

**Aus dem Institut für Physiologie
Abteilung Physiologie I
Abteilungsleiter: Professor Dr. med. Florian Lang**

**Modulation des Epithelialen Natriumkanals (ENaC)
und des Shaker-Kaliumkanals Kv1.3 durch die
Aldosteron-induzierte Serin-Threonin-Kinase SGK**

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

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

**vorgelegt von
Sascha Daniel Beck
aus Tübingen
2003**

Dekan: Professor Dr. med. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. F. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. U. Quast

I. Inhaltsverzeichnis

<u>I. Inhaltsverzeichnis</u>	I
<u>II. Abkürzungen</u>	IV
<u>1. Einleitung</u>	1
<u>1.1. Zellvolumenhomöostase</u>	1
<u>1.2. Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts</u>	2
<u>1.3. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System</u>	2
<u>1.4. Regulation der Natrium-Kalium-Balance durch Aldosteron</u>	4
<u>1.5. Der Epitheliale Natriumkanal (ENaC)</u>	5
<u>1.5.1. Physiologische Bedeutung und Verteilung des ENaC</u>	5
<u>1.5.2. Pathophysiologie</u>	6
<u>1.5.3. Struktureller Aufbau und Charakteristik des ENaC</u>	7
<u>1.5.4. Regulation des ENaC</u>	9
<u>1.6. Kaliumkanäle</u>	10
<u>1.6.1. Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle</u>	11
<u>1.6.2. Struktur und Funktionsmechanismus spannungsgesteuerter Kaliumkanäle</u>	11
<u>1.6.3. Akzessorische β-Untereinheiten</u>	13
<u>1.6.4. Bildung von Heteromultimeren</u>	14
<u>1.6.5. Der spannungsgesteuerte Kaliumkanal Kv1.3</u>	14
<u>1.6.6. Regulation des Kv1.3</u>	15
<u>1.7. Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinase (SGK)</u>	15
<u>1.7.1. Einteilung der hSGK innerhalb der Proteinkinasen</u>	16
<u>1.7.2. hSGK-Isoformen</u>	16
<u>1.7.3. Zelluläre Verteilung und Physiologie der hSGK1</u>	17
<u>1.7.4. Regulation der hSGK1 über die Transkription</u>	18
<u>1.7.5. Posttranslationale Aktivierung der hSGK1</u>	18
<u>1.7.6. Rolle der hSGK1 bei der Aldosteronwirkung</u>	19
<u>1.8. Fragestellung der Arbeit</u>	21
<u>2. Material und Methoden</u>	22
<u>2.1. Verwendete Lösungen und Substanzen</u>	22

2.2.	Oozytenpräparation	25
2.3.	cRNA – Injektion	25
2.4.	Zwei-Elektroden-voltage-clamp	26
2.5.	Ausführung der Experimente	28
2.6.	Oozytenfärbungen	29
2.7.	Auswertung und Statistik	30
3.	Versuche und Ergebnisse	31
3.1.	ENaC und hSGK1	31
3.1.1.	Stimulation des ENaC durch die hSGK1	31
3.1.2.	Zeitlicher Verlauf der ENaC-Stimulation durch die hSGK1	33
3.1.3.	Koexpression der ENaC-Untereinheiten α-, $\alpha\beta$- und $\alpha\gamma$-ENaC mit hSGK1 und hSGK1^{K127R}	35
3.1.4.	Hemmung durch Amilorid	36
3.1.4.1.	$\alpha\beta\gamma$-ENaC	37
3.1.4.2.	$\alpha\gamma$-ENaC	39
3.1.5.	Hemmung durch N-Ethyl-Isopropyl-Amilorid (EIPA)	40
3.1.6.	Sensitivität gegenüber Natrium	42
3.1.7.	Wirkung von 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)	44
3.2.	Kaliumkanäle und hSGK1	47
3.2.1.	Kir2 (inward rectifier)	47
3.2.2.	I_{Ks}-Kanal	48
3.2.3.	Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4 und Kv1.5	48
3.3.	Kv1.3 und hSGK1	51
3.3.1.	Stimulation des Kv1.3 durch die hSGK1-Mutante hSGK1^{S422D}	51
3.3.2.	Zeitlicher Verlauf der Stimulation	53
3.3.3.	Spannungsabhängigkeit	55
3.3.4.	Verhalten gegenüber Kanalblockern	58
3.3.4.1.	Hemmung durch Tetraethylammonium (TEA)	58
3.3.4.2.	Hemmung durch Margatoxin (MTX)	60
3.3.5.	Wirkung von Chelerythrin	62
3.3.6.	Inaktivierung des Kv1.3	63
3.3.7.	Deletion des N-Terminus	68
3.3.8.	Exozytosehemmung durch Brefeldin A (BFA)	69

3.3.9. Immunfluoreszenzfärbungen	71
4. Interpretation und Diskussion	73
4.1. Oozyten als Expressionssystem	73
4.2. Lösungen	74
4.3. Geräte	74
4.4. ENaC und hSGK1	75
4.4.1. Wirkung der hSGK1 auf den ENaC	75
4.4.2. Pharmakologische Hemmung	77
4.4.3. Sensitivität gegenüber Natrium	78
4.4.4. Interaktion mit der Proteinkinase A	79
4.5. Kaliumkanäle und hSGK1	80
4.5.1. Stimulation des Kv1.3 durch die hSGK1-Mutante hSGK1^{S422D}	81
4.5.2. Spannungskinetik	82
4.5.3. Inhibition durch Margatoxin und Tetraethylammonium	82
4.5.4. Hemmung der Proteinkinase C durch Chelerythrin	83
4.5.5. Inaktivierung des Kv1.3	84
4.5.6. Deletion am N-Terminus	85
4.5.7. Exozytosehemmung durch Brefeldin A	86
4.5.8. Oozytenfärbungen	88
4.6. Integration der Ergebnisse in den Mechanismus der Natriumresorption	88
5. Zusammenfassung	92
6. Literaturverzeichnis	95
7. Danksagung	110

II. Abkürzungen

ADH	Antidiuretisches Hormon
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
Arg (R)	Arginin
AS	Aminosäure(n)
ASDN	Aldosteron-sensitives distales Nephron
Asn (N)	Asparagin
Asp (D)	Aspartat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
BFA	Brefeldin A
C	Konzentration
CF	Cystic fibrosis, Zystische Fibrose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Chel	Chelerythrin
Cl ⁻	Chloridion(en)
DEPC	mit Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
H ⁺	Wasserstoffion(en)
hSGK	humane Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinase 3 Isoformen: hSGK1, hSGK2, hSGK3
I	gemessener Strom
I ₅₀	halbmaximaler Strom
IC ₅₀	Konzentration eines Hemmstoffs zur halbmaximalen Inhibition
K ⁺	Kaliumion(en)
K-Ras	G-Protein, durch Aldosteron induziert
Kv	spannungsabhängiger Kaliumkanal
Lys (K)	Lysin
MTX	Margatoxin
n	Zahl gemessener Oozyten

II. Abkürzungen

n_B	Boltzmann-Koeffizient
n_H	Hill-Koeffizient
Na^+	Natriumion(en)
$Na^+-K^+-ATPase$	ATP-abhängige Natrium-Kalium-Pumpe
Nedd4-2	Ubiquitin Protein-Ligase
PDK	Phosphoinositid-abhängige Kinase: PDK1 und PDK2
PHA 1	Pseudohypoaldosteronismus 1
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Ser (S)	Serin
TEA	Tetraethylammonium
Thr (T)	Threonin
<i>kursiv (hsgk1)</i>	DNA des entsprechenden Proteins
klein (hsgk1)	mRNA des entsprechenden Proteins
GROSS (hSGK1)	exprimiertes Protein

1. Einleitung

1.1. Zellvolumenhomöostase

Außer den wasserundurchlässigen apikalen Membrananteilen renal tubulärer Zellen im aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife weisen die Membranen nahezu aller Zellen eine hohe Permeabilität für Wasser auf. Transmembranäre Wasserbewegungen folgen osmotischen und hydrostatischen Druckgradienten in Abhängigkeit von der Permeabilität der Zellmembran [27].

Der osmotische Druck wird überwiegend von anorganischen Ionen getragen: intrazellulär dominieren K^+ , HCO_3^- , und Phosphationen, 90 % der extrazellulären Elektrolyte sind Natriumsalze, zwei Drittel davon liegen als Kochsalz (NaCl) vor, ein Drittel als Natriumbikarbonat ($NaHCO_3$) [27]. Volumenändernde Flüssigkeitsbewegungen sind im wesentlichen durch die osmotischen Druckgradienten zwischen Zytosol und Extrazellulärraum bedingt [118]. Die Verminderung der extrazellulären Osmolarität führt durch zellulären Wassereinstrom zur Zellschwellung, bei gesteigerter extrazellulärer Osmolarität kommt es hingegen zur Zellschrumpfung [27].

Auch bei konstanter extrazellulärer Osmolarität wird das Zellvolumen ständig durch den transmembranären Transport und den zellulären Metabolismus verändert. Zelluläre Funktion und Zellvolumen sind eng aneinander gekoppelt. Zur Kompensation der zellulären Volumenschwankungen findet ein gerichteter Ionenstrom statt, zusätzlich werden osmotisch aktive Substanzen synthetisiert oder abgebaut [118, 119]. Zellschwellung stellt ein anaboles Signal dar. Stark osmotisch wirksame Substanzen werden in weniger aktive umgewandelt: so werden Protein- und Glykogensynthese stimuliert, gleichzeitig aber Glykogenolyse und Proteolyse gehemmt [68, 119]. Im Rahmen der Zellvolumenabnahme werden nicht-selektive Anionenkanäle (Passage von Chlorid- und Bikarbonationen) und Kaliumkanäle aktiviert [118, 119]. Dies führt zu einem erhöhten Auswärtsstrom der anorganischen Ionen, verbunden mit einer Abnahme der zellulären Osmolarität und nachfolgend auch des Zellvolumens. Zellschrumpfung hingegen ist ein kataboler Stimulus, der zur Akkumulation osmotischer Teilchen führt. Die zelluläre Volumenzunahme erfolgt größtenteils über die Aktivierung des $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Kotransporters, des Na^+/H^+ -

Austauschers und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers. Der gesteigerte Natriumeinstrom führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Osmolarität und des Zellvolumens [68, 119].

Dem Zellvolumen wird bei der Regulation des zellulären Metabolismus große Bedeutung beigemessen [68, 118, 119]. Die Signalmechanismen, welche die Zellfunktion den Änderungen der Zellhydratation anpassen sind noch nicht zur Gänze geklärt. Zellvolumenänderungen könnten zu einer Induktion oder Repression regulatorischer Gensequenzen führen, deren Genprodukte die Expression oder die Aktivität einer Vielzahl zellulärer Komponenten beeinflussen könnten [118].

1.2. Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts

Die Niere ist das Organ, welches über die oben beschriebenen Mechanismen nicht nur das Volumen der eigenen Zellen aufrecht erhält, sondern durch Einwirkung auf das Plasmavolumen auch die Flüssigkeitsausscheidung und das extrazelluläre Milieu reguliert. Durch den Einfluß auf das zirkulierende Blutvolumen stellt die Niere das Zielorgan für die langfristige Blutdruckregulation dar [27].

Die Niere unterliegt einer neurohumoralen Regulation. Auf die Organfunktion nehmen Sympathikus und verschiedene Hormone Einfluß, wie das antidiuretische Hormon (ADH), das atriale natriuretische Peptid (ANP), sowie das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) [27].

1.3. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Renin wird in den granulierten Zellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere gebildet und in die Zirkulation abgegeben. Kontrollmechanismen für die Reninsekretion sind der Sympathikotonus, ein intrarenaler Barorezeptormechanismus, die Macula densa, der Gesamtnatriumbestand des Organismus und humorale Faktoren (Hemmung der Reninfreisetzung durch Angiotensin II, ADH, ANP; Stimulation durch β_1 -Agonisten, Prostaglandine, Dopamin, Histamin) [21].

Aus dem in der Leber produzierten α -Globulin Angiotensinogen wird unter dem Einfluß der Protease Renin das Dekapeptid Angiotensin I gebildet. Das Angiotensin Converting Enzyme spaltet vom karboxyterminalen Ende des Angiotensin I zwei Aminosäuren ab, wodurch das Oktapeptid Angiotensin II entsteht [21].

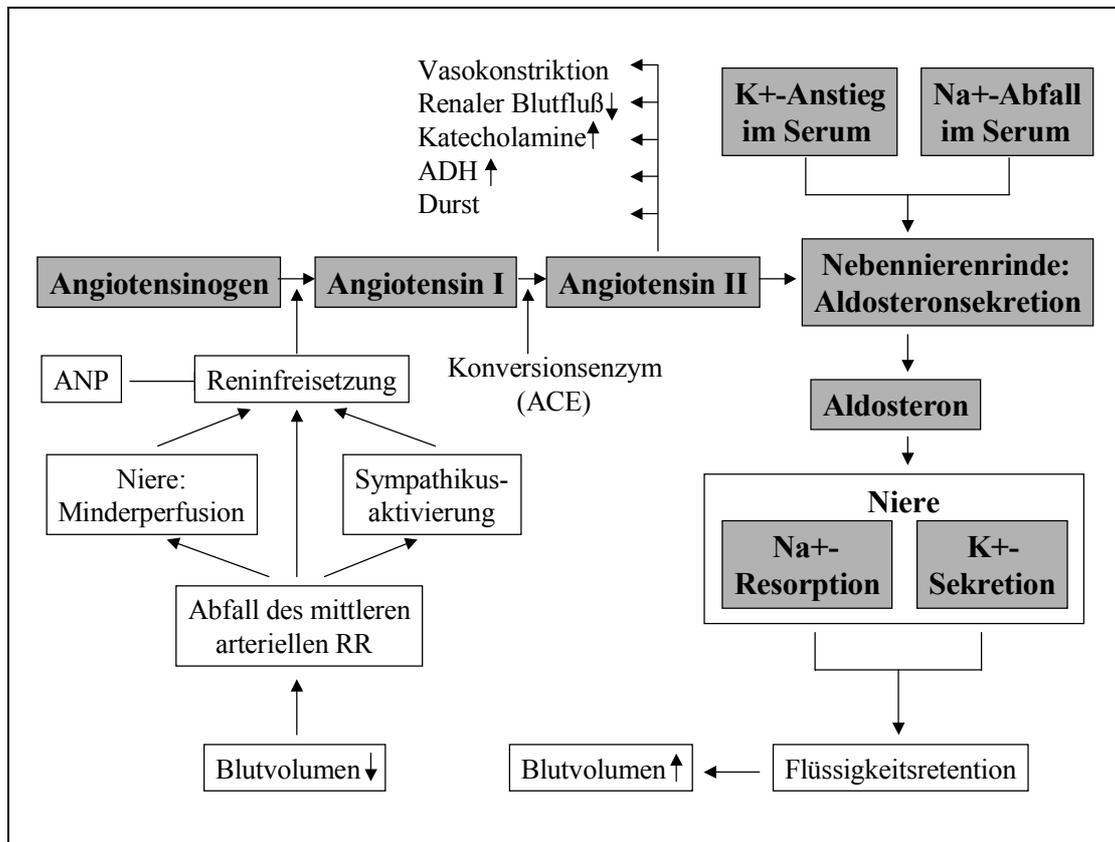


Abb. 1: vereinfachtes Schema zur Regulation von Blut- und Flüssigkeitsvolumen über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) (modifiziert nach Classen et al. 1998) [21]

Angiotensin II hemmt die Reninfreisetzung im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus. Es bewirkt eine sehr starke, direkte Vasokonstriktion der Arterien und erhöht den totalen peripheren Gefäßwiderstand zusätzlich über die Aktivierung des zentralen und peripheren sympathischen Nervensystems [21]. In der Niere moduliert Angiotensin II über die Konstriktion des Vas afferens und noch ausgeprägter des Vas efferens die glomerulären Filtrationsrate. Auf hypothalamischer Ebene löst Angiotensin II den Durstmechanismus aus und spielt zusätzlich bei der

Regulation des Salzappetits eine Rolle. Außerdem stellt Angiotensin II den wichtigsten Stimulus für die Sekretion von Aldosteron aus der Nebennierenrinde dar [21].

1.4. Regulation der Natrium-Kalium-Balance durch Aldosteron

Aldosteron ist das wichtigste Mineralokortikoid. Es wird in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde gebildet und dient der präzisen Einstellung der Natrium-Kalium-Balance [21, 71, 72]. Als Stimuli für die Aldosteronsekretion gelten Angiotensin II, Hyponatriämie sowie Hyperkaliämie [42]. Das Hormon steigert in Aldosteron-sensitiven Epithelien die Rückresorption von Na^+ und Wasser und erhöht zugleich die K^+ - und H^+ -Exkretion. Es resultiert eine Zunahme der Gesamtsalzmenge im Körper. In Kooperation mit der Osmoregulation (ADH-System) führt dies zu einer Vermehrung des extrazellulären Volumens [21, 111].

Aldosteron-sensitive Epithelien finden sich im distalem Kolon und in den Ausführungsgängen von Schweißdrüsen [72, 111]. Die größte Bedeutung im Rahmen der Hormonwirkung kommt jedoch der Niere, d. h. dem Aldosteron-sensitiven distalen Nephron (ASDN) zu. Das ASDN, bestehend aus Haupt- und Nebenzellen, setzt sich aus der zweiten Hälfte des distalen Tubulus und dem Sammelrohr zusammen [71, 72, 73]. Aufgrund asymmetrisch angeordneter Transportsysteme in den Hauptzellen des ASDN können Natriumionen aktiv resorbiert werden: Na^+ gelangt passiv entlang eines Konzentrationsgefälles durch den in der apikalen Membran lokalisierten Epithelialen Natriumkanal (ENaC) in die Zellen [107]. Über die in der basolateralen Membran lokalisierte, energieverbrauchende Na^+ - K^+ -ATPase werden die Na^+ -Ionen wieder aus den Zellen geschleust. Die Na^+ - K^+ -ATPase stellt die treibende Kraft für die Natriumresorption dar [107]. Es handelt sich um einen elektrogenen Transport. Über einen Antiportmechanismus werden gleichzeitig drei Natriumionen aus der Zelle heraus und zwei Kaliumionen nach intrazellulär geschafft [111].

Die K^+ -Ionen können über kaliumselektive Kanäle, die ebenfalls an der basolateralen Membran lokalisiert sind, recycelt werden. Durch die Na^+ - K^+ -ATPase wird ein trans-

epitheliales Potential erzeugt, das zur Reabsorption eines Gegenions (z. B. Cl^-) oder zur Sekretion eines Kations (K^+ oder H^+) genutzt werden kann [13, 71, 72].

