B, Hediger MA, Markovich D (2013): SLC13 family of Na<sup>+</sup>-coupled di- and tricarboxylate/sulfate transporters. *Mol Aspects Med* 34, 299 – 312
- Berridge MJ (1988): Inositol trisphosphate-induced membrane potential oscillations in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 403, 589 – 599
- Bhalla V, Daidié D, Li H, Pao AC, LaGrange LP, Wang J, Vandewalle A, Stockand JD, Staub O, Pearce D (2005): Serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 regulates ubiquitin ligase neural precursor cell-expressed, developmentally down-regulated protein 4-2 by inducing interaction with 14-3-3. *Mol Endocrinol* 19, 3073 – 3084
- Boehmer C, Henke G, Schniepp R, Palmada M, Rothstein JD, Bröer S, Lang F (2003a): 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
- Boehmer C, Wilhelm V, Palmada M, Wallisch S, Henke G, Brinkmeier H, Cohen P, Pieske B, Lang F (2003b): Serum and glucocorticoid inducible kinases in the regulation of the cardiac sodium channel SCN5A. *Cardiovasc Res* 57, 1079 – 1084
- Boehmer C, Embark HM, Bauer A, Palmada M, Yun CH, Weinman EJ, Endou H, Cohen P, Lahme S, Bichler KH, Lang F (2004a): Stimulation of renal Na<sup>+</sup>-dicarboxylate cotransporter 1 by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulating factor 2, serum and glucocorticoid inducible kinase isoforms, and protein kinase B. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 998 – 1003
- Boehmer C, Philippin M, Rajamanickam J, Mack A, Broer S, Palmada M, Lang F (2004b): Stimulation of the EAAT4 glutamate transporter by SGK protein kinase isoforms and PKB. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 1242 – 1248

- Boehmer C, Rajamanickam J, Schniepp R, Kohler K, Wulff P, Kuhl D, Palmada M, Lang F (2005): 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
- Boehmer C, Palmada M, Rajamanickam J, Schniepp R, Amara S, Lang F (2006): Post-translational regulation of EAAT2 function by co-expressed ubiquitin ligase Nedd4-2 is impacted by SGK kinases. *J Neurochem* 97, 911 – 921
- Boehmer C, Palmada M, Kenngott C, Lindner R, Klaus F, Laufer J, Lang F (2007): Regulation of the epithelial calcium channel TRPV6 by the serum and glucocorticoid-inducible kinase isoforms SGK1 and SGK3. *FEBS Lett* 581, 5586 – 5590
- Boehmer C, Laufer J, Jeyaraj S, Klaus F, Lindner R, Lang F, Palmada M (2008a): Modulation of the voltage-gated potassium channel Kv1.5 by the SGK1 protein kinase involves inhibition of channel ubiquitination. *Cell Physiol Biochem* 22, 591 – 600
- Boehmer C, Palmada M, Klaus F, Jeyaraj S, Lindner R, Laufer J, Daniel H, Lang F (2008b): The peptide transporter PEPT2 is targeted by the protein kinase SGK1 and the scaffold protein NHERF2. *Cell Physiol Biochem* 22, 705 – 714
- Boldt M, Burckhardt G, Burckhardt BC (2003): NH<sub>4</sub><sup>(+)</sup> conductance in *Xenopus laevis* oocytes. III. Effect of NH<sub>3</sub>. *Pflugers Arch* 446, 652 – 657
- Boyd C, N aray-Fejes-T oth A (2005): Gene regulation of ENaC subunits by serum and glucocorticoid-inducible kinase-1. *Am J Physiol Renal Physiol* 288, F505 – F512
- Burckhardt BC, Fr mter E (1992): Pathways of NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> permeation across *Xenopus laevis* oocyte cell membrane. *Pflugers Arch* 420, 83 – 86
- Burckhardt BC, Kroll B, Fr mter E (1992): Proton transport mechanism in the cell membrane of *Xenopus laevis* oocytes. *Pflugers Arch* 420, 78 – 82
- Burckhardt BC, Lorenz J, Kobbe C, Burckhardt G (2004): Substrate specificity of the human renal sodium dicarboxylate cotransporter, hNaDC-3, under voltage-clamp conditions. *Am J Physiol Renal Physiol* 288, F792 – F799
- Buse P, Tran SH, Luther E, Phu PT, Aponte GW, Firestone GL (1999): Cell cycle and hormonal control of nuclear-cytoplasmic localization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, in mammary tumor cells. A novel convergence point of antiproliferative and proliferative cell signaling pathways. *J Biol Chem* 274, 7253 – 7263