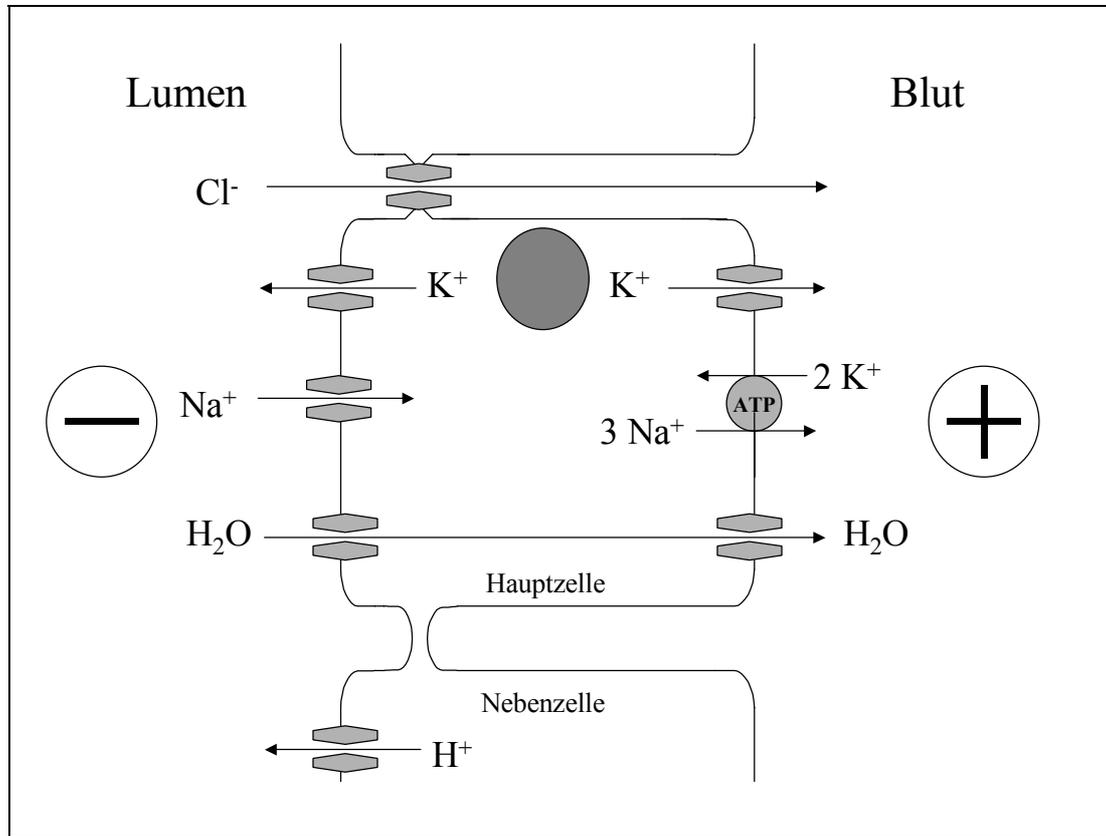


Abb. 2: Mechanismus des Ionentransports im Aldosteron-sensitiven distalen Nephron (ASDN): Na^+ strömt passiv entlang eines elektrochemischen Gradienten durch den ENaC (apikale, luminale Membran) in die Zelle. Das Membranpotential und der trans-epitheliale Gradient werden durch die basolateral lokalisierte Na^+ - K^+ -ATPase aufgebaut und dienen der Sekretion von Kationen (K^+ und H^+) oder der Resorption von Anionen (modifiziert nach Giebisch 1998) [41].

1.5. Der Epitheliale Natriumkanal (ENaC)

1.5.1. Physiologische Bedeutung und Verteilung des ENaC

Der Epitheliale Natriumkanal (ENaC) ist ein hochselektiver spannungsunabhängiger Kationenkanal, der sehr sensitiv durch das kaliumsparende Diuretikum Amilorid blockiert werden kann [36, 40, 91].

Die größte Verbreitung findet der Epitheliale Natriumkanal in den Epithelzellen. Seine Funktion besteht darin, Natrium entweder aus dem umgebenden Milieu oder aus einem transzellulären Flüssigkeitskompartiment wie Urin, Fäzes, Schweiß, Schleim oder Surfactant der Lungen zu resorbieren [40]. Die beschriebene asymmetrische Anordnung von Transportsystemen (Abb. 2) erlaubt einen aktiven transepithelialen Natriumtransport [40].

Die Transportraten für Natrium sind besonders hoch, wenn bei Na^+ -armer Diät oder Flüssigkeitsmangel die Resorption über das Mineralokortikoid Aldosteron stimuliert wird [40]. Das Hormon entfaltet seine größte Wirkung am ASDN, dem Gewebe mit der höchsten ENaC-Expressionsdichte. Unter Aldosteroneinfluss kann die Natrium-Resorption derart verstärkt werden, daß der Endharn annähernd Na^+ -frei wird [40, 72]. Außerdem wirkt Aldosteron in vielen anderen ENaC-exprimierenden Geweben im Körper, wo potentiell NaCl verlorengehen könnte: Tränen-, Speichel- und Schweißdrüsen, exokrine Drüsen des Gastrointestinaltrakts, mit hoher Expressionsdichte im Kolon [27, 40]. Auch im fetalen Lungenepithel und Typ-II-Alveolarzellen wird ENaC exprimiert. In der fetalen Lunge dient die Natriumresorption der Trockenlegung der Alveolen und Adaptation an die Luftatmung. Im Erwachsenenalter soll der Entwicklung eines Lungenödems entgegengewirkt werden [10, 50, 52, 59, 76].

In vielen Epithelialen Geweben findet sich eine Koexpression aus ENaC und Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Cl^- -Kanal (CFTR). Bei dem Krankheitsbild der zystischen Fibrose (Mukoviszidose) ist die Cl^- -Permeabilität via CFTR gestört. Dies führt wahrscheinlich zu einer gesteigerten Aktivität des ENaC [54].

1.5.2. Pathophysiologie

Ein irregulär funktionierender ENaC ist mit mehreren Krankheitsbildern wie Pseudohypoaldosteronismus 1 (PHA1), Liddle Syndrom und zystischer Fibrose assoziiert [89].

Beim Liddle Syndrom (Pseudohyperaldosteronismus) handelt es sich um eine seltene, autosomal dominant vererbte Form der Hypertonie. Ihr liegt eine "gain-of-function"-Mutation mit Aktivitätssteigerung des ENaC zugrunde [40, 48]. Aufgrund

der Mutation ist die Interaktion zwischen Ubiquitinationsprotein Nedd4-2 und Kanalprotein gestört [43, 56, 101, 102].

Der Pseudohypoaldosteronismus Typ I (PHA1) ist ein Krankheitsbild mit erhöhtem Salzverlust. Der Erkrankung liegt eine "loss-of-function"-Mutation des ENaC zugrunde. Basendeletionen oder Punktmutationen in der N-terminalen Region führen zu einer Verminderung der Aktivität des ENaC [6, 40, 45, 51, 58, 87, 90].

Die Zystische Fibrose (CF, Mukoviszidose) ist die häufigste zum Tode führende Stoffwechselerkrankung des Menschen [21]. Durch eine Defektmutation des CFTR-Gens kommt es zu einer Störung des Ionentransports für Natrium und Chlorid an apikalen Zellmembranen, woraus eine pathologische Mukusviskosität resultiert [21]. Bemerkenswert ist, daß im Lungenepithel von CF-Patienten erhöhte hSGK1-mRNA-Konzentrationen nachgewiesen wurden, die nicht auf den Defekt des Cl⁻-Kanals zurückzuführen waren. Die hSGK1 stimuliert in CF-Zellen sowohl die Natrium-, als auch die Chloridleitfähigkeit. Möglicherweise stellt die hSGK1 einen weiteren pathogenetischen Faktor der CF dar [117].

1.5.3. Struktureller Aufbau und Charakteristik des ENaC

Der Epitheliale Natriumkanal stellt ein heterooligomeres Protein dar, das sich aus drei homologen Untereinheiten, α , β und γ , zusammensetzt, die als Produkt einer Gentrifikation aufgefaßt werden können [30, 37, 40, 91]. Beim stöchiometrischen Aufbau gehen die meisten Autoren von einer heteroterameren Struktur (vier Untereinheiten: 2α , β , γ) des integralen Membranproteins aus [33, 34]. Zur Ausbildung eines Kanals mit maximaler Funktion ist das Vorhandensein aller drei Untereinheiten nötig [30].

Die α -, β - und γ -Peptide bestehen aus 698, 638 bzw. 650 Aminosäuren [1, 99] mit einem Molekulargewicht von 80 bis 95 kDa [40]. Sie besitzen je zwei 30 bis 51 Aminosäuren lange, hydrophobe, transmembranäre Segmente (M1 und M2), die sich als Kombination aus je einem α -helikalen Anteil und je einer hydrophoben β -Faltblatt-Struktur ergeben [40]. Diese werden durch einen langen hydrophilen, extrazellulären Loop verbunden, welcher mit ca. 500 Aminosäuren den größten Anteil am Kanal-

protein darstellt [40, 91]. Sowohl C- als auch N-Terminus sind intrazellulär lokalisiert [3, 91].

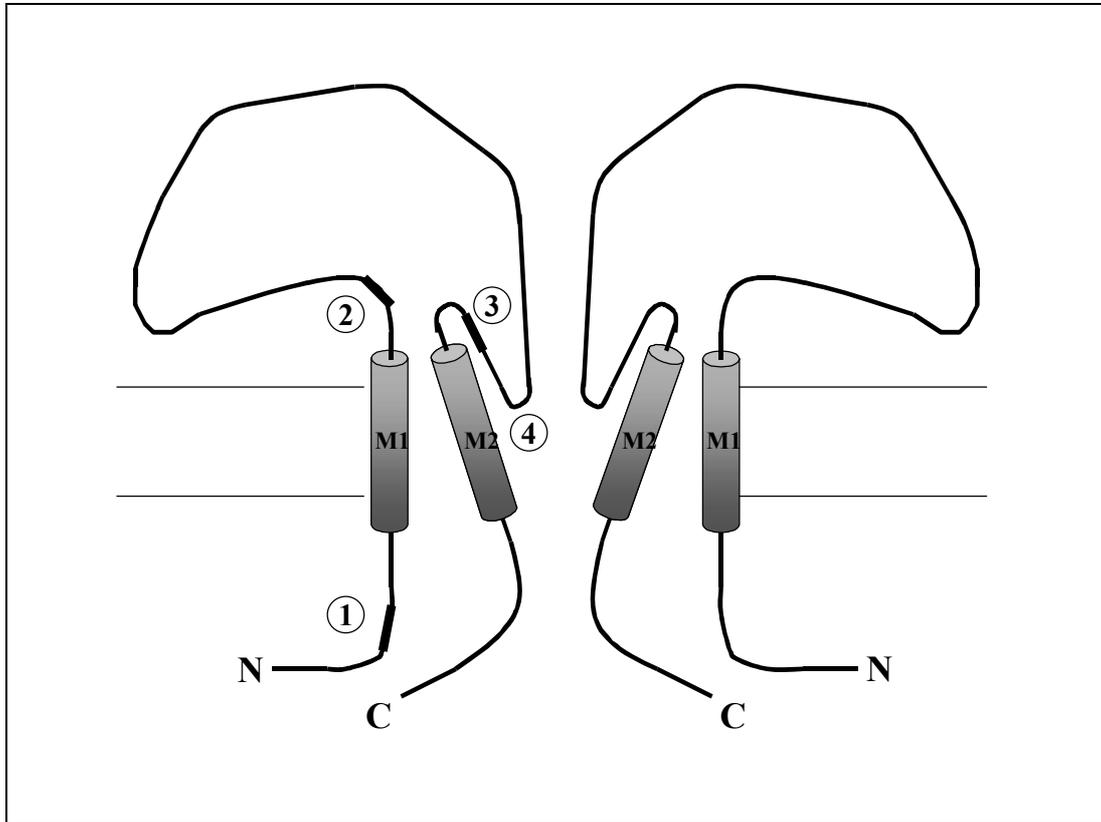


Abb. 3: Funktionelle Domänen des Epithelialen Natriumkanals (ENaC): Schemazeichnung von zwei in die Zellmembran integrierten Untereinheiten. Jede Untereinheit besitzt zwei transmembranäre Domänen (M1 und M2) mit kurzen zytoplasmatischen Amino- und Carboxy-Termini und einem großen extrazellulären Loop. (1) Gating, (2) und (3) Amiloridbindungsstellen, (4) Selektivitätsfilter (modifiziert nach Verrey et al. 1997) [111].

Die äußere Kanalpore, die von α -, β - und γ -Peptid gebildet wird, stellt sich als negativ geladener Trichter dar, der Kationen unselektiv anzieht [95, 99]. Die Pore verengt sich in zytoplasmatischer Richtung und hindert alle positiv geladenen Teilchen außer den sehr kleinen Kationen wie Na^+ , Li^+ und H^+ am Durchtritt [82, 97, 95, 99]. Der ENaC eine hohe Selektivität für Li^+ und Na^+ über K^+ auf mit einem Permeabilitätsverhältnis Li^+ zu Na^+ zu K^+ von mindestens 150 : 100 : 1 [40, 57].

Die Amiloridbindungsstelle steht in enger räumlicher Beziehung zur äußeren Kanal-pore und befindet sich auf den extrazellulären Domänen der ENaC-Untereinheiten [59, 91]. Die Inhibition durch Amilorid ist hochsensitiv, der Amilorid-Kanal-Komplex unterliegt jedoch einer raschen Dissoziation, wodurch die Blockierung leicht reversibel ist [6, 59, 40, 99].

1.5.4. Regulation des ENaC

Die Regulation des ENaC findet über Modulation der Kanalaktivität und Expressions-dichte durch akzessorische Proteine bzw. Kinasen statt: Nedd4-2, Syntaxin 1a, CFTR, SGK, K-Ras2a, Cap1 (channel activating protease 1), PKA, PKC [40, 89, 109, 110]. Auf die Regulation durch PKA, PKC, SGK, CFTR und Nedd4-2 soll näher eingegangen werden.

Eine Steigerung der ENaC-Aktivität wird durch den zytoplasmatischen second messenger cAMP nach ADH-Stimulation beobachtet. Die Aktivitätszunahme ist wahrscheinlich Folge einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und eines spezifischen Phosphorylierungsvorgangs. Bislang ist jedoch unklar, ob das Kanal-protein direkt phosphoryliert wird, oder ob noch andere Aktivierungsschritte dazwischen liegen. Möglicherweise spielen auch weitere akzessorische Proteine eine Rolle [40, 46, 89].

Insulin wirkt über die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) - verbunden mit einer Zunahme des intrazellulären Kalzium - auf den ENaC [40]. Die direkte Wirkung der PKC differiert zwischen den ENaC-Untereinheiten: die Kinase reduziert die Ober-flächenexpression der β - und γ -Untereinheiten, nicht aber jene der α -Proteine. Dies führt wahrscheinlich zu einer länger anhaltenden Hemmung der Natriumresorption [105].

In vielen epithelialen Geweben wird der ENaC mit dem CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) koexprimiert. Der CFTR hemmt die Funktion des ENaC durch Modulation des Gating [8, 88] oder Beeinflussung der Natriumper-meabilität [40]. Dies erklärt auch die gesteigerte Natriumreabsorption bei der zystischen Fibrose, einem Krankheitsbild mit defektem CFTR [65]. Der CFTR

reguliert die Funktion des ENaC, umgekehrt wird jedoch auch die CFTR-Aktivität durch den ENaC moduliert, d.h. sie beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Aktivität [54, 88, 117].

Aldosteron reguliert den ENaC über eine Änderung der Genexpression und Induktion der Protein-de-novo-Synthese. Die Aldosteronwirkung wird zumindest teilweise über die Serin-Threonin-Kinase SGK (1.7.6.) vermittelt [40, 41, 71, 75, 112, 117]. Die SGK hat in der Feinabstimmung der Natriumresorption wahrscheinlich eine modulierende Funktion, indem sie möglicherweise das letzte Bindeglied zwischen Kinasen und Proteinaktivierung darstellt (Abb. 7) [18, 127].

Das Ubiquitinationsprotein Nedd4-2 stellt ein weiteres Regulatorprotein dar. Es enthält multiple WW-Domänen, welche mit den PY-Motiven der C-Termini (Defekt der PY-Motive ist Ursache des Liddle Syndroms) der ENaC-Untereinheiten interagieren. Unter basalen Bedingungen, d.h. in nicht phosphoryliertem Zustand, supprimiert Nedd4-2 den Natriumtransport durch Steigerung der Endozytose und des Abbaus des ENaC [26, 55, 101]. Die Phosphorylierung des Ubiquitinationsproteins an Serin- oder Threonin-Residuen hemmt jedoch dessen Affinität zum Epithelialen Natriumkanal und reduziert somit den supprimierenden Einfluß [26]. Es wurde gezeigt, daß die SGK1 Nedd4-2 phosphoryliert und dadurch die ENaC-Aktivität steigert [26].

1.6. Kaliumkanäle

Kaliumkanäle kommen ubiquitär im Pflanzen- und Tierreich vor. Sie tragen bei zur Kontrolle des Kaliumstroms, des Zellvolumens, der Hormon- und Transmitterfreisetzung, sowie zur Erregbarkeit von Neuronen und Muskelzellen. Kaliumkanäle können über die Änderung des Membranpotentials, den metabolischen Zustand der Zelle oder durch Neurotransmitter und Hormone reguliert werden [53].

Die physiologische Bedeutung der Kaliumkanalfunktion wird durch pathologische Veränderungen der Kanäle und der assoziierten Proteine aufgrund von Mutationen deutlich. Es ergeben sich neurologische Krankheitsbilder wie Ataxie [22, 53] und Epilepsie, kardiale Arrhythmien, Innenohrtaubheit [44, 53], Nierenfunktionsstörungen oder die familiär bedingte hyperinsulinämische Hypoglykämie der Kindheit [53].

Die Kaliumkanäle werden in drei große Gruppen unterteilt: man unterscheidet sechsfach-transmembranäre spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (Kv-Kanäle), vierfach-transmembranäre Kaliumkanäle, verantwortlich für die Hintergrundleitfähigkeit (K2P), und zweifach-transmembranäre einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (Kir) [53].

1.6.1. Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle

Gene, die für spannungsabhängige Kaliumkanäle kodieren, wurden erstmals 1987 bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* isoliert. Nachfolgend wurden auch bei Maus, Ratte, Mensch und anderen Säugern die Gensequenzen gefunden, welche für spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (Kv-Kanäle) kodieren. Heute sind mindestens 18 verschiedene Gene für Kv-Kanäle bekannt. Diese Gene werden in vier Subfamilien untergliedert, entsprechend sechs *Drosophila*-Genen für spannungssensitive Kaliumkanäle. Untereinander stimmen die Proteine in ca. 40 % ihrer Aminosäuresequenz überein. Die Säugergene sind den homologen Genen von *Drosophila melanogaster* zugeordnet worden [1]:

- | | | |
|-----|---------|---------------|
| (1) | Shaker: | Kv1.1 – Kv1.7 |
| (2) | Shab: | Kv2.1 – Kv2.2 |
| (3) | Shaw: | Kv3.1 – Kv3.4 |
| (4) | Shal: | Kv4.1 – Kv4.3 |

1.6.2. Struktur und Funktionsmechanismus spannungsgesteuerter Kaliumkanäle

Die spannungssensitiven Kaliumkanäle setzen sich aus vier Untereinheiten (α -Untereinheiten) mit charakteristischem Aufbau zusammen. Diese sind jedoch nicht, wie bei anderen oligomeren Membranproteinen, über kovalente Bindungen gekoppelt. Die Zusammensetzung der α -Untereinheiten zu Tetrameren wird von der T1-Domäne,

einem zwischen N-Terminus und S₁-Segment im Zytoplasma lokalisierten Abschnitt der Polypeptidkette, determiniert. Die T1-Domäne bestimmt sowohl die Bildung der Tetramere, als auch die Zusammensetzung im Falle von Heteromultimeren (1.6.4.) [1, 94]. Jede Untereinheit enthält sechs α -helikale, hydrophobe, transmembranäre Segmente (S₁ – S₆) [103, 108]. Sowohl das C-, als auch das N-terminale Ende des Kanalproteins befinden sich intrazellulär. Der Abschnitt zwischen S₅ und S₆, auch SS₁-SS₂-Loop, H₅- oder P-Region genannt, bildet den inneren Anteil der Kanalpore und dient somit als Selektivitätsfilter. Peptidtoxine auf der extrazellulären Membranseite interagieren mit der Porenregion [53]. Das S₄-Segment mit seiner positiven Ladung fungiert als Spannungssensor: über transmembranäre Potentialschwankungen triggert der Proteinabschnitt eine Konformationsänderung des Kanalproteins. Dies führt zur Aktivierung des Kanals den Ionenfluß [1, 53, 100].

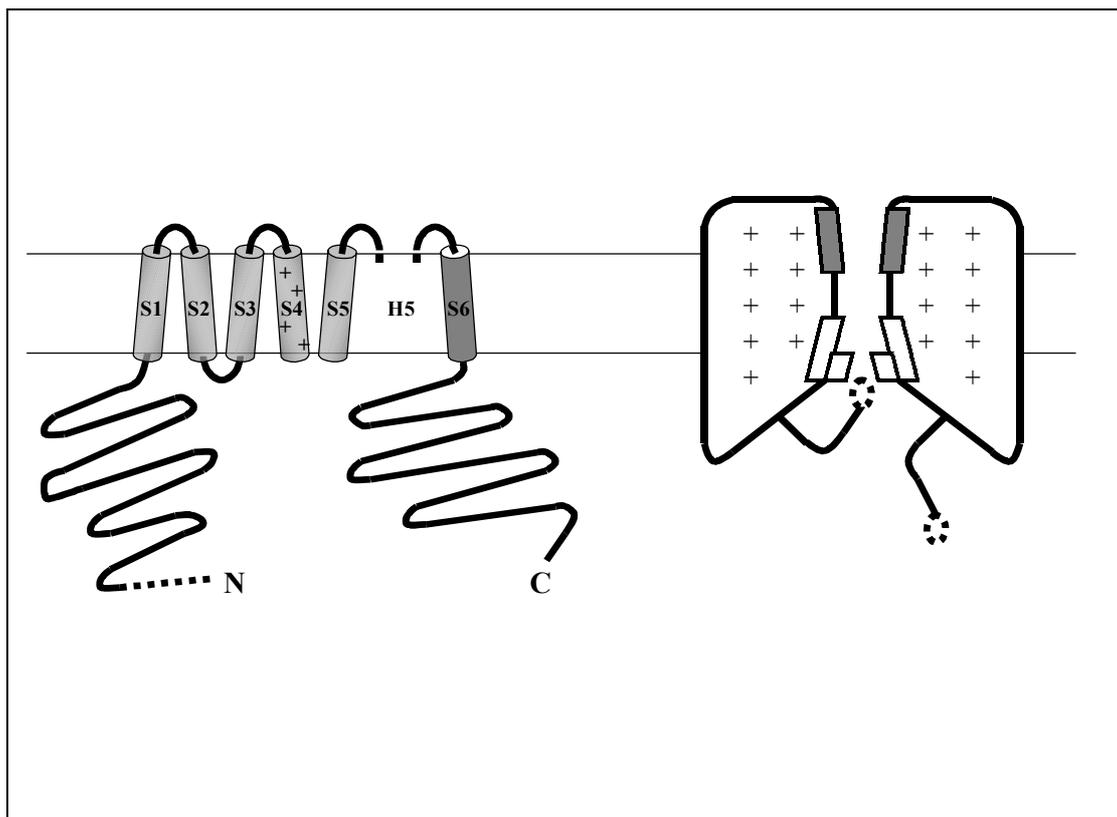


Abb. 5: Strukturelle Elemente der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle: N-Terminus als Inaktivierungseinheit; S₄-Region als Teil des Spannungssensor; S₄-S₅-Loop, der mit dem Inaktivierungspartikel interagiert und die H₅- und S₆-Segmente, welche die Kanalpore mit dem Selektivitätsfilter formen (modifiziert nach Jan & Jan 1997) [53].

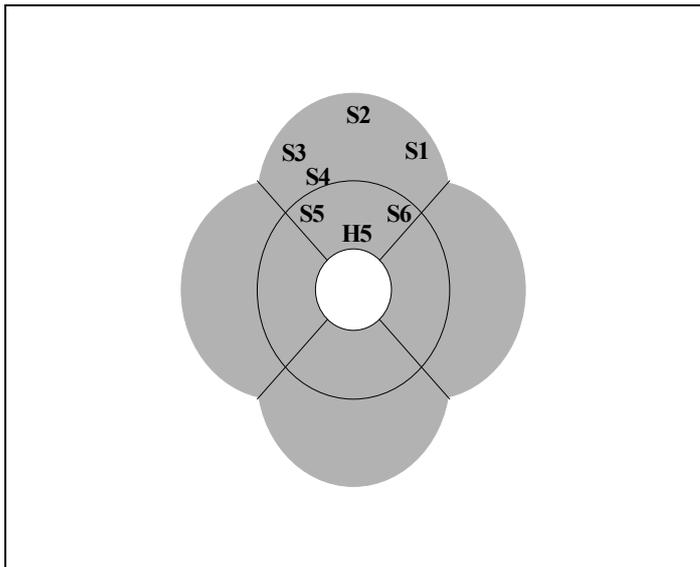


Abb. 4: Membrantopologie der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle: Zusammensetzung aus vier α -Untereinheiten. In der äußeren Schale befinden sich die Segmente S1, S2, S3 und S4 (Spannungssensor), in der inneren Schale sind die Segmente S5 und S6 lokalisiert, sowie die H5-Region (Selektivitätsfilter) (modifiziert nach Jan & Jan 1997) [53]

Die Öffnungsphase wird durch N- und C-Typ-Inaktivierung beendet [53]. Bei der N-Typ-Inaktivierung handelt es sich um einen “ball-and-chain“-Mechanismus. An jedem N-Terminus der vier α -Untereinheiten befindet sich eine bewegliche, kugelhähnliche positiv geladene Struktur, welche auf der zytoplasmatischen Seite die negativ geladene Kanalpore verschließen kann [1, 11, 53]. Hiervon völlig unabhängig läuft die langsamere C-Typ-Inaktivierung ab. Sie betrifft die extrazelluläre Seite der Kanalpore und beruht auf einer Konformationsänderung des Kanalproteins [1, 53].

1.6.3. Akzessorische β -Untereinheiten

Mit den α -Untereinheiten sind bis zu vier weitere Proteine, β -Untereinheiten genannt, auf der zytoplasmatischen Membranseite assoziiert. Diese enthalten im Gegensatz zu den α -Untereinheiten keine transmembranären Segmente. Bislang sind vier verschiedene β -Untereinheiten bei den Säugern bekannt: Kv- β 1.1, Kv- β 1.2, Kv- β 1.3 und Kv- β 2.1. Sie sind wahrscheinlich an der Modulation der Kanalexpression beteiligt und nehmen zusätzlich Einfluß auf die biophysikalischen Eigenschaften der Kv-Kanäle [1, 53, 78]. Auch die β -Untereinheiten besitzen eine “ball-and-chain“-Struktur zur Inaktivierung der integralen α -Membranproteine [78].

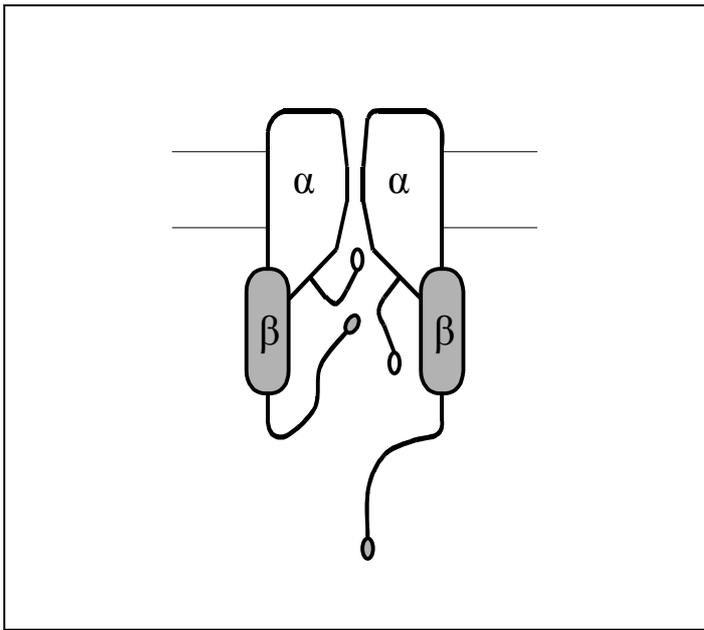


Abb. 6: Inaktivierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle durch β -Untereinheiten: die zur Inaktivierung dienende "ball-and-chain" Struktur ist Teil der assoziierten β -Untereinheit. In den Kanalkomplexen mit der Struktur $\alpha_4\beta_4$ bilden die α -Untereinheiten membranüberspannend die Pore, die β -Untereinheiten liegen ihnen auf der zytosomatischen Seite an.
(modifiziert nach Aidley und Stanfield 1996) [1]

1.6.4. Bildung von Heteromultimeren

Die Möglichkeit zur Bildung von Heteromultimeren, d.h. Kanälen, zusammengesetzt aus vier differenten α -Untereinheiten, vergrößert die Vielfältigkeit der Kaliumkanalfunktion noch einmal erheblich. Es existieren jedoch nur Hybridkanäle mit α -Einheiten aus derselben Unterfamilie, eine Kombination aus verschiedenen Subgruppen ist nicht möglich [1]. Heteromultimere sind zum Beispiel nachgewiesen in Neuronen von Mäusen (mKv1.1 und mKv1.2) und bei Ratten (rKv1.1 und rKv1.4) [1, 94, 123].

Durch die Bildung von Heteromultimeren läßt sich die Kaliumleitfähigkeit der einzelnen Zelle noch individueller modulieren und somit auf die verschiedenen Aufgaben der Zellen in den Organsystemen abstimmen [1].

1.6.5. Der spannungsgesteuerte Kaliumkanal Kv1.3

Der Kv1.3 gehört zu der mit "Shaker" verwandten Unterfamilie spannungsgesteuerter Kaliumkanäle (1.6.1.), dessen Existenz in folgenden Geweben oder Zellen nachgewiesen ist: Thymus, Milz, Lunge, Pankreasinseln [20], Nierenmark [128], immu-

kompetente Zellen wie T- und B-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen und Makrophagen [20, 47, 63, 69]

1.6.6. Regulation des Kv1.3

Expression und Funktion der spannungssensitiven Kaliumkanäle werden durch eine Vielzahl an Mechanismen reguliert. Die posttranslationale Modulation des Kv1.3 durch Proteinkinasen hat Einfluß auf die Stromamplitude, die Spannungsabhängigkeit oder die kinetischen Eigenschaften des Kanals [53]. So enthält die Aminosäuresequenz des Kv1.3 mehrere potentielle Loci zur Phosphorylierung durch Proteinkinasen wie die Serin-Threonin-Kinasen, die Proteinkinase A (PKA), die Proteinkinase C (PKC) oder die Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) [20, 49].

Die Phosphorylierung des Kanalproteins führt zu einer Erhöhung der Maximalleitfähigkeit G_{\max} . Außerdem findet eine Verschiebung der Aktivierungs- und Inaktivierungsschwelle zu positiveren Membranpotentialen statt. Hauptsächlich verantwortlich für die Aktivierung eines normal funktionierenden Kanals ist die Proteinkinase C. Die Proteinkinasen sind hierbei in ein komplexes Regulationsnetzwerk eingebunden. So zeigt die konkurrierende Phosphorylierung zwischen PKA und PKC keine additive Wirkung, man beobachtet statt dessen eine inhibitorische Wechselwirkung, bei der sich die Wirkungen von PKA und PKC gegenseitig aufheben [20].

Es hat sich gezeigt, daß der Kanal in vivo bereits in phosphoryliertem Zustand vorliegt, und daß die Phosphorylierung durch die PKC zum Beispiel Voraussetzung für eine normale T-Zell-Funktion ist [20].

1.7. Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinase (SGK)

Die Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinase SGK wurde erstmals aus einer Rattentumorzelllinie isoliert (rSGK) und ursprünglich als Produkt eines durch Serum und Glukokortikoide induzierten Gens identifiziert [122]. Eine homologe Kinase des

Menschen (hSGK) wurde bei der Suche nach zellvolumensensitiven Transkripten in einer humanen Hepatozytomzelllinie (HepG2) entdeckt [24, 119, 120].

1.7.1. Einteilung der hSGK innerhalb der Proteinkinasen

Die humane Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinase (hSGK) gehört zu den Serin-Threonin-Kinasen. Das entsprechende Gen wird zur Gruppe der primären Responsgene (“immediate early genes“) gerechnet [119].

Die katalytische Aktivität der meisten bislang bekannten Proteinkinasen wird posttranskriptionell durch Protein-Protein-Interaktionen und Phosphorylierung reguliert. Die Serin-Threonin-Kinasen scheinen jedoch in erster Linie auf Transkriptionsebene über Hormone und mitogen induzierte Stoffwechselwege reguliert zu werden [122]. Sie weisen eine schnelle Induktion, eine kurze Halbwertszeit und eine besonders kurze Regulationssequenz auf, die mit den Regulationssequenzen anderer Proteinkinasen keine nennenswerten Homologien besitzt [118, 119]. Die Aminosäuresequenzen im katalytischen Zentrum von hSGK anderen Kinasen der second messenger Familie (z.B. Proteinkinasen A, B oder C) sind zu 50 % identisch [84, 121, 126]. Dahingegen weist die extrakatalytische Proteinregion weder zu einer der bekannten Proteinkinasen, noch zu irgendeinem anderen Protein Sequenzübereinstimmungen auf [121].

1.7.2. hSGK-Isoformen

Bislang sind drei Isoformen der hSGK bekannt (hSGK1, hSGK2 und hSGK3), von denen die hSGK1 am besten untersucht ist. Die Molekulargewichte betragen 49 kDa für hSGK1 (433 AS), 41.1 und 47.6 kDa für hSGK2 (2 Splicevarianten: hSGK2 α : 367 AS und hSGK2 β : 427 AS) sowie 49 kDa für hSGK3 (429 AS) [61]. Die Aminosäuresequenzen der katalytischen Zentren sind zu 80 % identisch, die kurzen C-terminalen, nicht-katalytischen Domänen gleichen sich nur zu 44 – 68 %, und die N-Termini weisen nahezu keine Homologie auf [61].

Trotz der hohen Sequenzübereinstimmung im katalytischen Zentrum unterscheiden sich die Isoformen in mehreren Aspekten, wie dem Vorkommen in unterschiedlichen Geweben sowie den Mechanismen zur Regulation der Kinaseaktivität [61]: *hsgk1*- und *hsgk3*-mRNA kommen in nahezu allen Geweben mit unterschiedlich hohen Expressionslevels vor. Transkripte von *hsgk2* sind bislang nur in Leber, Niere, Pankreas und Gehirn nachgewiesen [61, 62, 120]. Die hSGK1 wird auf Transkriptionsebene sowie posttranslational durch eine große Zahl extrazellulärer Signale reguliert. Über die transkriptionelle Regulation der beiden Isoformen hSGK2 und hSGK3 ist bislang wenig bekannt. Posttranslational können auch sie durch Phosphorylierung aktiviert werden [68]. Im Gegensatz zu *hsgk1* werden *hsgk2*- und *hsgk3*-Transkription nicht durch Glukokortikoide oder Serum induziert. [61]

1.7.3. Zelluläre Verteilung und Physiologie der hSGK1

Die humane SGK1 ist in nahezu allen Organen nachgewiesen, die höchsten Expressionslevel finden sich jedoch in Niere, Pankreas, Leber, Intestinum und Herz [60, 61, 119]. Die Kinase spielt insbesondere bei der Aktivierung bestimmter Kalium-Natrium- und Chloridkanäle eine Rolle und läßt einen Einfluß auf Prozesse wie Zelltod, neuronale Erregbarkeit und den renal gesteuerten Natriumhaushalt vermuten [68, 113]. Bei Patienten mit diabetischer Nephropathie wurden anhaltend hohe *hsgk1*-Transkriptionslevel in der geschädigten Niere gefunden [64, 66, 68]. Möglicherweise ist die hSGK1 auch in der Pathogenese von Hypertonie, Adipositas, Hyperinsulinämie und Insulinresistenz involviert [14, 67, 68, 86, 125].

Immunfluoreszenzuntersuchungen zur intrazellulären Lokalisation des hSGK1-Proteins zeigten ein retikuläres Verteilungsmuster. Das hSGK1-Protein findet sich intrazellulär wahrscheinlich mit dem zytoskeletalen Bestandteil β -Tubulin assoziiert [119].

1.7.4. Regulation der hSGK1 über die Transkription

Die Abhängigkeit der hsgk1-Transkriptionslevel von extrazellulären Stimuli ist typisch für die auf Transkriptionsebene regulierten Serin-Threonin-Proteinkinasen.

Als Transkriptionsinduktoren für hsgk1 gelten Glukokortikoide, Aldosteron, Antidiuretisches Hormon (ADH), Follikel stimulierendes Hormon (FSH) und Serum [61, 122]. Bei hoher extrazellulärer Osmolarität kommt es über den Vorgang der osmotischen Zellschrumpfung zu einer Erhöhung der hsgk1-Transkriptionslevel [120, 121, 122]. Auch bei Neuronenverletzungen wurden erhöhte hsgk1-Konzentrationen festgestellt [31, 62, 122]. Bei entzündlichen Prozessen ist eine massive Zunahme des hsgk1-Signales bei in-situ-Hybridisierung zu beobachten. Die Zytokine TGF- β 1 (transforming growth factor beta 1) und Interleukin 4 (IL 4) sind als Transkriptionsinduktoren in Makrophagen identifiziert worden [23, 119, 124].

Auf einen Stimulus kommt es unabhängig von der de-novo-Proteinsynthese innerhalb von Minuten zu einer raschen Induktion der hsgk1-Transkription. Dieser Vorgang wird daher auch als "immediate early"-Regulation bezeichnet [119, 126]. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit liegt das Konzentrationsmaximum an hsgk1-mRNA bereits zwei Stunden nach Stimulation vor [12].