- Chen X, Tsukaguchi H, Chen XZ, Berger UV, Hediger MA (1999): Molecular and functional analysis of SDCT2, a novel rat sodium-dependent dicarboxylate transporter. *J Clin Invest* 103, 1159 – 1168
- Chen XZ, Shayakul C, Berger UV, Tian W, Hediger MA (1998): Characterization of a rat Na<sup>+</sup>-dicarboxylate cotransporter. *J Biol Chem* 273, 20972 – 20981
- Coric T, Hernandez N, Alvarez de la Rosa D, Shao D, Wang T, Canessa CM (2004): Expression of ENaC and serum- and glucocorticoid-induced kinase 1 in the rat intestinal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286, G663 – G670
- Costa PF, Emilio MG, Fernandes PL, Ferreira HG, Ferreira KG (1989): Determination of ionic permeability coefficients of the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes under voltage clamp. *J Physiol* 413, 199 – 211
- Cougnon M, Bouyer P, Hulin P, Anagnostopoulos T, Planelles G (1996): Further investigation of ionic diffusive properties and of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pathways in *Xenopus laevis* oocyte cell membrane. *Pflugers Arch* 431, 658 – 667
- Dai F, Yu L, He H, Zhao Y, Yang J, Zhang X, Zhao S (1999): Cloning and mapping of a novel human serum/glucocorticoid regulated kinase-like gene, SGK1, to chromosome 8q12.3 - q13.1. *Genomics* 62, 95 – 97
- Dantzer WH (2002): Renal organic anion transport: a comparative and cellular perspective. *Biochim Biophys Acta* 1566, 169 – 181
- Dascal N (1987): The Use of *Xenopus* Oocytes for the Study of Ion Channels. *Crit Rev Biochem* 22, 317 – 387
- Dascal N, Snutch TP, Lübbert H, Davidson N, Lester HA (1986): Expression and modulation of voltage-gated calcium channels after RNA injection in *Xenopus* oocytes. *Science* 231, 1147 – 1150
- Dawson PA, Pirlo KJ, Steane SE, Nguyen KA, Kunzelmann K, Chien YJ, Markovich D (2005): The rat Na<sup>+</sup>-sulfate cotransporter rNaS2: functional characterization, tissue distribution, and gene (slc13a4) structure. *Pflugers Arch* 450, 262 – 268
- Debonneville C, Flores SY, Kamynina E, Plant PJ, Tauxe C, Thomas MA, Münster C, Chraïbi A, Pratt JH, Horisberger JD, Pearce D, Loffing J, Staub O (2001): Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. *EMBO J* 20, 7052 – 7059

- Diakov A, Korbmacher C (2004): 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
- Dieter M, Palmada M, Rajamanickam J, Aydin A, Busjahn A, Boehmer C, Luft FC, Lang F (2004): Regulation of glucose transporter SGLT1 by ubiquitin ligase Nedd4-2 and kinases SGK1, SGK3, and PKB. *Obes Res* 12, 862 – 870
- Dumont JN (1972): Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136, 153 – 179
- Dyer DL, Said HM (1995): Riboflavin uptake by native *Xenopus laevis* oocytes. *Biochim Biophys Acta* 1234, 15 – 21
- Eckard P, Passow H (1987): Sodium-dependent and sodium-independent phosphate uptake by full grown, prophase-arrested oocytes of *Xenopus laevis* before and after progesterone-induced maturation. *Cell Biol Int Rep* 11, 349 – 358
- Embark HM, Böhmer C, Vallon V, Luft F, Lang F (2003): Regulation of KCNE1 dependent K(+) current by the serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) isoforms. *Pflugers Arch* 445, 601 – 606
- Embark HM, Böhmer C, Palmada M, Rajamanickam J, Wyatt AW, Wallisch S, Capasso G, Waldegger P, Seyberth HW, Waldegger S, Lang F (2004a): Regulation of CLC- Ka/barttin by the ubiquitin ligase Nedd 4-2 and the serum- and glucocorticoid dependent kinases. *Kidney Int* 66, 1918 – 1925
- Embark HM, Setiawan I, Poppendieck S, van de Graaf SF, Boehmer C, Palmada M, Wieder T, Gerstberger R, Cohen P, Yun CC, Bindels RJ, Lang F (2004b): Regulation of the epithelial Ca<sup>2+</sup> 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
- Fei YJ, Inoue K, Ganapathy V (2003): Structural and functional characteristics of two sodium coupled dicarboxylate transporters (ceNaDC1 and ceNaDC2) from *Caenorhabditis elegans* and their relevance to life span. *J Biol Chem* 278, 6136 – 6144
- Fejes-Tóth G, Frindt G, Náray-Fejes-Tóth A, Palmer LG (2008): Epithelial Na<sup>+</sup> channel activation and processing in mice lacking SGK1. *Am J Physiol Renal Physiol* 294, F1298 – F1305