1.7.5. Posttranslationale Aktivierung der hSGK1

Die Aktivität der hSGK1 wird über ein komplexes Regulationssystem gesteuert. Zusätzlich zur Regulation auf Transkriptionsebene findet eine posttranslationale Modifikation der enzymatischen Aktivität durch multiple Proteinkinasen statt. Zu diesen gehören die Phosphoinositid-abhängigen Kinasen PDK1 und PDK2 sowie die Proteinkinase A (PKA) [86]. PDK1 und PDK2 bilden in diesem komplexen Regulationssystem eine gemeinsame Endstrecke und aktivieren die hSGK1 direkt durch Phosphorylierung [86]. Ihnen vorgeschaltet ist die PI₃K (Phosphatidylinositol-3-Kinase), die ihrerseits die Phosphoinositid-abhängigen Kinasen reguliert [62, 84, 112]. Die hSGK1 besitzt zwei Phosphorylierungsstellen, Thr²⁵⁶ und Ser⁴²² (hSGK2: Thr¹⁹³, Ser³⁵⁶; hSGK3: Thr²⁵³, Ser⁴¹⁹), denen bei der Aktivierung eine Schlüsselrolle

zukommt. Die Phosphorylierung von Thr²⁵⁶ durch die PDK1 und Ser⁴²² durch die PDK2 erhöht die Aktivität der Kinase deutlich [31, 62, 86]. Die durch PDK1 katalysierte Aktivierung ist jedoch um ein vielfaches effektiver, wenn Ser⁴²² bereits in phosphoryliertem Zustand vorliegt. Die Wirkung der PDK1 scheint daher stark von der Aktivität der PDK2 abhängig [31, 62].

Stimuli zur posttranslationalen Aktivierung der hSGK1 über die beschriebenen Mechanismen sind Exposition gegenüber Insulin, IGF (Insulin-like Growth Factor 1), Serum oder oxidativem Stress (p53-Kinase) [12, 61, 62, 86].

1.7.6. Rolle der hSGK1 bei der Aldosteronwirkung

Die pleiotrope Wirkung von Aldosteron im Epithel wird durch Mechanismen vermittelt, die sowohl auf Transkriptions- als auch auf Posttranskriptionsebene zu suchen sind. Die durch Aldosteron induzierte Zunahme der Natriumreabsorption im ASDN kann schematisch in zwei Phasen untergliedert werden [72, 111, 113]: die Frühphase der Aldosteronwirkung, die nach einer Latenz von 20 bis 60 Minuten in Erscheinung tritt, beruht auf der Aktivierung der bereits bestehenden Transportmaschinerie (ENaC und Na⁺-K⁺-ATPase) durch Regulatorproteine [107, 113]. Der Übergang in die Spätphase ist fließend, sie beginnt etwa zweieinhalb Stunden nach Aldosteronstimulation. Die späte Aldosteronwirkung stellt eine anabole Reaktion dar, während der neue Transportproteine synthetisiert werden, und die Zellen des ASDN sich weiter differenzieren [111, 113]. Sowohl frühe, als auch späte Aldosteronantwort werden auf Transkriptionsebene über die mRNA-Level reguliert. Aldosteron induziert zusätzlich zu den Transportproteinen auch die Synthese bestimmter Regulatorproteine. K-Ras2 und hSGK1 wurden als "early immediate" durch Aldosteron induzierte Regulatorproteine identifiziert [12, 73, 80, 96, 113]. Sie haben eine direkte positive Wirkung auf die Aktivität von ENaC und Na⁺-K⁺-ATPase. K-Ras2 und hSGK1 gelten als Träger der frühen Aldosteronwirkung, da ihr funktioneller Effekt eher eintritt als jener der Strukturelemente [32, 73, 80, 113, 115]. Die Regulatorproteine haben in vivo nur eine relativ kurze Halbwertszeit von ca. vier Stunden [72]. Aldosteron kontrolliert ein komplexes regulatorisches Netzwerk und entfaltet seine Wirkung über

verschiedene Mechanismen. In den früh induzierten Regulatorproteinen K-Ras2 und hSGK1 laufen verschiedene Inputs zusammen. Ihre Expressionslevel bewirken wahrscheinlich die Feinabstimmung und Integration der verschiedenen Regulationskaskaden in Bezug auf den Natriumtransport [73, 85, 112].

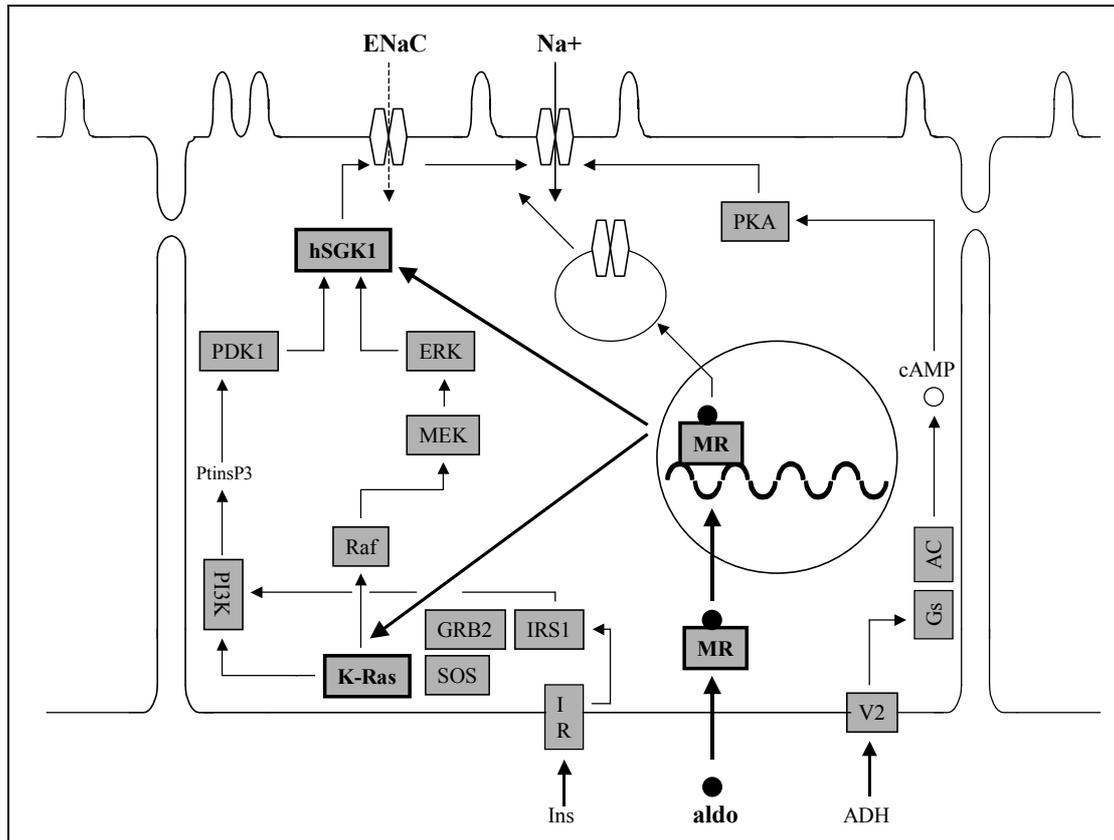


Abb. 7: Modell der Aldosteronwirkung: über Modulation der Expression von K-Ras und hSGK1 im Zielgewebe kontrolliert und integriert Aldosteron die verschiedenen Signalkaskaden zur Steuerung der ENaC-Funktion und Oberflächenexpression. Zusätzlich wird die Synthese neuer Transportproteine induziert.

Abkürzungen: AC: Adenylatzyklase; ADH: antidiuretisches Hormon; aldo: Aldosteron; Gs: trimeres G-Protein α -Untereinheit; Ins: Insulin; IR: Insulinrezeptor; PDK1: 3-Phosphoinositidabhängige Kinase 1; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; PKA: Proteinkinase A; PtInsP3: Phosphatidylinositol-3-Phosphat; MR: Mineralokortikoid-Rezeptor; V2: Vasopressin (ADH) –Rezeptor (modifiziert nach Verrey et al. 1999) [112].

1.8. Fragestellung der Arbeit

1. Der Mechanismus der bereits bekannten Stimulation des ENaC durch die hSGK1 sollte untersucht werden: dazu gehörten die pharmakokinetische und biophysikalische Charakterisierung unter hSGK1, sowie die Interaktion mit der Proteinkinase A.
2. Screening einer Stimulation durch die hSGK1 bei verschiedenen Kaliumkanälen.
3. Charakterisierung der Stimulation des Kv1.3 unter hSGK1: Untersuchung des zeitlichen Verlaufs, der Spannungsabhängigkeit, Pharmakokinetik, Interaktion mit Proteinkinase C, Inaktivierungskinetik und des Einflusses der N-terminalen Kv1.3-Region auf die Regulation durch die Kinase. Des weiteren sollte die Hemmung der zellulären Exozytoseprozesse Rückschlüsse auf hSGK1-Wirkung bei der Differenzierung zwischen einer Steigerung der Einzelkanalleitfähigkeit oder der Oberflächenexpression liefern.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Lösungen und Substanzen

ND 96-Lösung

ND 96 diene als Grundlösung für alle Versuche und für die Präparation der Oozyten. Sie wurde für bestimmte Versuche variiert.

Substanz	Konzentration
NaCl	96 mM
KCl	2 mM
CaCl ₂	1.8 mM
MgCl ₂	1 mM
Tris-HEPES	5 mM

Tab.1: Zusammensetzung der ND 96-Lösung mit einem pH-Wert von 7,4

Tris-HEPES ist Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan-N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonat (pKs 7.4) und diene als Puffer.

ND 96 – Oozytenaufbewahrungslösung

Substanz	Konzentration
NaCl	96 mM
KCl	2 mM
CaCl ₂	1.8 mM
MgCl ₂	1 mM
Tris-HEPES	5 mM
Natriumpyruvat	2.5 mM
Theophyllin	0.5 mM
Gentamycin	50 µg/l

Tab. 2: Zusammensetzung der ND 96-Aufbewahrungslösung (pH = 7,4)

Theophyllin sollte durch Verringerung von Proteinsynthese und Reduktion von Veränderungen der Zellmembran die weitere Reifung der Oozyten inhibieren [81], Gentamycin wurde als Antibiotikum zur Verhinderung von Infektionen eingesetzt.

Natriumfreie ND 96: NMDG (N-Methyl-D-Glucamin) – Lösung

Substanz	Konzentration
NMDG	100 mM
KCl	2 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1.8 mM
Tris-HEPES	5 mM

Tab. 3: Zusammensetzung der NMDG-Lösung (pH = 7,4)

ND 96 – variiertes Natrium

Für die Versuche zur Untersuchung der Natriumsensibilität des ENaC wurde die Natriumkonzentration von ND 96 variiert.

Lösung	Na ⁺ - Konzentration	NMDG – Konzentration
ND 96 1 mM	1 mM	99 mM
ND 96 3 mM	3 mM	97 mM
ND 96 10 mM	10 mM	90 mM
ND 96 30 mM	30 mM	70 mM
ND 96 70 mM	70 mM	30 mM
ND 96 100 mM	100 mM	0 mM
ND 96 130 mM	130 mM	0 mM
ND 96 150 mM	150 mM	0 mM

Tab. 4: Zusammensetzung von ND 96 mit variiertem Natrium. Alle weiteren Bestandteile der ND 96 wurden nicht verändert.

Tetraethylammoniumchlorid (TEA) – Lösung

Lösung	TEA – Konzentration	NMDG - Konzentration
TEA 0 mM	0 mM	100 mM
TEA 1 mM	1 mM	99 mM
TEA 3 mM	3 mM	97 mM
TEA 10 mM	10 mM	90 mM
TEA 30 mM	30 mM	70 mM
TEA 70 mM	70 mM	30 mM
TEA 100 mM	100 mM	0 mM

Tab. 5: Konzentrationsverhältnisse TEA-Lösung

Weitere eingesetzte Substanzen

Amilorid (N-Amidino-3,5-diamino-6-chloropyrazincarboxamid)

3-Aminobenzoessäure-ethylester-Methansulfonat

Brefeldin A (BFA)

Chelerythrin (1,2-Dimethoxy-12-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-c]-phenanthridinium)

Dimethylsulfoxid (DMSO)

EIPA (N-Ethyl-isopropyl-amilorid)

3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)

Margatoxin (MTX)

Pervanadat

Die Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (München), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen und waren von analytischem Reinheitsgrad. Die eingesetzten Substanzen wurden jeweils als Stammlösungen angesetzt und mit NaOH oder HCl zum verwendeten pH-Wert titriert. Die Osmolarität der Versuchslösungen betrug jeweils etwa 200 – 220 mosmol/l. Bei in DMSO angesetzten Substanzen lag die Endkonzentration des Lösungsmittels unter 0,1% und hatte daher keinen Einfluß auf das Verhalten der Oozyten. Leichte inhibitorische Effekte waren erst ab Konzentrationen von 0,3% festzustellen. Die Stammlösungen

wurden regelmäßig frisch angesetzt und bei den in Literatur oder vom Hersteller empfohlenen Temperaturen gelagert.

2.2. Oozytenpräparation

Die Oozyten wurden aus weiblichen *Xenopus laevis* (Südafrikanischer Krallenfrosch) isoliert. Zur Betäubung wurden die Frösche für ca. 20 Minuten in 0,1 %iger 3-Aminobenzoessäureethylesterlösung gebadet. Nach Hautdesinfektion mit Ethylalkohol wurden die Oozyten unter semisterilen Bedingungen in ihren bindegewebigen Ovarialsäcken durch eine ca. 1 cm lange Hautinzision entnommen. Anschließend wurde die Bauchdecke mit resorbierbarem Nahtmaterial wieder verschlossen.

Die entnommenen Ovarialsäcke wurden mehrfach mit ND 96 gespült, mechanisch mittels Pinzetten in kleinere Einheiten separiert und mit OR2-Lösung (Zusammensetzung wie ND96, jedoch Ca^{2+} -frei) gereinigt. Zur Entfernung der äußeren Bindegewebsschichten wurde Kollagenase eingesetzt: Kollagenase A (1-3 g/l, je nach Aktivität; Fa. Boehringer) wurde in OR2 gelöst und wirkte für 0,5 – 1 h auf die Oozyten ein. Eine Verdauung der Oozytenmembran war hierbei möglichst zu vermeiden. Daher fanden während des Vorgangs regelmäßige Kontrollen der Oozyten unter der Stereolupe statt. Nach Kollagenasebehandlung wurden die Oozyten, die aufgrund ihrer Färbung reif genug waren (Stadium V und VI nach Dumont [81]) und deren Membran intakt schien, selektiert. Diese Oozyten wurden bis zur cRNA-Injektion bei 12 bis 16 °C in ND 96-Aufbewahrungslösung inkubiert und in ständiger Bewegung gehalten, um Verklebungen oder Deformitäten zu verhindern. Unmittelbar vor der cRNA-Injektion erfolgte eine erneute Selektion nach den oben genannten Gesichtspunkten.

2.3. cRNA – Injektion

Die verwendete cRNA wurde von B. Noll, Physiologisches Institut Tübingen, synthetisiert. Die cDNA-Klone wurden freundlicher Weise von B. Rossier, Lausanne

(ENaC), S. Waldegger, Tübingen (hsgk1), J. Melzig, Tübingen (hsgk1^{K127R}-Mutante), Stephan Grissmer, Ulm (Kv1.3) und Gary Desir, Yale University (Kv1.3-Mutante) zur Verfügung gestellt.

Die cRNA-Injektion erfolgte mittels eines automatischen Nanoliterinjektors (Fa. WPI, Sarasota, USA). Zur Injektion wurden Borosilikatglaskapillaren (Fa. WPI, Sarasota, USA) mit einem Außendurchmesser von 1.2 mm als Injektionskanülen mit sehr langer Spitze in einem Mikroelektrodenpuller (DMZ Universal-Puller der Firma Zeitz, Augsburg) gezogen. Die so hergestellten Glaskapillaren wurden mit Paraffinöl aufgefüllt. Danach konnte die cRNA mit Hilfe des Mikroinjektors in die Kapillaren aufgezogen werden. Unter einer Stereolupe wurde pro Oozyte 50 nl cRNA injiziert.

Bei den Messungen zu Kv1.3 wurde eine zweizeitige Injektion vorgenommen, da die injizierte kv1.3-cRNA-Menge pro Zelle sehr gering war (entsprach 0.125 ng). Durch Pipettierungenauigkeiten bei der Herstellung des Injektionsgemisches aus Kinase- und Kaliumkanal-cRNA sowie geringfügigen Schwankungen bei der Nanoliterinjektion hatten die cRNA-Mengen pro Zelle zu stark differiert und hätten bei gleichzeitiger Injektion das Ergebnis verfälscht.

Daher wurde zuerst die Injektion der entsprechenden Kinasen, hsgk1^{K127N} oder hsgk1^{S422D}, in einer Konzentration von jeweils 300 ng / μ l (25 nl entspricht 7,5 ng / Oozyte) vorgenommen. Den Kontrollzellen wurde DEPC-behandeltes und anschließend autoklaviertes Wasser injiziert, um die injektionsbedingte Zellalteration auszugleichen. Anschließend wurden die Zellen 24 Stunden in ND 96 inkubiert, um ihnen Zeit zu geben, sich von der ersten Injektion zu erholen. Am darauffolgenden Tag wurde allen Oozyten 25 nl derselben kv1.3-cRNA-Lösung (Konzentration 5 ng/ μ l) injiziert.

Die Injektionsschritte sowie die cRNA-Handhabung waren semisteril durchzuführen, um eine Kontamination mit RNAsen zu verhindern.

2.4. Zwei-Elektroden-voltage-clamp

Der über die Oozytenmembran gemessene transmembranäre Strom setzt sich zusammen aus dem Membranpotential (d.h. der Ladungsakkumulation auf einer

Membranseite bei gleichzeitiger Ladungsverminderung auf der Gegenseite) und der Bewegung von geladenen Teilchen durch Ionenkanäle. Bei der voltage-clamp-Messung wird das Membranpotential auf einen konstanten Wert geklemmt, sodaß der gemessene Strom allein durch den Ionenfluß zustande kommt [1].

Für die Zwei-Elektroden-voltage-clamp-Technik werden zwei intrazelluläre Mikroelektroden benötigt. Mit der ersten Mikroelektrode V wird das Membranpotential gemessen, zu einem Rückkopplungsamplifier geleitet, dort verstärkt und mit dem konstant zu haltenden und vorgegebenen Sollwert verglichen. Wenn das gemessene Membranpotential von der zu haltenden Spannung abweicht, wird via negativem Feedback vom clamping-Amplifier Strom über die zweite Mikroelektrode I an die Zelle appliziert bis die Spannungsdifferenz wieder auf Null reduziert wurde. So wird das Membranpotential auf einem konstanten Wert gehalten. Der durch die Mikroelektrode I fließende Strom entspricht dem Stromfluß über die Zellmembran ebenso wie durch den Widerstand R. Er kann durch den Spannungsabfall über R mit Hilfe eines geeigneten Verstärkers bestimmt werden [1].

Die zwei geerdeten Referenzelektroden aus 3 % Agar waren mit 3 M KCl gefüllt und mit dem Bad verbunden. Die zwei Glasmikroelektroden (Borosilikatglaskapillaren, Außendurchmesser 1.5 mm; Typ GC150TF-15, Clark Elektromedical Instruments, Pangbourne, GB) waren ebenfalls mit 3 M KCl gefüllt und über einen chloridierten Silberdraht mit dem Verstärker verbunden. Die verwendeten Mikroelektroden hatten einen Gesamtwiderstand zwischen 0.3 und 1.0 Megaohm. Der Verstärker (GeneClamp Amplifier) stammte von der Firma Axon Instruments (Foster City, USA). Die Meßanordnung war durch einen Faradayschen Käfig gegen äußere Störungen teilweise abgeschirmt. Alle Daten wurden mit 10 Hz gefiltert und mit einer Samplingrate von 100 Datenpunkten pro Minute über ein MacLab-Interface auf einem Macintosh-Computer aufgezeichnet.

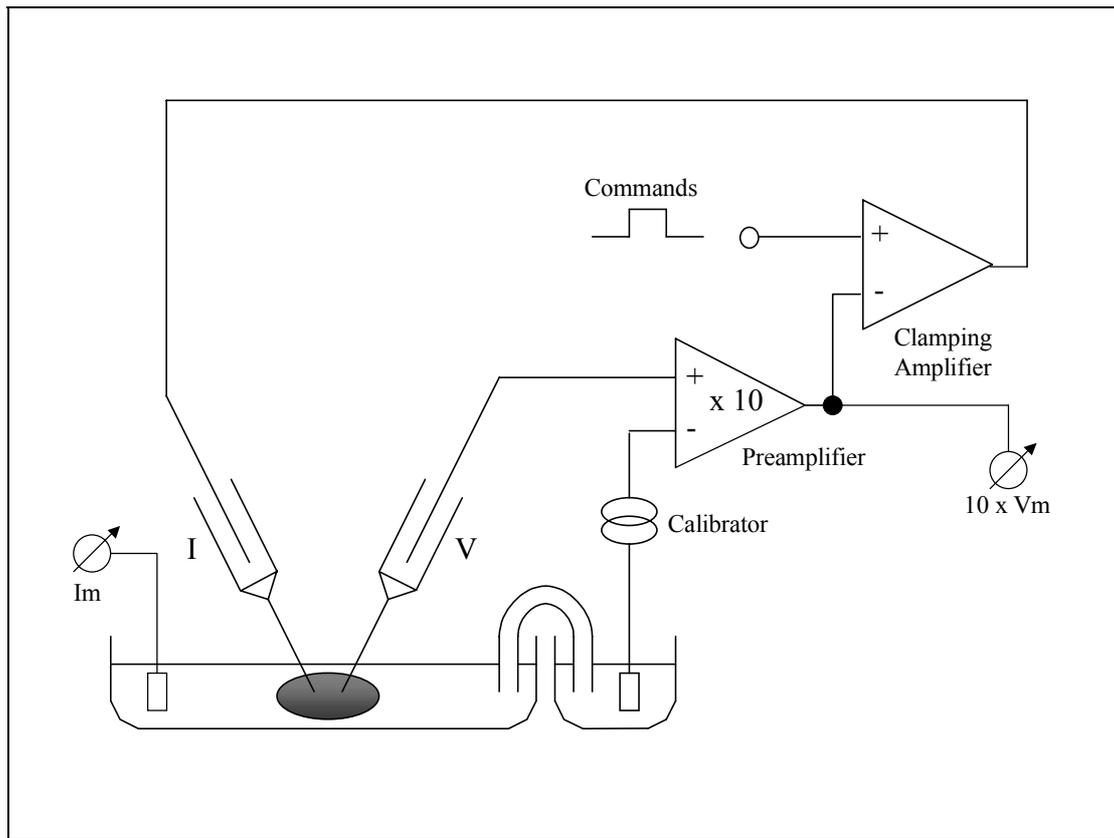


Abb. 8: Voltage-clamp-Meßanordnung. Die Mikroelektrode V mißt das Potential; über die Mikroelektrode I wird Strom appliziert. Die Outputs sind das Membranpotential der Zelle V_m und der über die Membran fließende Strom I_m (modifiziert nach Aidley und Stanfield 1996) [1].

2.5. Ausführung der Experimente

Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Oozyten wurden in ND96 mit einer Flußgeschwindigkeit von 20 ml/min gemessen, wodurch ein vollständiger Austausch der Badlösung innerhalb 10 Sekunden gewährleistet war.

Die Messungen des ENaC erfolgten, sofern nicht anders angegeben, am dritten Expressionstag bei einer Klemmspannung von -80 mV. Der ENaC-spezifische Strom wurde indirekt durch Blockade des Kanals mit $30 \mu\text{M}$ Amilorid bestimmt. Zu Beginn des Voltage-clamps war häufig eine Veränderung des Haltestroms (run-down), beruhend auf einer Autoinaktivierung von ENaC-Kanälen, zu beobachten. Für die Messungen wurde stets ein konstanter Haltestrom abgewartet.

Die Experimente zu den spannungsabhängigen Kaliumkanälen Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4 und Kv1.5 wurden in der Regel zwei Tage nach cRNA-Injektion durchgeführt. Die Kaliumkanäle wurden, sofern nicht anders angegeben, auf -80 mV geklemmt. Ausgehend von diesem Membranpotential fanden alle 30 Sekunden Spannungssprünge auf -10 mV zur Kanalaktivierung statt. Nach einer Depolarisationsdauer von 15 Sekunden wurde wieder die Ausgangsspannung von -80 mV angelegt. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt. Da teilweise eine Verringerung der Stromamplitude (run-down) bei mehrfacher Stimulation zu beobachten war, wurde solange stimuliert, bis sich konstante Verhältnisse eingestellt hatten.

Die Experimente wurden jeweils an verschiedenen Oozytenpräparationen und unterschiedlichen Tagen wiederholt. Unterschiede in den Maximalströmen in Abhängigkeit zum Meßzeitpunkt nach cRNA-Injektion und der jeweiligen Oozytenpräparation waren festzustellen. Systematische Fehler aufgrund unterschiedlich langer Expressionszeiten wurden durch alternierende Messung von Versuchs- und Kontrollzellen ausgeschlossen.

2.6. Oozytenfärbungen

Technik der Immunofluoreszenzfärbungen: nach Überprüfung der Kaliumkanalaktivität wurde die Vitellinmembran der Oozyten entfernt und die Versuchszellen in Dentscher Lösung (20% DMSO, 80% Methanol, -20 °C) über Nacht bei 20°C fixiert. Nach mehrmaligem Auswaschen des Fixationsmittels mit PBS-Puffer wurden die Oozyten mit einem Kaninchen-Anti-Kv1.3-Antikörper (zur Verfügung gestellt von O. Pongs, Hamburg) in der Verdünnung 1 : 100 zusammen mit Ziegen Serum (5% PBS) bei 4 °C für zwölf Stunden inkubiert. Es folgte wiederholtes Waschen mit PBS und eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit Alexa-488-Ziegenantikörper (gegen Kaninchen gerichtet; Molecular Probes, Niederlande, Verdünnung 1:200 in PBS). Die angefärbten Oozyten wurden dann 30 Minuten lang in 3,7 %igem Paraformaldehyd nachfixiert. Die Einbettung in Acrylamid fand nach den Angaben des Herstellers (Heraeus Kulzer, Technovit 7100) statt. Von den eingebetteten Oozyten

wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt und diese unter einem Epifluoreszenzmikroskop (Optiphot, Nikon) analysiert.

2.7. Auswertung und Statistik

Bei der Auswertung wurde auf eine Differenzierung zwischen Einwärts- bzw. Auswärtsstrom verzichtet, sondern lediglich der Betrag des gemessenen Stroms angegeben.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden auf Basis einer einfachen Michaelis-Menten- oder der Hill-Gleichung errechnet.

(1) Michaelis-Menten-Gleichung:
$$I = I_{\max} * C / (C + K_m)$$

I ist die gemessene Hemmung, I_{\max} die maximale Hemmung, C die gegebene Substratkonzentration und K_m die Substratkonzentration bei halbmaximaler Hemmung.

(2) Hill-Gleichung:
$$I = I_{\max} * C^{n_H} / (C^{n_H} + K_m^{n_H})$$

Der Hill-Koeffizient n_H gibt Hinweise auf die Zahl von Substratbindungsstellen am Molekül, bzw. am Ionenkanal. Dies gilt jedoch nur für den Fall einer starken kooperativen Bindung des Substrates. Für die Bindungskinetiken muß deshalb angenommen werden, daß die nächst höhere natürliche Zahl zu n_H lediglich die minimale Zahl an möglichen Bindungsstellen angibt. Im Normalfall betrug $n_H = 1$ und es konnte daher die Michaelis-Menten-Gleichung angewandt werden.

Zur Berechnung der Inaktivierung des Kv1.3 wurde eine exponentielle Abnahme erster Ordnung des Kaliumstroms angenommen. Die Meßpunkte wurden mit der Exponentialfunktion gefittet und hieraus die Inaktivierungskonstanten bestimmt.

(3) Exponentielle Abnahme erster Ordnung:
$$f(t) = a * e^{-t/\tau} + y_0$$

Alle Werte sind als arithmetisches Mittel (mean) +/- dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM: standard error of the mean) angegeben. "n" gibt die Zahl voneinander unabhängiger Messungen an. Die Werte wurden mit dem gepaarten Student-t-Test auf Signifikanz geprüft, und es wurden nur Werte mit $p < 0.05$ als signifikant angesehen.

3. Versuche und Ergebnisse

3.1. ENaC und hSGK1

3.1.1. Stimulation des ENaC durch die hSGK1

Bei den Experimenten zum ENaC wurden drei unterschiedliche Oozytengruppen eingesetzt: die Koexpression von $\alpha\beta\gamma$ -ENaC und hSGK1 wurde mit Kontrollzellen ($\alpha\beta\gamma$ -ENaC) sowie $\alpha\beta\gamma$ -ENaC und hSGK1^{K127R} exprimierenden Oozyten als Negativkontrolle verglichen. Die dominant negative Kinase hSGK1^{K127R} ist eine Mutante der hSGK1, bei der die Aminosäure Lysin (K) an Position 127 durch Arginin (R) ersetzt wurde. Die Mutation liegt in der ATP-bindenden Region der katalytischen Domäne und führt zum Aktivitätsverlust der Kinase [62, 117].

Die cRNA der drei ENaC-Untereinheiten α , β und γ hatte eine Konzentration von jeweils 100 ng/ μ l (2,5 ng pro Untereinheit/Oozyte), die Konzentration der Kinasen hsgk1 und hsgk1^{K127R} betrug je 100 ng/ μ l. Entsprechend den Versuchsgruppen wurde $\alpha\beta\gamma$ -enac mit der cRNA der Kinasen oder DEPC-behandeltem Wasser (Kontrollzellen) im Verhältnis 1:1 koinjiziert.

Nach einer Expressionszeit von drei Tagen wurden die Amilorid-sensitiven Ströme bestimmt: die Oozyten waren in ND96 per Voltage-clamp auf ein Haltepotential von -80 mV geklemmt. Die Zugabe von 30μ M Amilorid zur Badlösung über 30 Sekunden führte zu einer vollständigen Inhibition des $\alpha\beta\gamma$ -ENaC-spezifischen Natriumstroms. Der Amilorid-sensitive Strom I wurde definiert als Differenz der Stromflüsse bei -80 mV ohne und mit Amiloridblockade. Trotz maximaler Amiloridhemmung persistierte ein Reststrom, zurückzuführen auf andere endogene Oozytenkanäle. Die Inhibition durch Amilorid zeigte sich durch Auswaschung mit ND96 vollständig reversibel, sodaß nach 15 bis 30 Minuten der ursprüngliche Natriumstrom wieder erreicht war.

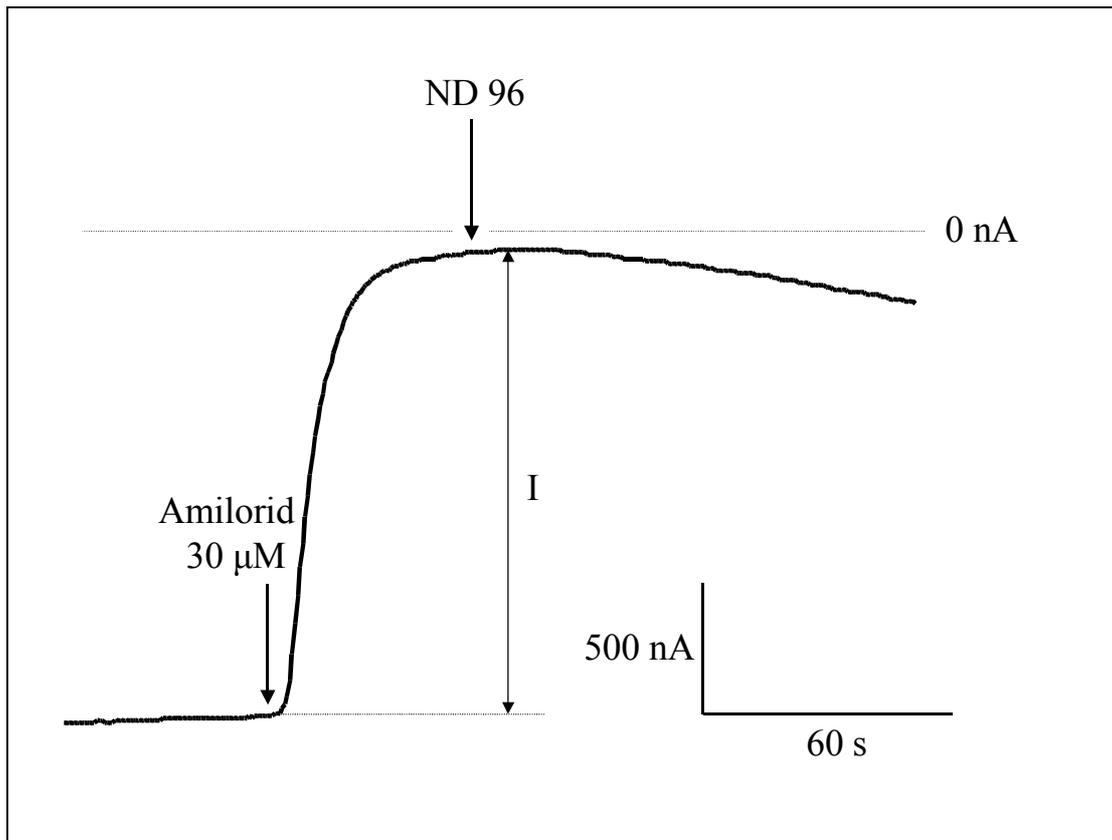


Abb. 9: Originalaufzeichnung: einwärts gerichteter Strom durch den $\alpha\beta\gamma$ -ENaC und dessen Hemmung durch Amilorid ($30\mu\text{M}$); I: Amilorid-sensitiver Strom

Unter hSGK1 war eine deutliche Zunahme des Amilorid-sensitiven Stromes zu beobachten. Im Vergleich zu den Kontrollzellen führte die aktive Kinase zu einer ca. fünffachen Steigerung der Natriumströme. Die Negativkontrolle mit der inaktiven Kinase hSGK1^{K127R} bewirkte hingegen eine Reduktion um den Faktor 2,5.

	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1 ^{K127R}	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1
I (nA)	$314,3 \pm 24,0$	$130,0 \pm 17,6$	$1534,5 \pm 194,2$
Zellzahlen (n)	7	14	17

Tab. 6: Vergleich der Amilorid-sensitiven Ströme

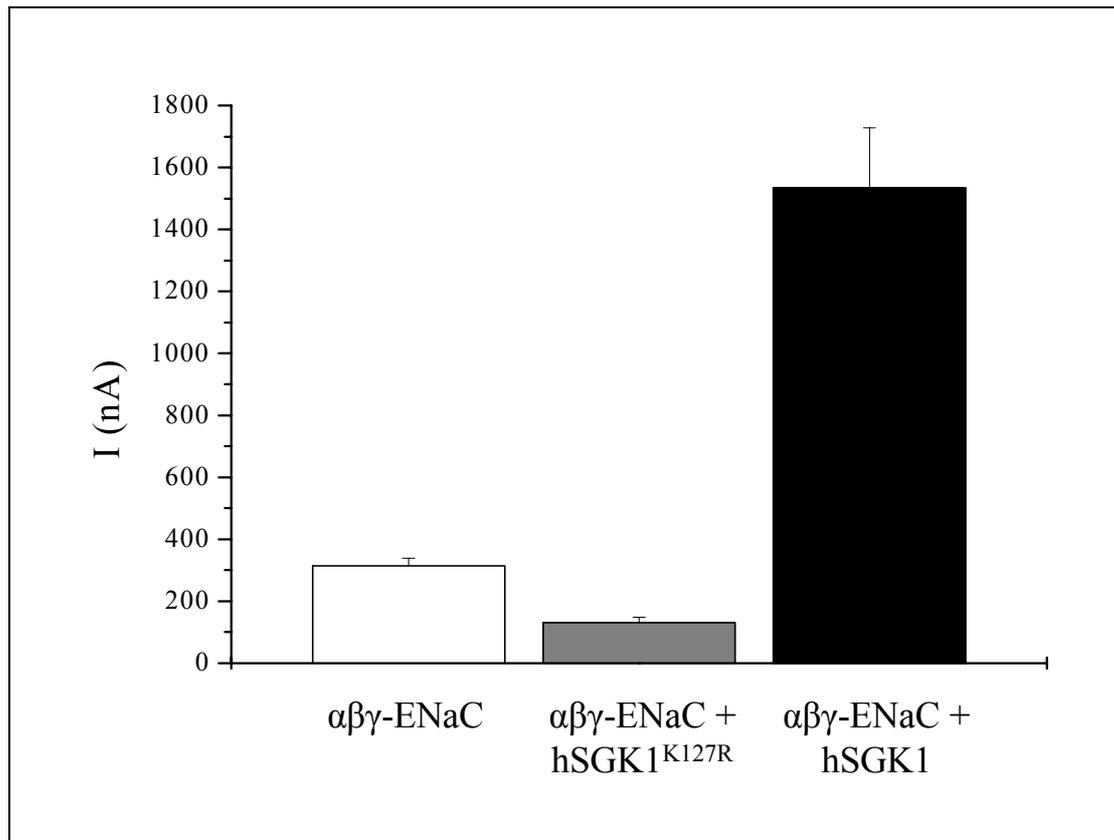


Abb. 10: Einfluß der hSGK1 und der inaktiven, transdominant negativ wirkenden hSGK1^{K127R}-Mutante auf den Amilorid-sensitiven Natriumstrom des $\alpha\beta\gamma$ -ENaC

3.1.2. Zeitlicher Verlauf der ENaC-Stimulation durch die hSGK1

Die Amilorid-sensitiven Ströme der drei Versuchsgruppen ($\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1, Kontrolle: $\alpha\beta\gamma$ -ENaC und Negativkontrolle: $\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1^{K127R}) wurden im zeitlichen Verlauf ein bis fünf Tage nach cRNA-Injektion bestimmt.