- 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, Lang F (2002): Expression of the serine/ threonine kinase hSGK1 in chronic viral hepatitis. *Cell Physiol Biochem* 12, 47 – 54
- Friedrich B, Feng Y, Cohen P, Risler T, Vandewalle A, Bröer S, Wang J, Pearce D, Lang F (2003): The serine/threonine kinases SGK2 and SGK3 are potent stimulators of the epithelial Na<sup>+</sup> channel alpha,beta,gamma-ENaC. *Pflugers Arch* 445, 693 – 696
- Fritsch H, Kühnel W: Taschenatlas der Anatomie in 3 Bänden. Band 2 Innere Organe. 8. Auflage; Thieme, Stuttgart 2003
- Gamper N, Fillon S, Feng Y, Friedrich B, Lang PA, Henke G, Huber SM, Kobayashi T, Cohen P, Lang F (2002): K<sup>+</sup> channel activation by all three isoforms of serum- and glucocorticoid dependent protein kinase SGK. *Pflugers Arch* 445, 60 – 66
- Gillo B, Sealton SC, Minke B (1996): Pharmacology of a capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in *Xenopus* oocytes. *J Photochem Photobiol B* 35, 77 – 82
- Girard JP, Baekkevold ES, Feliu J, Brandtzaeg P, Amalric F (1999): Molecular cloning and functional analysis of SUT-1, a sulfate transporter from human high endothelial venules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12772 – 12777
- Grahammer F, Artunc F, Sandulache D, Rexhepaj R, Friedrich B, Risler T, McCormick JA, Dawson K, Wang J, Pearce D, Wulff P, Kuhl D, Lang F (2006): Renal function of gene-targeted mice lacking both SGK1 and SGK3. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290, R945 – R950
- Gundersen CB, Miledi R, Parker I (1983): Serotonin receptors induced by exogenous messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 22, 103 – 109
- Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G (1971): Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233, 177 – 182
- Hanks SK, Hunter T (1995): Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9, 576 – 596
- Hayashi M, Tapping RI, Chao TH, Lo JF, King CC, Yang Y, Lee JD (2001): BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum- and glucocorticoid-inducible kinase. *J Biol Chem* 276, 8631 – 8634

- Helms MN, Yu L, Malik B, Kleinhenz DJ, Hart CM, Eaton DC (2005): Role of SGK1 in nitric oxide inhibition of ENaC in Na<sup>+</sup>-transporting epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C717 – C726
- Henke G, Setiawan I, Böhmer C, Lang F (2002): Activation of Na<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup>-ATPase by the serum- and glucocorticoid-dependent kinase isoforms. *Kidney Blood Pres Res* 25, 370 – 374
- Henke G, Maier G, Wallisch S, Boehmer C, Lang F (2004): Regulation of the voltage gated K<sup>+</sup> channel Kv1.3 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1. *J Cell Physiol* 199, 194 – 199
- Hertweck M, Göbel C, Baumeister R (2004): C. elegans SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span. *Dev Cell* 6, 577 – 588
- Ichimura T, Yamamura H, Sasamoto K, Tominaga Y, Taoka M, Kakiuchi K, Shinkawa T, Takahashi N, Shimada S, Isobe T (2005): 14-3-3 proteins modulate the expression of epithelial Na<sup>+</sup> channels by phosphorylation-dependent interaction with Nedd4-2 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 280, 13187 – 13194
- Imai S, Okayama N, Shimizu M, Itoh M (2003): Increased intracellular calcium activates serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) through a calmodulin-calcium calmodulin dependent kinase kinase pathway in Chinese hamster ovary cells. *Life Sci* 72, 2199 – 2209
- Inoue K, Fei YJ, Huang W, Zhuang L, Chen Z, Ganapathy V (2002a): Functional identity of Drosophila melanogaster Indy as a cation-independent, electroneutral transporter for tricarboxylic acid-cycle intermediates. *Biochem J* 367, 313 – 319
- Inoue K, Zhuang L, Ganapathy V (2002b): Human Na<sup>+</sup>-coupled citrate transporter: primary structure, genomic organization, and transport function. *Biochem Biophys Res Commun* 299, 465 – 471
- Itani OA, Liu KZ, Cornish KL, Campbell JR, Thomas CP (2002): Glucocorticoids stimulate human sgk1 gene expression by activation of a GRE in its 5'-flanking region. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E971 – E979
- Jentsch TJ, Steinmeyer K, Schwarz G (1990): Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in Xenopus oocytes. *Nature* 348, 510 – 514
- Jeyaraj S, Boehmer C, Lang F, Palmada M (2007): Role of SGK1 kinase in regulating glucose transport via glucose transporter GLUT4. *Biochem Biophys Res Commun* 356, 629 – 635