Die Negativkontrollzellen lieferten die geringsten Ströme. Nach $32,5 \pm 4,8$ nA am ersten Expressionstag bewegten sich die Amilorid-sensitiven Ströme ab dem zweiten Tag nach cRNA-Injektion auf einem relativ konstanten Niveau mit Werten um $172,2 \pm 26,9$ nA.

Die Koexpression von $\alpha\beta\gamma$ -ENaC mit hSGK1 wies über den gesamten Verlauf die höchsten Ströme auf mit einem signifikanten Unterschied zu Kontrolle und Negativkontrolle. Bereits am ersten Expressionstag stimulierte die aktive Kinase den $\alpha\beta\gamma$ -ENaC zu doppelt so hohen Werten. Der größte Unterschied mit fünffach höheren

Natriumströmen im Vergleich zu den Kontrollzellen war am dritten Tag nach cRNA-Injektion zu beobachten ($1534,5 \pm 194,2$ nA zu $308,8 \pm 8,9$ nA).

Ab dem dritten Expressionstag war auch bei den Kontrollzellen eine starke Zunahme der Amilorid-sensitiven Ströme zu verzeichnen, wodurch sich das Verhältnis zur Koexpression von $\alpha\beta\gamma$ -ENaC und hSGK1 von 1:5 am dritten auf 1:2 am fünften Tag minimierte.

Der Unterschied zwischen Kontrolle und Negativkontrolle war ab dem dritten Tag nach cRNA-Injektion signifikant.

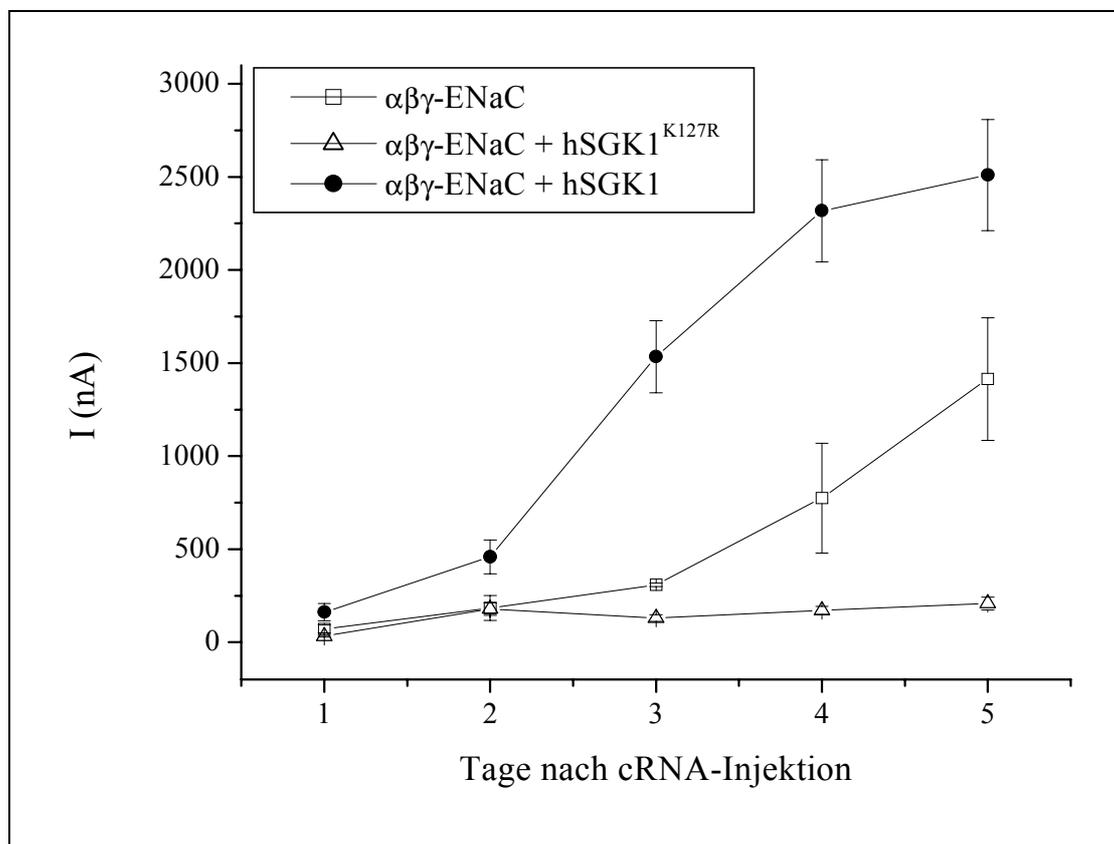


Abb. 11: Zeitlicher Verlauf der Stimulation des $\alpha\beta\gamma$ -ENaC durch die hSGK1 im Vergleich zu Kontrollgruppe ($\alpha\beta\gamma$ -ENaC) und Negativkontrolle (Koexpression $\alpha\beta\gamma$ -ENaC mit hSGK1^{K127R}).

Tage nach cRNA-Injektion	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1 ^{K127R}	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1
1	71,7 ± 22,1 nA n = 6	32,5 ± 4,8 nA n = 10	161,7 ± 46,5 nA n = 12
2	184,2 ± 67,6 nA n = 6	178,8 ± 33,1 nA n = 12	459,0 ± 91,3 nA n = 13
3	308,8 ± 8,9 nA n = 4	130,0 ± 17,6 nA n = 14	1534,5 ± 194,2 nA n = 17
4	775,0 ± 295,1 nA n = 5	171,6 ± 21,9 nA n = 14	2317,5 ± 274,6 nA n = 10
5	1414,2 ± 329,0 nA n = 13	208,4 ± 34,9 nA n = 24	2510,0 ± 298,9 nA n = 13

Tab. 7: Zeitlicher Verlauf der Amilorid-sensitiven Ströme in den drei Versuchsgruppen; n = Zellzahl

3.1.3. Koexpression der ENaC-Untereinheiten α -, $\alpha\beta$ - und $\alpha\gamma$ -ENaC mit hSGK1 und hSGK1^{K127R}

Der Mechanismus zur Stimulation des ENaC durch die hSGK1 ist bislang nicht vollständig geklärt [4, 18]. Zur Prüfung welche ENaC-Untereinheiten an der Regulation durch die Kinase beteiligt sind, wurde α -, $\alpha\beta$ - und $\alpha\gamma$ -ENaC jeweils mit hSGK1 und hSGK1^{K127R} als Negativkontrolle koexprimiert. Die Expression von β - oder γ -ENaC allein weist keine meßbaren Ströme auf [16, 81].

Die cRNA-Konzentrationen der ENaC-Untereinheiten betragen je 100 ng/ μ l (2,5 ng/Oozyte), die der Kinasen 300 ng/ μ l (7,5 ng/Oozyte).

Die α -ENaC oder $\alpha\beta$ -ENaC exprimierenden Oozyten lieferten nur minimale Amilorid-sensitive Ströme bis 11,25 nA. Allein bei der Komposition aus α - und γ -ENaC waren ab dem zweiten Expressionstag meßbare Ströme zu beobachten, die auch eine deutliche Stimulation auf hSGK1 zeigten mit Werten bis 210 ± 76,5 nA. Die hSGK1 bewirkte bei $\alpha\gamma$ -ENaC am zweiten Tag im Vergleich zur Negativkontrolle eine vierfache, am dritten Tag sogar eine sechsfache Steigerung des Natriumstroms.

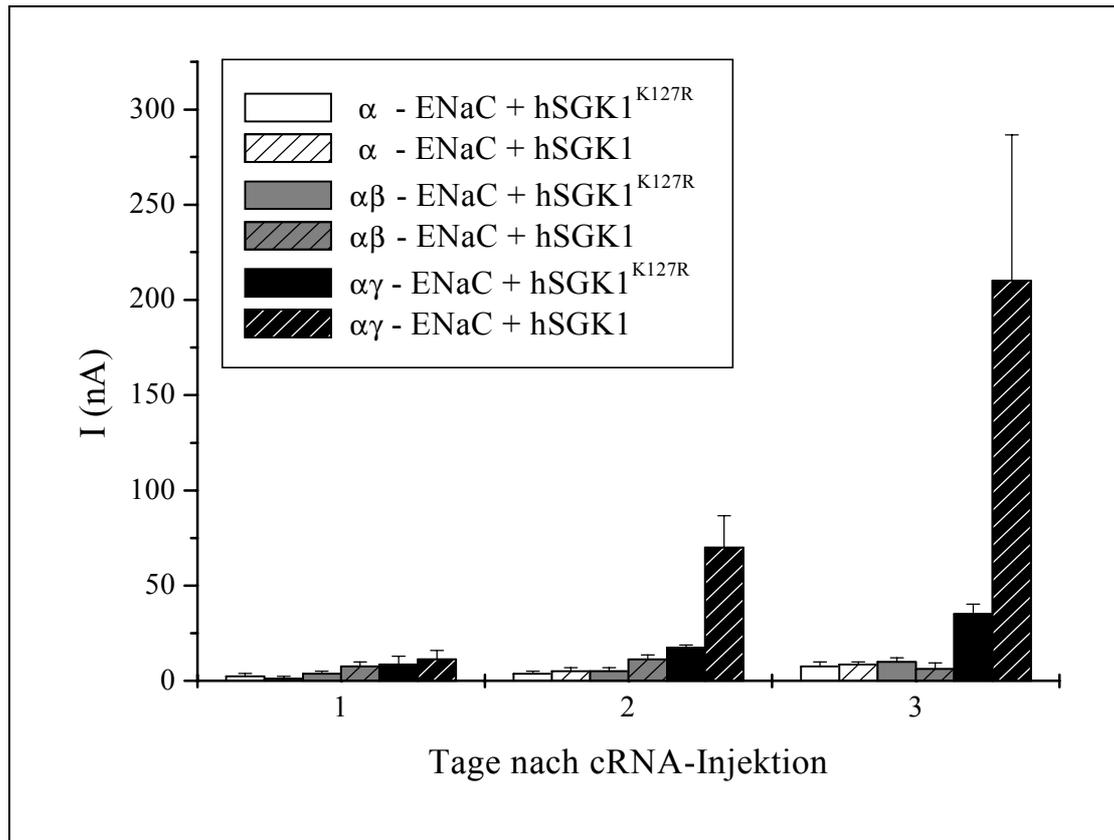


Abb. 12: Koexpression der ENaC-Untereinheiten (α -, $\alpha\beta$ -, $\alpha\gamma$ -ENaC) mit hSGK1 und der dominant negativen Kinase hSGK1^{K127R}

Tage nach cRNA-Injektion	α -ENaC + hSGK1 ^{K127R}	α -ENaC + hSGK1	$\alpha\beta$ -ENaC + hSGK1 ^{K127R}	$\alpha\beta$ -ENaC + hSGK1	$\alpha\gamma$ -ENaC + hSGK1 ^{K127R}	$\alpha\gamma$ -ENaC + hSGK1
1	2,5 ± 1,4	1,3 ± 1,3	3,8 ± 1,3	7,5 ± 2,5	8,8 ± 4,3	11,3 ± 4,7
2	3,8 ± 1,3	5,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	11,3 ± 2,4	17,5 ± 1,4	70,0 ± 16,7
3	7,5 ± 2,5	8,8 ± 1,3	10,0 ± 2,0	6,3 ± 3,1	35,0 ± 5,4	210 ± 76,5

Tab. 8: Vergleich der ENaC-Untereinheiten; Amilorid-sensitive Stromstärken angegeben in nA; pro Versuchsgruppe wurden sechs Oozyten gemessen (n=6)

3.1.4. Hemmung durch Amilorid

Amilorid ist ein klinisch eingesetztes Diuretikum, welches den Epithelialen Natriumkanal hemmt [6]. Der IC₅₀-Wert für Amilorid, d.h. die Konzentration bei der 50 % des

transepithelialen Transports blockiert sind, liegt typischerweise unter 1 μM [40, 99]. Aufgrund der engen räumlichen Beziehung zwischen Amiloridbindungsstelle und Kanalpore [59, 91] konnte eine Änderung der Amiloridbindung durch die hSGK1 auf eine Modulation im Porenbereich und Veränderung der Leitfähigkeit des ENaC durch die Kinase hinweisen.

3.1.4.1. $\alpha\beta\gamma$ -ENaC

$\alpha\beta\gamma$ -ENaC und $\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1 exprimierende Zellen wurden mit ansteigenden Amiloridkonzentrationen inhibiert. Ausgehend von ND96 wurde die Lösung der Meßkammer durch immer höher konzentrierte Amiloridlösungen, beginnend mit 0,001 μM , ersetzt. Als Maximalkonzentration wurde 30 μM Amilorid gewählt, da höhere Konzentrationen zu keiner weiteren Hemmung führten.

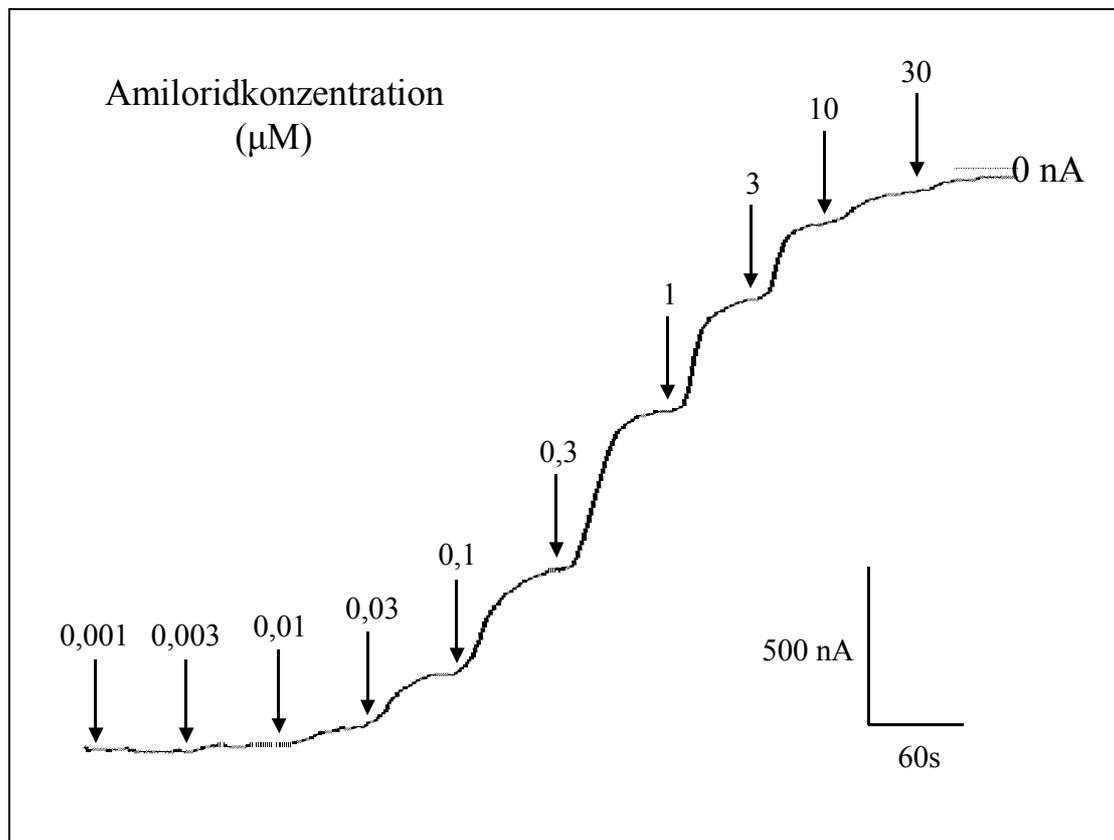


Abb. 13: Originaltracing $\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1: Hemmung durch Amilorid

3. Versuche und Ergebnisse

Zur Auswertung wurde bei 30 μM Amilorid eine vollständige Inhibition angenommen, zu der die Hemmung durch weniger konzentriertes Amilorid in Relation gesetzt wurde. Es stellte sich heraus, daß die zur halbmaximalen Hemmung (IC_{50} -Wert) benötigte Amiloridkonzentration bei der Koexpression $\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1 doppelt so hoch lag wie jene für $\alpha\beta\gamma$ -ENaC allein. Um eine gleichwertige Hemmung zu erzielen, waren folglich bei der Koexpression deutlich höhere Amiloridkonzentrationen nötig.

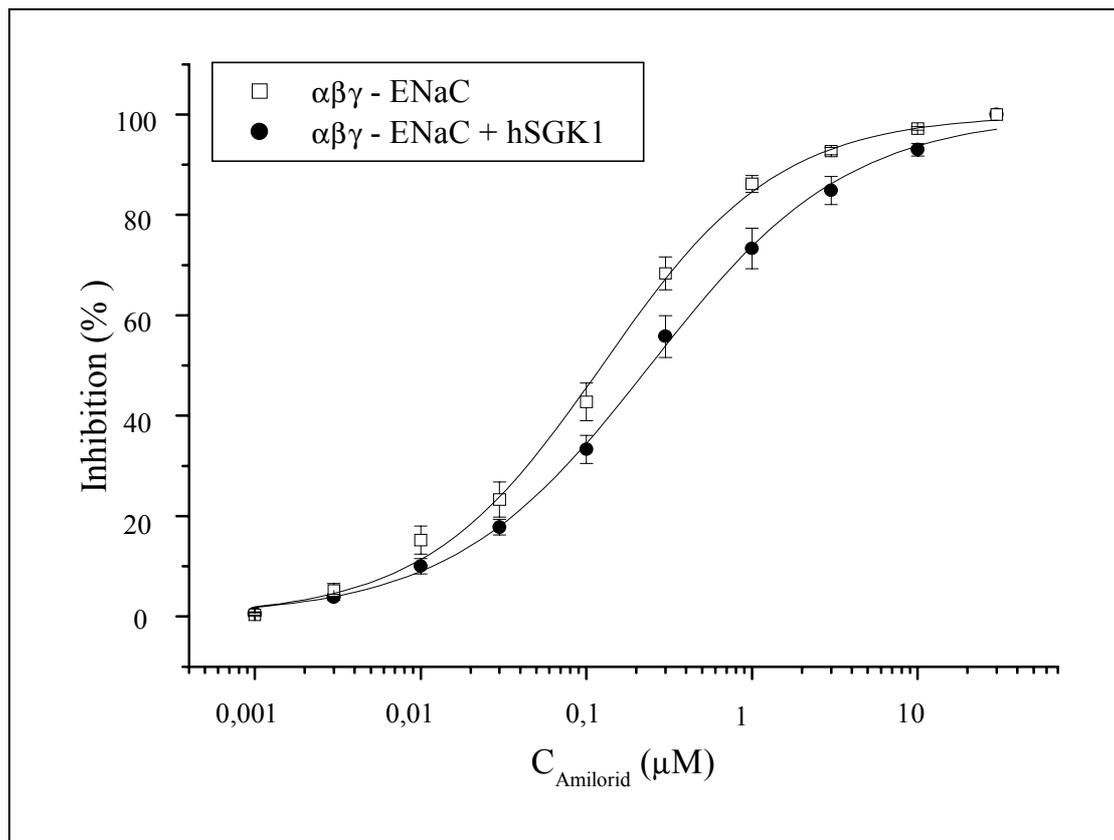


Abb. 14: Änderung der Amiloridinhibition des $\alpha\beta\gamma$ -ENaC durch hSGK1

	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1
$\text{IC}_{50} (\mu\text{M})$	$0,124 \pm 0,006$	$0,242 \pm 0,012$
n_H	$0,82 \pm 0,03$	$0,73 \pm 0,02$
100%-Ströme (nA)	$359,0 \pm 50,7$	$1730,8 \pm 115,1$
Zellzahl (n)	6	5

Tab. 9: Hemmung von $\alpha\beta\gamma$ -ENaC und $\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1 durch Amilorid

3.1.4.2. $\alpha\gamma$ -ENaC

Es sollte untersucht werden, ob die bei $\alpha\beta\gamma$ -ENaC beobachtete Änderung der Amiloridkinetik durch die hSGK1 auch nach Auslassen verschiedener Untereinheiten erhalten bleibt. So wurde dieselbe Komposition der Untereinheiten, wie in 3.1.3. beschrieben, gewählt. Die Expressionen von α - und $\alpha\beta$ -ENaC lieferten jedoch so geringe Ströme, daß eine sinnvolle Aussage über eine eventuelle Stimulation nicht möglich war. Bei $\alpha\gamma$ -ENaC war unter hSGK1 eine Verdoppelung des IC_{50} -Wertes zu beobachten. Im Vergleich zu $\alpha\gamma$ -ENaC und hSGK1^{K127R} exprimierenden Oozyten waren deutlich höhere Amiloridkonzentrationen zur äquivalenten Inhibition nötig. Insgesamt lagen die IC_{50} -Werte für $\alpha\gamma$ -ENaC leicht über jenen für $\alpha\beta\gamma$ -ENaC.