- Jung D, Lafaire AV, Schwarz W (1984a): Inhibition of Na-alanine cotransport in oocytes of *Xenopus laevis* during meiotic maturation is voltage-regulated. *Pflugers Arch* 402, 39 – 41
- Jung D, Schwarz W, Passow H (1984b): Sodium-alanine cotransport in oocytes of *Xenopus laevis*: correlation of alanine and sodium fluxes with potential and current changes. *J Membr Biol* 78, 29 – 34
- Kaufhold M, Schulz K, Breljak D, Gupta S, Henjakovic M, Krick W, Hagos Y, Sabolic I, Burckhardt BC, Burckhardt G (2011): Differential interaction of dicarboxylates with human sodium-dicarboxylate cotransporter 3 and organic anion transporters 1 and 3. *Am J Physiol Renal Physiol* 301, F1026 – F1034
- Kekuda R, Wang H, Huang W, Pajor AM, Leibach FH, Devoe LD, Prasad PD, Ganapathy V (1999): Primary structure and functional characteristics of a mammalian sodium-coupled high affinity dicarboxylate transporter. *J Biol Chem* 274, 3422 – 3429
- Khan ZA, Barbin YP, Farhangkhoe H, Beier N, Scholz W, Chakrabarti S (2005): Glucose-induced serum- and glucocorticoid-regulated kinase activation in oncofetal fibronectin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 329, 275 – 280
- Klaus F, Palmada M, Lindner R, Laufer J, Jeyaraj S, Lang F, Boehmer C (2008): Upregulation of hypertonicity-activated myo-inositol transporter SMI1 by the cell volume-sensitive protein kinase SGK1. *J Physiol* 586, 1539 – 1547
- Knauf F, Rogina B, Jiang Z, Aronson PS, Helfand SL (2002): Functional characterization and immunolocalization of the transporter encoded by the life-extending gene Indy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14315 – 14319
- Kobayashi T, Cohen P (1999): Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem J* 339, 319 – 328
- Kobayashi T, Deak M, Morrice N, Cohen P (1999): Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochem J* 344, 189 – 197
- Kowdley GC, Ackerman SJ, John JE 3<sup>rd</sup>, Jones LR, Moorman JR (1994): Hyperpolarization activated chloride currents in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 103, 217 – 230

- Krebs EG, Graves DJ, Fischer EH (1959): Factors affecting the activity of muscle phosphorylase b kinase. *J Biol Chem* 234, 2867 – 2873
- Kumari S, Liu X, Nguyen T, Zhang X, D'Mello SR (2001): Distinct phosphorylation patterns underlie Akt activation by different survival factors in neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 96, 157 – 162
- Kusano K, Miledi R, Stinnakre J (1982): Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *J Physiol* 328, 143 – 170
- Kwon ES, Narasimhan SD, Yen K, Tissenbaum HA (2010): A new DAF-16 isoform regulates longevity. *Nature* 466, 498 – 502
- Lacerda AE, Perez-Reyes E, Wei X, Castellano A, Brown AM (1994): T-type and N-type calcium channels of *Xenopus* oocytes: evidence for specific interactions with beta subunits. *Biophys J* 66, 1833 – 1843
- Lafaie AV, Schwarz W (1986): Voltage dependence of the rheogenic Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in the membrane of oocytes of *Xenopus laevis*. *J Membr Biol* 91, 43 – 51
- Lang F, Cohen P (2001): Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci STKE* 2001, re17
- Lang F, Klingel K, Wagner CA, Stegen C, Wärntges 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, Bröer S (2000): Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8157 – 8162
- Lang F, Henke G, Embark HM, Waldegger S, Palmada M, Böhmer C, Vallon V (2003): Regulation of channels by the serum and glucocorticoid-inducible kinase-implications for transport, excitability and cell proliferation. *Cell Physiol Biochem* 13, 041 – 050
- Lang F, Böhmer C, Palmada M, Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Vallon V (2006): (Patho)physiological significance of the serum-glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol Rev* 86, 1151 – 1178
- Lang F, Artunc F, Vallon V (2009): The physiological impact of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase sgk1. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18, 439 – 448

- Lee A, Beck L, Markovich D (2000): The human renal sodium sulfate cotransporter (SLC13A1; hNaSi-1) cDNA and gene: organization, chromosomal localization and functional characterization. *Genomics* 70, 354 – 363
- Leong ML, Maiyar AC, Kim B, O'Keefe BA, Firestone GL (2003): Expression of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 278, 5871 – 5882
- Liang X, Peters KW, Butterworth MB, Frizzell RA (2006): 14-3-3 isoforms are induced by aldosterone and participate in its regulation of epithelial sodium channels. *J Biol Chem* 281, 16323 – 16332
- Liebold KM, Reifarth FW, Clauss W, Weber W (1996): cAMP-activation of amiloride sensitive Na<sup>+</sup> channels from guinea-pig colon expressed in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* 431, 913 – 922
- Liu D, Yang X, Songyang Z (2000): Identification of CISK, a new member of the SGK kinase family that promotes IL-3-dependent survival. *Curr Biol* 10, 1233 – 1236
- Loffing J, Zecevic M, Féraille E, Kaissling B, Asher C, Rossier BC, Firestone GL, Pearce D, Verrey F (2001): Aldosterone induces rapid apical translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK. *Am J Physiol Renal Physiol* 280, F675 – F682
- Loffing J, Flores SY, Staub O (2006): Sgk kinases and their role in epithelial transport. *Annu Rev Physiol* 68, 461 – 490
- Lory P, Rassendren FA, Richard S, Tiaho F, Nargeot J (1990): Characterization of voltage dependent calcium channels expressed in *Xenopus* oocytes injected with mRNA from rat heart. *J Physiol* 429, 95 – 112
- Mackenzie B, Harper AA, Taylor PM, Rennie MJ (1994): Na<sup>+</sup>/amino acid coupling stoichiometry of rheogenic system B0 + transport in *Xenopus* oocytes is variable. *Pflugers Arch* 426, 121 – 128
- Maiyar AC, Phu PT, Huang AJ, Firestone GL (1997): Repression of glucocorticoid receptor transactivation and DNA binding of a glucocorticoid response element within the serum/glucocorticoid-inducible protein kinase (sgk) gene promoter by the p53 tumor suppressor protein. *Mol Endocrinol* 11, 312 – 329

- Maiyar AC, Leong ML, Firestone GL (2003): 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
- Markovich D, Murer H (2004): The SLC13 gene family of sodium sulphate/ carboxylate cotransporters. *Pflugers Arch* 447, 594 – 602
- Markovich D, Forgo J, Stange G, Biber J, Murer H (1993): Expression cloning of rat renal  $\text{Na}^+/\text{SO}_4^{2-}$  cotransport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8073 – 8077
- Meng F, Yamagiwa Y, Taffetani S, Han J, Patel T (2005): IL-6 activates serum- and glucocorticoid kinase via p38alpha mitogen-activated protein kinase pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C971 – C981
- Miledi R (1982): A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 215, 491 – 497
- Miledi R, Parker I, Sumikawa K (1983): Recording of single gamma-aminobutyrate- and acetylcholine-activated receptor channels translated by exogenous mRNA in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 218, 481 – 484
- Milovanovic S, Frindt G, Tate SS, Windhager EE (1991): Expression of renal  $\text{Na}^{(+)}\text{-Ca}^{2+}$  exchange activity in *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol* 261, F207 – F212
- Nagaki K, Yamamura H, Shimada S, Saito T, Hisanaga S, Taoka M, Isobe T, Ichimura T (2006): 14-3-3 Mediates phosphorylation-dependent inhibition of the interaction between the ubiquitin E3 ligase Nedd4-2 and epithelial  $\text{Na}^+$  channels. *Biochemistry* 45, 6733 – 6740
- Náray-Fejes-Tóth A, Canessa C, Cleaveland ES, Aldrich G, Fejes-Tóth G (1999): sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial  $\text{Na}^+$  channels. *J Biol Chem* 274, 16973 – 16978
- Nigam SK, Bush KT, Martovetsky G, Ahn SY, Liu HC, Richard E, Bhatnagar V, Wu W (2015): The organic anion transporter (OAT) family: a systems biology perspective. *Physiol Rev* 95, 83 – 123
- Oliveira JL, Silva Júnior GB, Abreu KL, Rocha Nde A, Franco LF, Araújo SM, Daher Ede F (2010): Lithium nephrotoxicity. *Rev Assoc Med Bras* 56, 600 – 606
- Pajor AM (1995): Sequence and functional characterization of a renal sodium/ dicarboxylate cotransporter. *J Biol Chem* 270, 5779 – 5785

- Pajor AM (1996): Molecular cloning and functional expression of a sodium dicarboxylate cotransporter from human kidney. *Am J Physiol* 270, F642 – F648
- Pajor AM (2000): Molecular properties of sodium/ dicarboxylate cotransporters. *J Membr Biol* 175, 1 – 8
- Pajor AM (2006): Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters. *Pflugers Arch* 451, 597 – 605
- Pajor AM (2013): Sodium-coupled dicarboxylate and citrate transporters from the SLC13 family. *Pflugers Arch* 466, 119 – 130
- Pajor AM, Sun N (1996): Functional differences between rabbit and human Na<sup>+</sup>-dicarboxylate cotransporter, NaDC-1 and hNaDC-1. *Am J Physiol* 271, F1093 – 1099
- Pajor AM, Sun N (2000): Molecular cloning, chromosomal organization, and functional characterization of a sodium-dicarboxylate cotransporter from mouse kidney. *Am J Physiol* 279, F482 – F490
- Pajor AM, Randolph KM (2005): Conformationally sensitive residues in extracellular loop 5 of the Na<sup>+</sup>/dicarboxylate cotransporter. *J Biol Chem* 280, 18728 – 18735
- Pajor AM, Hirayama B, Loo DDF (1998): Sodium and lithium interactions with the Na<sup>+</sup>/dicarboxylate cotransporter. *J Biol Chem* 273, 18923 – 18929
- Pajor AM, Gangula R, Yao X (2001): Cloning and functional characterization of a high-affinity Na<sup>+</sup>/ dicarboxylate cotransporter from mouse brain. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C1215 – C1223
- Pak CY (1991): Etiology and treatment of urolithiasis. *Am J Kidney Dis* 18, 624 – 637
- Palmada M, Dieter M, Boehmer C, Waldegger S, Lang F (2004a): Serum and glucocorticoid inducible kinases functionally regulate ClC-2 channels. *Biochem Biophys Res Commun* 321, 1001 – 1006
- Palmada M, Dieter M, Speil A, Böhmer C, Mack AF, Wagner HJ, Klingel K, Kandolf R, Murer H, Biber J, Closs EI, Lang F (2004b): Regulation of intestinal phosphate cotransporter NaPi IIb by ubiquitin ligase Nedd4-2 and by serum- and glucocorticoid dependent kinase 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver* 287, G143 – G150