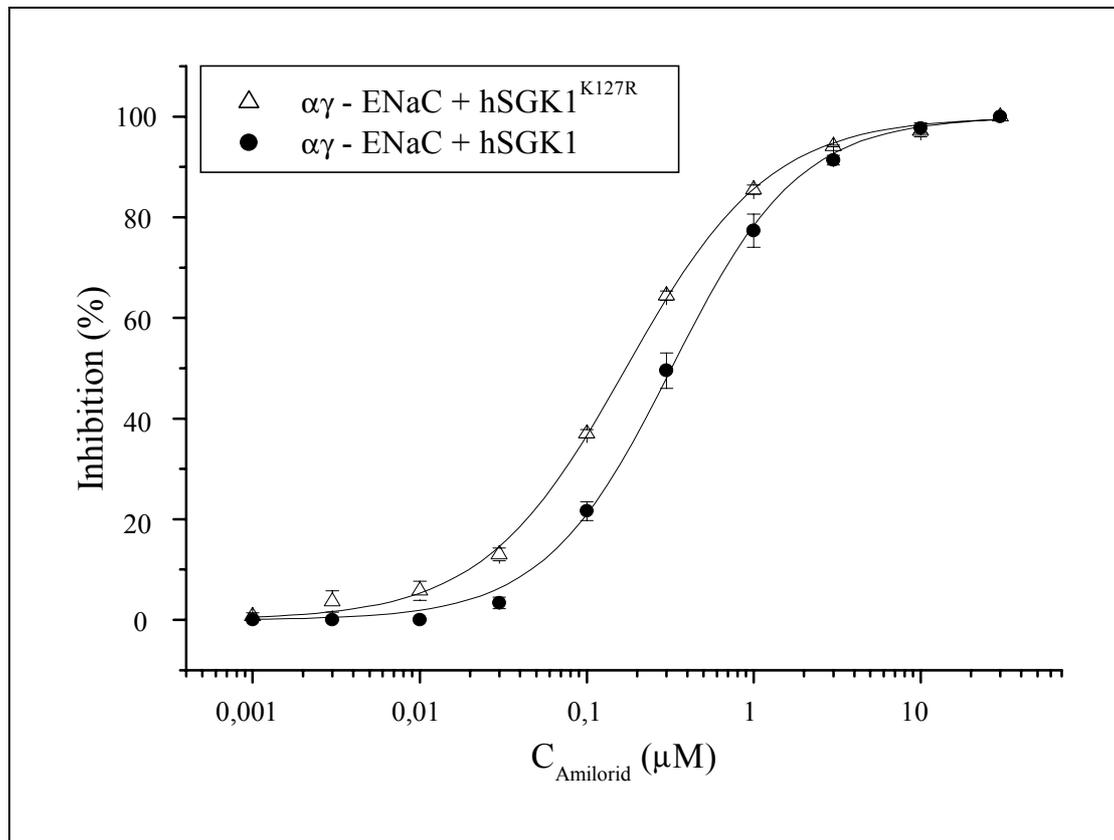


Abb. 15: Änderung der Amiloridhemmung von $\alpha\gamma$ -ENaC durch hSGK1

	$\alpha\gamma$ -ENaC + hSGK1 ^{K127R}	$\alpha\gamma$ -ENaC + hSGK1
IC ₅₀ (μM)	0,171 ± 0,007	0,321 ± 0,010
n _H	1,14 ± 0,04	1,01 ± 0,03
100%-Ströme (nA)	34,0 ± 4,3	186,0 ± 63,9
Zellzahl (n)	4	4

Tab. 10: Amiloridhemmung von $\alpha\gamma$ -ENaC

3.1.5. Hemmung durch N-Ethyl-Isopropyl-Amilorid (EIPA)

N-Ethyl-Isopropyl-Amilorid ist ein Analogon des Amilorid, welches eine geringere Affinität zum Epithelialen Natriumkanal aufweist [9].

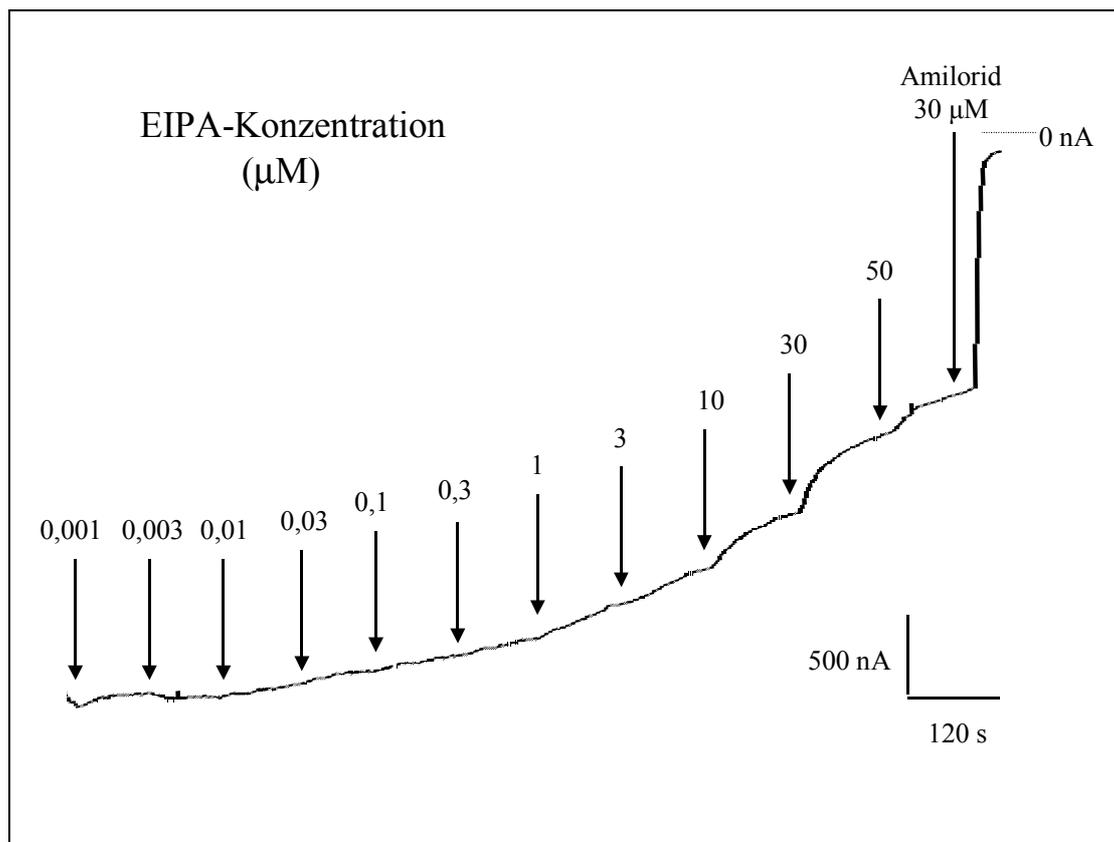


Abb. 16: Originalaufzeichnung $\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1: zunehmende Hemmung des Natriumstroms mit steigender EIPA-Konzentration, Maximalinhibition durch 30 μM Amilorid

Der $\alpha\beta\gamma$ -ENaC wurde mit steigenden EIPA-Konzentrationen bis 50 μM inhibiert. Beginnend mit 0,001 μM wurde die jeweilige EIPA-Konzentration nach einer Applikationszeit von 100 Sekunden durch die nächst höhere ersetzt. Da jedoch selbst unter 50 μM EIPA keine vollständige Inhibition des Natriumstromes zu erreichen war, wurde zur maximalen Hemmung am Ende jeder Messung 30 μM Amilorid zugesetzt. Zur Auswertung wurde bei 30 μM Amilorid eine maximale Hemmung angenommen. Die Inhibition durch EIPA wurde dazu in Relation gesetzt.

Der IC_{50} -Wert von Amilorid lag für $\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1 bei $48,1 \pm 4,9 \mu\text{M}$ und betrug somit nur ein Fünftel des Wertes für $\alpha\beta\gamma$ -ENaC ($249,4 \pm 48,6 \mu\text{M}$). Es waren folglich bei $\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1 deutlich geringere EIPA-Konzentrationen zur Inhibition nötig. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß aufgrund einer inkompletten Hemmung durch EIPA die erhaltenen IC_{50} -Werte nur eine Schätzung darstellen können.

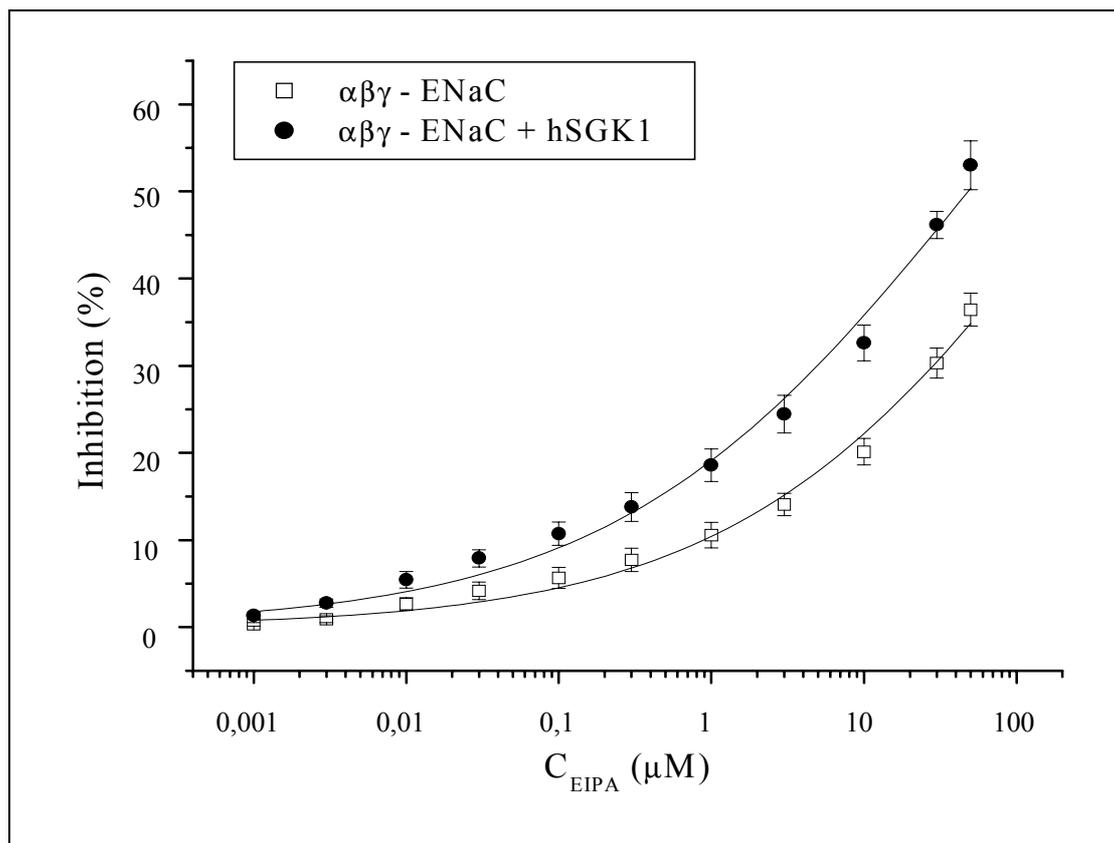


Abb. 17: Inhibition des ENaC durch N-Ethyl-Isopropyl-Amilorid (EIPA)

	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1
IC ₅₀ (μ M)	249,4 \pm 48,6	48,1 \pm 4,9
n _H	0,39 \pm 0,02	0,37 \pm 0,02
100%-Ströme (nA)	526,1 \pm 54,4	1863,6 \pm 252,3
Zellzahl (n)	9	7

Tab. 11: EIPA-Hemmung von $\alpha\beta\gamma$ -ENaC

3.1.6. Sensitivität gegenüber Natrium

Die Änderung der Sensitivität gegenüber Amilorid ließ einen Einfluß der hSGK1 auf die biophysikalischen Eigenschaften des ENaC vermuten. Daher wurde als weiterer Parameter die Natriumsensitivität untersucht.

Die Versuchsgruppen wurden ansteigenden extrazellulären Natriumkonzentrationen ausgesetzt. Als natriumfreie Ausgangslösung diente NMDG. Dann wurde, beginnend mit 1 mM, die extrazelluläre Na⁺-Konzentration bis auf 130 mM gesteigert.

Die Gesamtosmolarität und die Konzentration der anderen Ionen in der Lösung wurden jeweils konstant gehalten. Vor Übergang auf die nächst höhere Na⁺-Konzentration wurde stets ein konstantes Niveau des gemessenen Natriumstroms abgewartet.

Bei geringen Natriumkonzentrationen unter 10 mM war ein (positiver) Auswärtsstrom zu beobachten, ab 10 mM zeigten die Messungen einen (negativen) Natriumeinwärtsstrom. Zur Auswertung wurde der Maximalstrom definiert als Summe der Beträge aus Auswärtsstrom bei 0 mM und Einwärtsstrom bei 130 mM extrazellulärer Natriumkonzentration. Die Natriumströme der jeweiligen Konzentration wurden zum Maximalstrom in Relation gesetzt.

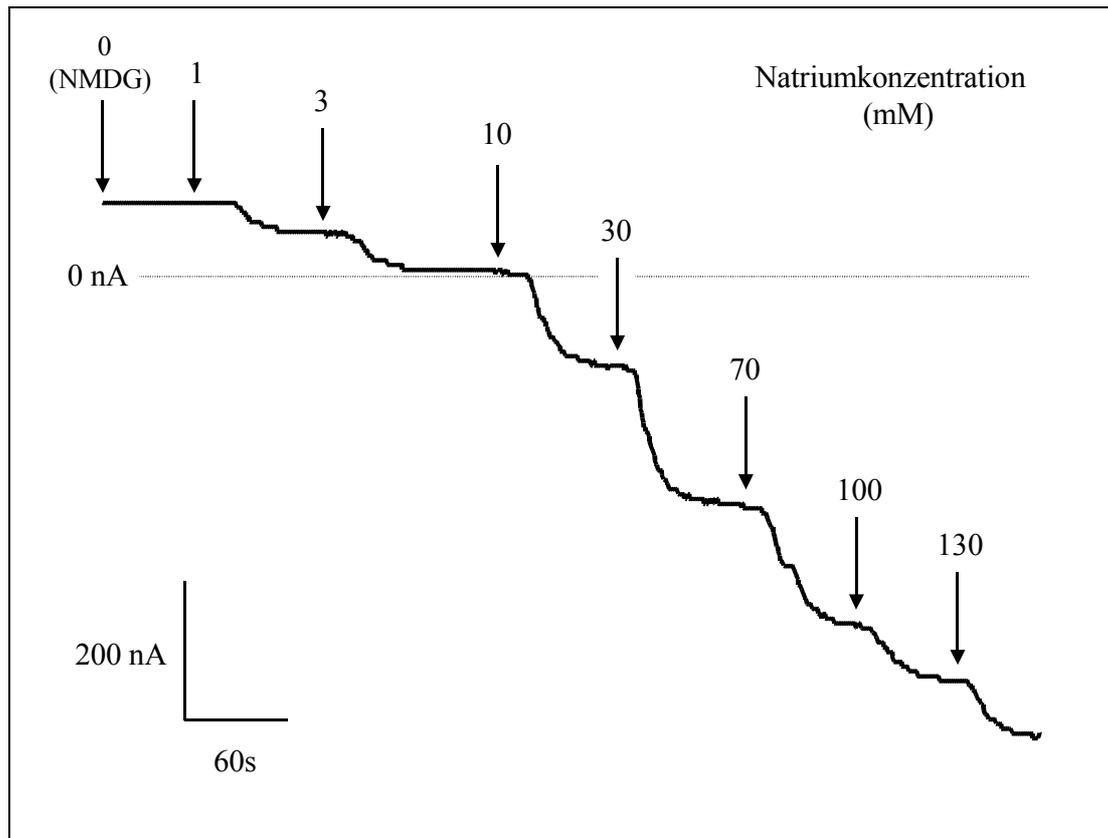
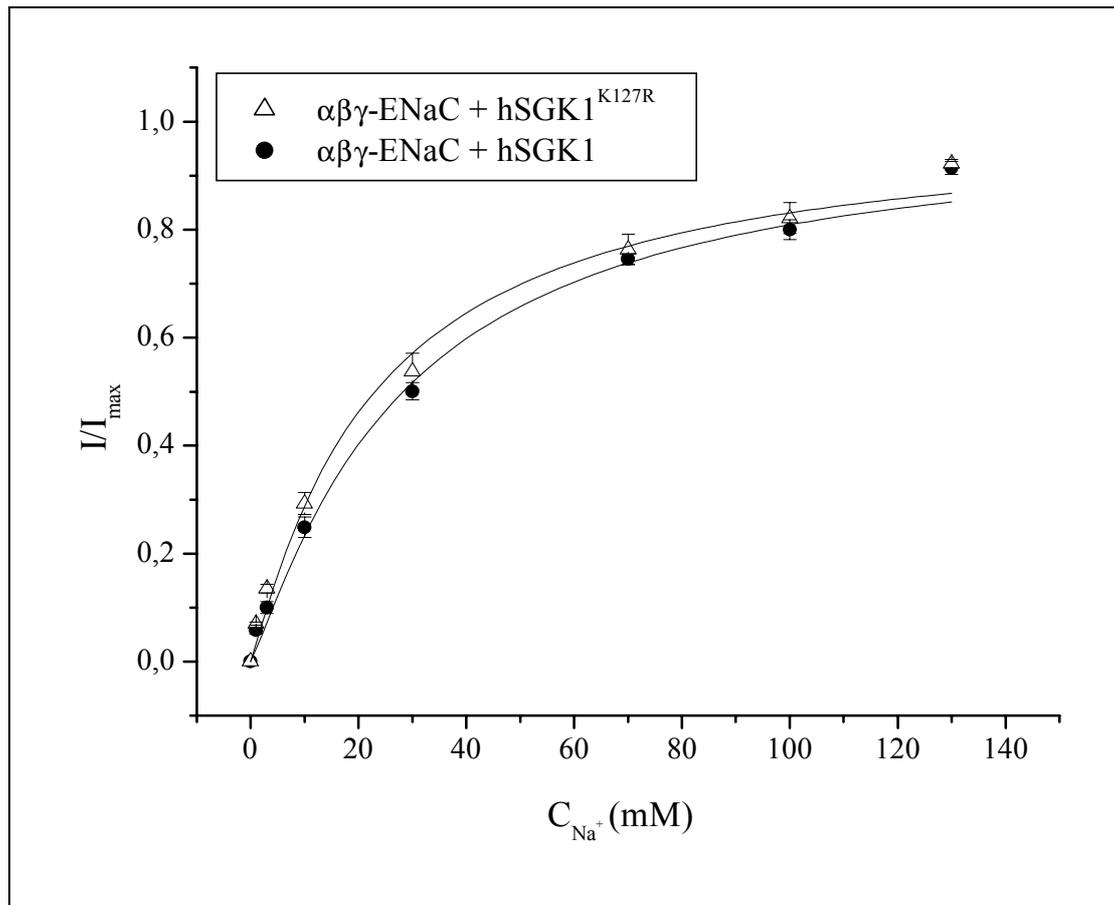


Abb. 18: Originalaufzeichnung: Natriumkinetik $\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1

Die Messungen lieferten nahezu identische I_{50} -Werte für die Koexpressionen aus ENaC + hSGK1 und ENaC + hSGK1^{K127R}. Die Natriumkonzentrationen bei halbmaximalem Strom (I_{50}) lagen zwischen $23,0 \pm 1,9$ mM und $28,3 \pm 2,3$ mM.