- Palmada M, Speil A, Jeyaraj S, Böhmer C, Lang F (2005): The serine/threonine kinases SGK1, 3 and PKB stimulate the amino acid transporter ASCT2. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 272 – 277
- Palmada M, Boehmer C, Akel A, Rajamanickam J, Jeyaraj S, Keller K, Lang F (2006): SGK1 kinase upregulates GLUT1 activity and plasma membrane expression. *Diabetes* 55, 421 – 427
- Panayotova-Heiermann M, Eskandari S, Turk E, Zampighi GA, Wright EM (1997): Five transmembrane helices form the sugar pathway through the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *J Biol Chem* 272, 20324 – 20327
- Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S: Physiologie. 7. Auflage; Thieme, Stuttgart 2014
- Park J, Leong ML, Buse P, Maiyar AC, Firestone GL, Hemmings BA (1999): Serum- and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI3-kinase stimulated signaling pathway. *EMBO J* 18, 3024 – 3033
- Parker I, Ivorra I (1990): A slowly inactivating potassium current in native oocytes of *Xenopus laevis*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 238, 369 – 381
- Pearce D (2001): The role of SGK1 in hormone-regulated sodium transport. *Trends Endocrinol Metab* 12, 341 – 347
- Pearce LR, Komander D, Alessi DR (2010): The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 9 – 22
- Perrotti N, He RA, Phillips SA, Haft CR, Taylor SI (2001): Activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase (Sgk) by cyclic AMP and insulin. *J Biol Chem* 276, 9406 – 9412
- Prasad N, Topping RS, Zhou D, Decker SJ (2000): Oxidative stress and vanadate induce tyrosine phosphorylation of phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1). *Biochemistry* 39, 6929 – 6935
- Richards JS, Sharma SC, Falender AE, Lo YH (2002): Expression of FKHR, FKHRL1, and AFX genes in the rodent ovary: evidence for regulation by IGF-I, estrogen, and the gonadotropins. *Mol Endocrinol* 16, 580 – 599
- Richter HP, Jung D, Passow H (1984): Regulatory changes of membrane transport and ouabain binding during progesterone-induced maturation of *Xenopus* oocytes. *J Membr Biol* 79, 203 – 210

- Ring AM, Leng Q, Rinehart J, Wilson FH, Kahle KT, Hebert SC, Lifton RP (2007): An SGK1 site in WNK4 regulates Na<sup>+</sup> channel and K<sup>+</sup> channel activity and has implications for aldosterone signaling and K<sup>+</sup> homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4025 – 4029
- Rogers RP, Rogina B (2015): The role of INDY in metabolism, health and longevity. *Front Genet* 6, 204
- Rogina B, Reenan RA, Nilsen SP, Helfand SL (2000): Extended life-span conferred by cotransporter gene mutations in *Drosophila*. *Science* 290, 2137 – 2140
- Rozansky DJ, Wang J, Doan N, Purdy T, Faulk T, Bhargava A, Dawson K, Pearce D (2002): Hypotonic induction of SGK1 and Na<sup>+</sup> transport in A6 cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 283, F105 – F113
- Rybakowski J, Drogowska J, Abramowicz M, Chlopocka-Wozniak M, Czekalski S (2012): The effect of long-term lithium treatment on kidney function. *Psychiatr Pol* 46, 627 – 636
- Sakmann B, Methfessel C, Mishina M, Takahashi T, Takai T, Kurasaki M, Fukuda K, Numa S (1985): Role of acetylcholine receptor subunits in gating of the channel. *Nature* 318, 538 – 543
- Schlessinger A, Sun NN, Colas C, Pajor AM (2014): Determinants of substrate and cation transport in the human Na<sup>+</sup>/dicarboxylate cotransporter NaDC3. *J Biol Chem* 289, 16998 – 17008
- Schlieff T, Heinemann SH (1995): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced chloride currents are indicative of an endogenous Na(+)- Ca<sup>2+</sup> exchange mechanism in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 486, 123 – 130
- Schniepp R, Kohler K, Ladewig T, Guenther E, Henke G, Palmada M, Boehmer C, Rothstein JD, Bröer S, Lang F (2004): Retinal colocalization and in vitro interaction of the glutamate transporter EAAT3 and the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 [correction]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 1442 – 1449
- Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Baltaev R, Korniyuchuk G, Knirsch M, Engel J, Lang F (2005): Regulation of KCNQ4 potassium channel prepulse dependence and current amplitude by SGK1 in *Xenopus* oocytes. *Cell Physiol Biochem* 16, 255 – 262

- Sekine T, Cha SH, Hosoyamada M, Kanai Y, Watanabe N, Furuta Y, Fukuda K, Igarashi T, Endou H (1998): Cloning, functional characterization, and localization of a rat renal Na<sup>+</sup>-dicarboxylate transporter. *Am J Physiol* 275, F298 – F305
- Shelly C, Herrera R (2002): 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
- Shojaiefard M, Christie DL, Lang F (2005): Stimulation of the creatine transporter SLC6A8 by the protein kinases SGK1 and SGK3. *Biochem Biophys Res Commun* 334, 742 – 746
- Shorter E (2009): The history of lithium therapy. *Bipolar Disord* 2, 4 – 9
- Sigel E (1990): Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *J Membr Biol* 117, 201 – 221
- Sigel E, Minier F (2005): The *Xenopus* oocyte: system for the study of functional expression and modulation of proteins. *Mol Nutr Food Res* 49, 228 – 234
- Smith LD, Xu WL, Varnold RL (1991): Oogenesis and oocyte isolation. *Methods Cell Biol* 36, 45 – 60
- Sobczak K, Bangel-Ruland N, Leier G, Weber WM (2010): Endogenous transport systems in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane. *Methods* 51, 183 – 189
- Soukas AA, Kane EA, Carr CE, Melo JA, Ruvkun G (2009): Rictor/TORC2 regulates fat metabolism, feeding, growth, and life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 23, 496 – 511
- Strutz-Seebohm N, Seebohm G, Mack AF, Wagner HJ, Just L, Skutella T, Lang UE, Henke G, Striegel M, Hollmann M, Rouach N, Nicoll RA, McCormick JA, Wang J, Pearce D, Lang F (2005a): Regulation of GluR1 abundance in murine hippocampal neurons by serum- and glucocorticoid-inducible kinase 3. *J Physiol* 565, 381 – 390
- Strutz-Seebohm N, Seebohm G, Shumilina E, Mack AF, Wagner HJ, Lampert A, Grahammer F, Henke G, Just L, Skutella T, Hollmann M, Lang F (2005b): Glucocorticoid adrenal steroids and glucocorticoid-inducible kinase isoforms in the regulation of GluR6 expression. *J Physiol* 565, 391 – 401
- Sutherland EW Jr, Wosilait WD (1955): Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature* 175, 169 – 170

- Taylor PM, Hundal HS, Rennie MJ (1989): Transport of glutamine in *Xenopus laevis* oocytes: relationship with transport of other amino acids. *J Membr Biol* 112, 149 – 157
- Thomas CP, Campbell JR, Wright PJ, Husted RF (2004): cAMP-stimulated Na<sup>+</sup>- transport in H441 distal lung epithelial cells: role of PKA, phosphatidylinositol3-kinase, and sgk1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287, L843 – L851
- Timmer RT, Sands JM (1999): Lithium intoxication. *J Am Soc Nephrol* 10, 666 – 674
- Uwai Y, Tsuge M, Tokai Y, Kawasaki T, Nabekura T (2015): Lithium Interferes with the Urinary Excretion of Phenolsulfonphthalein in Rats: Involvement of a Reduced Content of  $\alpha$ -Ketoglutarat, the Driving Force for Organic Anion Transporters OAT1 and OAT3, in the Kidney Cortex. *Pharmacology* 96, 278 – 283
- Vasilets LA, Schmalzing G, Mädefessel K, Haase W, Schwarz W (1990): Activation of protein kinase C by phorbol ester induces downregulation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in oocytes of *Xenopus laevis*. *J Membr Biol* 118, 131 – 142
- Virbasius JV, Song X, Pomerleau DP, Zhan Y, Zhou GW, Czech MP (2001): Activation of the Akt-related cytokine-independent survival kinase requires interaction of its phox domain with endosomal phosphatidylinositol 3 phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12908 – 12913
- Virkki LV, Franke C, Somieski P, Boron WF (2002): Cloning and functional characterization of a novel aquaporin from *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 277, 40610 – 40616
- Vuagniaux G, Vallet V, Jaeger NF, Hummler E, Rossier BC (2002): Synergistic activation of ENaC by three membrane-bound channel-activating serine proteases (mCAP1, mCAP2 and mCAP3) and serum- and glucocorticoid-regulated kinase (Sgk1) in *Xenopus* Oocytes. *J Gen Physiol* 120, 191 – 201
- Wagner CA, Bröer A, Albers A, Gamper N, Lang F, Bröer S (2000a): The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/LAT1 is associated in *Xenopus* oocytes with a non selective cation channel that is regulated by the serine/threonine kinase sgk-1. *J Physiol* 526, 35 – 46
- Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Bröer S (2000b): The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem* 10, 1 – 12

- Waldegger S, Barth P, Raber G, Lang F (1997): Cloning and characterization of 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
- Waldegger S, Erdel M, Nagl UO, Barth P, Raber G, Steuer S, Utermann G, Paulmichl M, Lang F (1998): Genomic organization and chromosomal localization of the human SGK protein kinase gene. *Genomics* 51, 299 – 302
- Waldegger S, Klingel K, Barth P, Sauter M, Rfer ML, Kandolf R, Lang F (1999): h-sgk serine-threonine protein kinase gene as transcriptional target of transforming growth factor beta in human intestine. *Gastroenterology* 116, 1081 – 1088
- Wang H, Fei YJ, Kekuda R, Yang-Feng TL, Devoe LD, Leibach FH, Prasad P, Ganapathy V (2000): Structure, function, and genomic organization of human Na<sup>+</sup> dependent high-affinity dicarboxylate transporter. *Am J Physiol Cell Physiol* 278, C1019 – C1030
- Wang PY, Neretti N, Whitaker R, Hosier S, Chang C, Lu D, Rogina B, Helfand SL (2009): Long-lived Indy and calorie restriction interact to extend life span. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9262 – 9267
- Wärntges S, Friedrich B, Henke G, Duranton C, Lang PA, Waldegger S, Meyermann R, Kuhl D, Speckmann EJ, Obermüller N, Witzgall R, Mack AF, Wagner HJ, Wagner A, Bröer S, Lang F (2002): Cerebral localization and regulation of the cell volume sensitive serum- and glucocorticoid-dependent kinase SGK1. *Pflugers Arch* 443, 617 – 624
- Weber WM (1999): Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: State of the art. *Biochim Biophys Acta* 1421, 213 – 233
- Weber WM, Schwarz W, Passow H (1989): Endogenous D-glucose transport in oocytes of *Xenopus laevis*. *J Membr Biol* 111, 93 – 102
- Weber WM, Liebold KM, Reifarth FW, Uhr U, Clauss W (1995): Influence of extracellular Ca<sup>2+</sup> on endogenous Cl<sup>-</sup> channels in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* 429, 820 – 824
- Webster MK, Goya L, Firestone GL (1993a): Immediate-early transcriptional regulation and rapid mRNA turnover of a putative serine/threonine protein kinase. *J Biol Chem* 268, 11482 – 11485
- Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC, Firestone GL (1993b): Characterization of sgk a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol Cell Biol* 13, 2031 – 2040

- Yao X, Pajor AM (2000): The transport properties of the human renal Na<sup>+</sup>/dicarboxylate cotransporter under voltage clamp conditions. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 279, F54 – F64
- Yun CC, Chen Y, Lang F (2002): Glucocorticoid activation of Na(+)/H(+) exchanger isoform 3 revisited. The roles of SGK1 and NHERF2. *J Biol Chem* 277, 7676 – 7683
- Zampighi GA, Kreman M, Boorer KJ, Loo DD, Bezanilla F, Chandy G, Hall JE, Wright EM (1995): A method for determining the unitary functional capacity of cloned channels and transporters expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Membr Biol* 148, 65 – 78
- Zhang W, Xia X, Reisenauer MR, Rieg T, Lang F, Kuhl D, Vallon V, Kone BC (2007): Aldosterone-induced Sgk1 relieves Dot1a-Af9-mediated transcriptional repression of epithelial Na<sup>+</sup> channel alpha. *J Clin Invest* 117, 773 – 783
- Zhuo JL, Li XC (2013): Proximal nephron. *Compr Physiol* 3, 1079 – 1123

**Internetquellen:**

[http://www.uniprot.org/blast/?about=Q8WWT9\[1-602\]&key=Chain&id=PRO\\_0000172492;](http://www.uniprot.org/blast/?about=Q8WWT9[1-602]&key=Chain&id=PRO_0000172492;)

Zugriffsdatum 15.06.2016

[http://slc.bioparadigms.org/;](http://slc.bioparadigms.org/) Zugriffsdatum 15.06.2016

<http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=kinases-human-protein>

Zugriffsdatum 18.06.2016

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Frau Professor Dr. Burckhardt für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas bedanken. An ihre anhaltende Unterstützung während der Durchführung meiner experimentellen Arbeit und des Fertigstellens der Dissertation werde ich mich mit Dankbarkeit gerne zurückerinnern.

Zudem bedanke ich mich herzlich bei Frau Markmann und Frau Dallmayr für die geduldige und umfassende Einweisung in den verschiedenen Methoden, die Unterstützung bei der Laborarbeit, für die Hilfestellungen und Ratschläge sowie die zahlreichen ermutigenden Gespräche.