	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1 ^{K127R}	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1
halbmaximaler Strom I_{50} (mM Na ⁺)	$28,3 \pm 2,3$	$23,0 \pm 1,9$
n_H	$1,14 \pm 0,09$	$1,08 \pm 0,09$
100%-Ströme (nA)	$642,5 \pm 50,4$	$2130,0 \pm 224,2$
Zellzahl (n)	6	6

Tab. 12: Natriumsensitivität des $\alpha\beta\gamma$ -ENaC

Abb. 19: Natriumsensitivität des $\alpha\beta\gamma$ -ENaC

3.1.7. Wirkung von 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)

IBMX ist ein indirekter Aktivator der Proteinkinase A (PKA). Die PKA stimuliert ähnlich der hSGK1 den Epithelialen Natriumkanal. Die Regulationskaskaden der beiden Kinasen laufen jedoch völlig unabhängig voneinander ab [111]. Eine Interaktion zwischen PKA und hSGK1 in Bezug auf die Aktivierung des ENaC sollte untersucht werden.

Jeweils die Hälfte der Oozyten der drei Versuchsgruppen wurde zwei Tage nach cRNA-Injektion über 24 Stunden in 1 mM IBMX inkubiert. Nach Inkubation war bei allen Versuchsgruppen eine Erhöhung des Amilorid-sensitiven Stroms zu beobachten. Die Koexpression von $\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1 offenbarte auch weiterhin die höchsten

3. Versuche und Ergebnisse

Natriumströme und $\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1^{K127R} die geringsten. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden jedoch deutlich geringer.

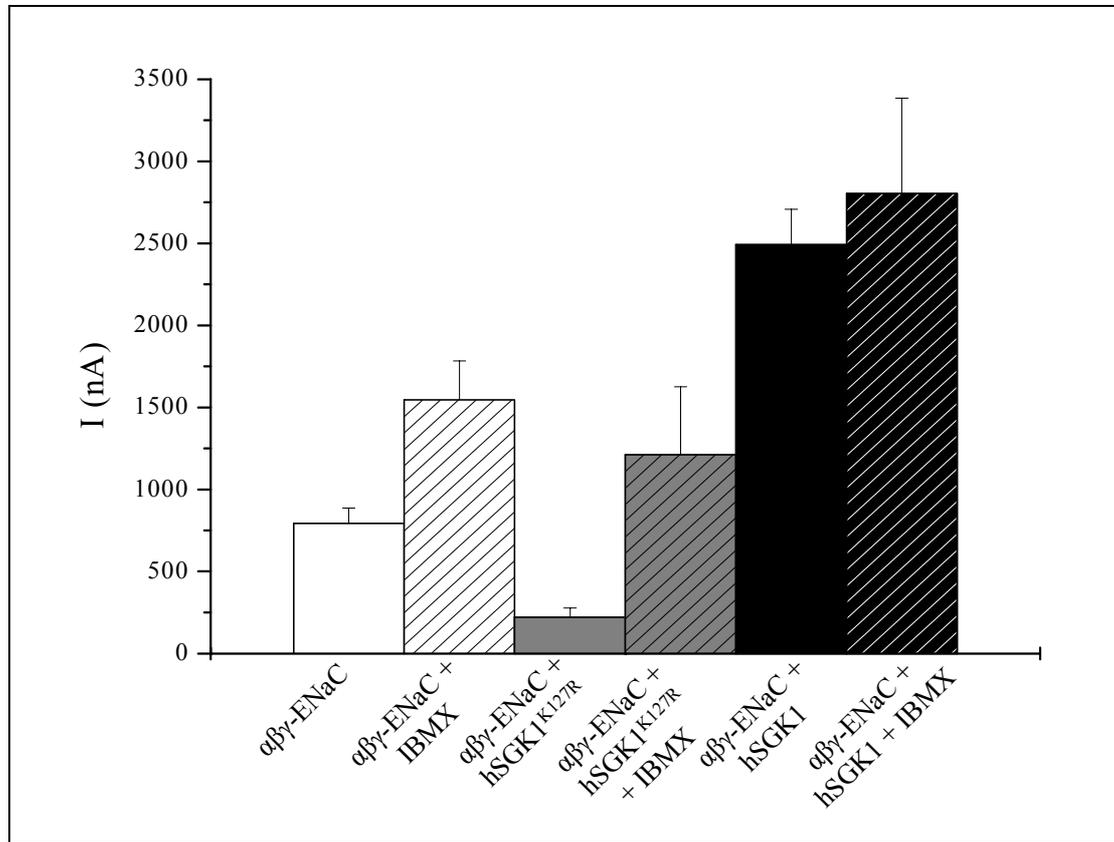


Abb. 20: Amilorid-sensitive Ströme nach Inkubation mir IBMX (1 mM) für 24 Stunden

ohne Inkubation mit IBMX	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1 ^{K127R}	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1
I (nA)	792,5 ± 93,6	221,4 ± 56,0	2490,8 ± 217,9
Zellzahl (n)	5	7	6
Inkubation mit IBMX	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1 ^{K127R}	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1
I (nA)	1546,0 ± 238,3	1210,8 ± 414,9	2804,0 ± 579,8
Zellzahl (n)	5	6	5

Tab. 13: Amilorid-sensitive Ströme ohne und mit IBMX(1mM)-Inkubation

3. Versuche und Ergebnisse

Zur besseren Auswertung wurden die Amilorid-sensitiven Ströme nach IBMX-Stimulation zu jenen vor Inkubation in Relation gesetzt. Erstaunlicherweise wurde die Koexpression $\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1^{K127R} durch IBMX am stärksten (ca. 5,5-fach) stimuliert, wohingegen bei $\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1 nur eine geringe Zunahme des Natriumstroms zu beobachten war (112 %). Die Kontrollgruppe wies nach Inkubation eine Verdoppelung des Natriumstroms auf.

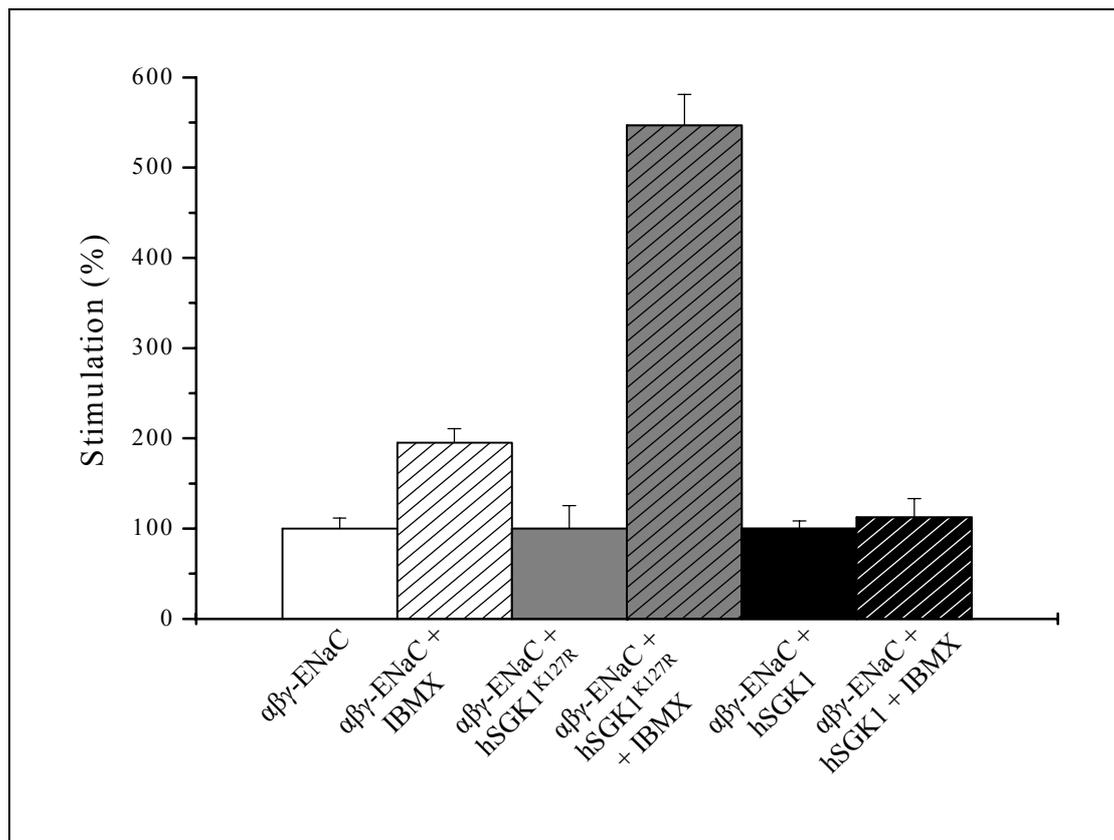


Abb. 21: Relative Stimulation nach Inkubation mit IBMX (1 mM)

Inkubation mit IBMX	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1 ^{K127R}	$\alpha\beta\gamma$ -ENaC + hSGK1
Stimulation (%)	195,1 ± 15,4	546,8 ± 34,3	112,6 ± 20,7

Tab. 14: Relative Stimulation der Amilorid-sensitiven Ströme durch Inkubation in IBMX (1 mM) über 24 Stunden

3.2. Kaliumkanäle und hSGK1

Ein erhöhter Natriumeinstrom in eine Zelle hat zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials zwangsläufig einen erhöhten Kaliumausstrom zur Folge. Da der Natriumeinstrom durch den ENaC sehr stark durch die hSGK1 stimuliert wurde, lag die Vermutung nahe, daß die hSGK1 auch den Kaliumefflux durch einen der zahlreichen renalen Kaliumkanäle beeinflusst. Folgende Kaliumkanäle wurden auf eine Modulation durch die hSGK1 untersucht: Kir2, KCNQ1 + KCNE1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4 und Kv1.5.

3.2.1. Kir2 (inward rectifier)

Es wurde cRNA mit den Konzentrationen von 100 ng / μ l für den Kir2 (2,5 ng / Oozyte) und je 300 ng / μ l (7,5 ng / μ l) sowohl für die inaktive Kinase hSGK1^{K127R} als auch für die aktive Kinase hSGK1 koinjiziert. Die Messung erfolgte am zweiten Tag nach cRNA-Injektion. Die Kaliumströme der beiden Versuchsgruppen Kir2 + hSGK1^{K127R} ($164,2 \pm 20,2$ nA; n=14) und Kir2 + hSGK1 ($158,6 \pm 12,7$ nA; n=12) wiesen nahezu keinen Unterschied auf.

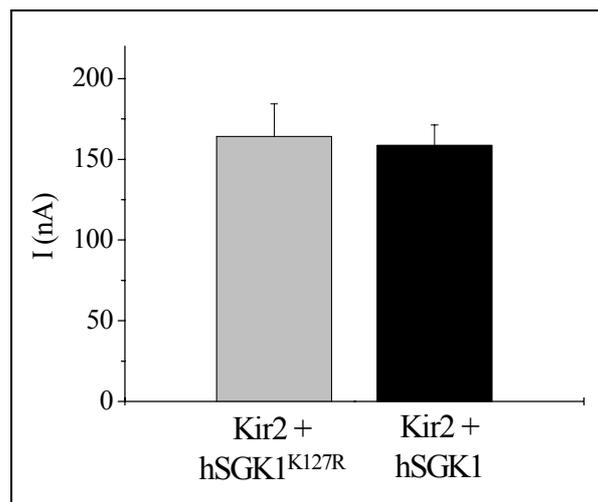


Abb. 22: Koexpression von Kir2 mit hSGK1^{K127R} und hSGK1

3.2.2. I_{Ks} -Kanal

Die injizierten cRNA-Konzentrationen betragen 200 ng / μ l für I_{Ks} -Kanal (KCNQ1+KCNE1) (5 ng / Oozyte) und je 300 ng / μ l (7,5 ng / Oozyte) für die Kinasen. Auch hier erfolgte die Messung zwei Tage post injectionem. Die Koexpression von I_{Ks} + hSGK1 ($320,7 \pm 56,4$ nA; n=6) lieferte bei der Messung zwar höhere Kaliumströme als die Koexpression mit der inaktiven Kinase ($215,5 \pm 46,6$ nA; n=6), der Unterschied zur Negativkontrolle war jedoch nicht signifikant.

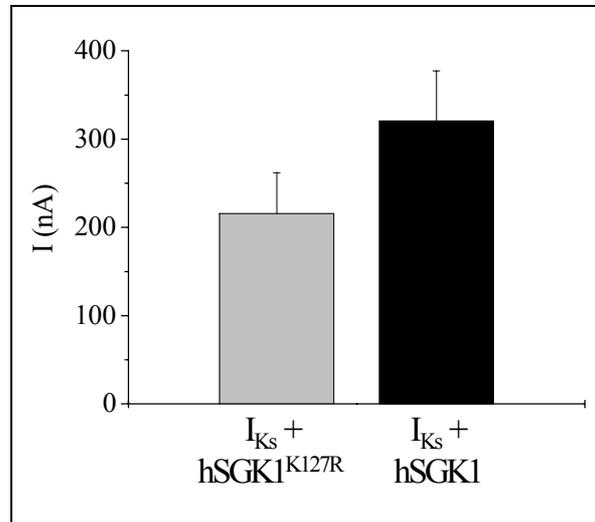


Abb. 23: Koexpression von I_{Ks} mit hSGK1^{K127R} und hSGK1

3.2.3. Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4 und Kv1.5

Die cRNA-Konzentrationen betragen für Kv1.x jeweils 25 ng / μ l (0,625 ng / Oozyte), die koinjizierten Kinasen hatten eine Konzentration von je 300 ng / μ l (7,5 ng / Oozyte). Die Messungen erfolgten jeweils am zweiten Tag nach cRNA-Injektion.

Die gemessenen Kaliumströme bei Expression von Kv1.2 + hSGK1 ($6675,0 \pm 1321,1$ nA; n=6) unterschieden sich nicht wesentlich von jenen bei Kv1.2 + hSGK1^{K127R} ($6626,7 \pm 1567,0$ nA; n=6).

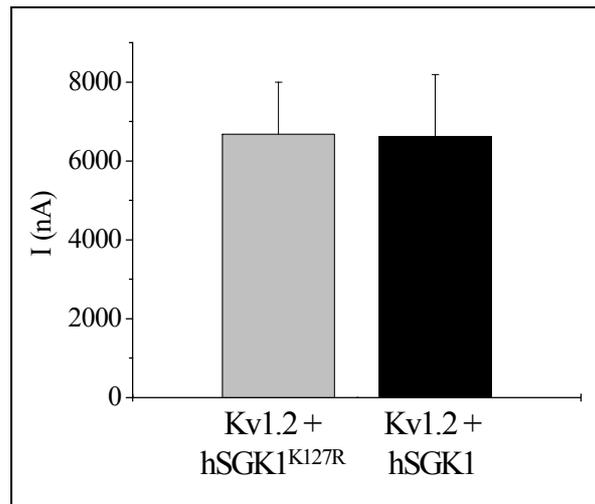


Abb. 24: Koexpression von Kv1.2 mit hSGK1^{K127R} und hSGK1

Die Koexpression von Kv1.3 + hSGK1 zeigte eine deutliche Stimulation des gemessenen Kaliumstromes gegenüber Kv1.3 + hSGK1^{K127R}. Die aktive Kinase hSGK1 stimulierte die Kv1.3-induzierten Kaliumströme auf $4190,4 \pm 339,5$ nA (n=10). Dies entsprach einer Steigerung um den Faktor drei, verglichen mit der Koexpression von Kv1.3 und hSGK1^{K127R} ($1331,4 \pm 190,9$ nA; n=11). Der Unterschied war signifikant.

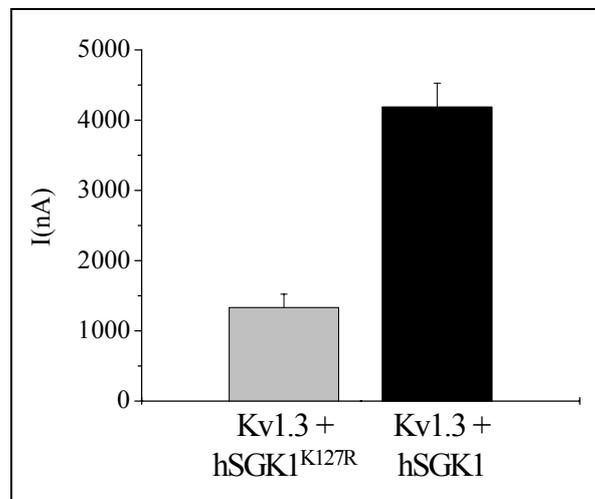


Abb. 25: Stimulation des Kv1.3 durch hSGK1

Kv1.4 zeigte eine geringe Stimulation der Kaliumströme auf hSGK1 ($3541,0 \pm 304,3$ nA; n=11), der Unterschied zur Koexpression von Kv1.4 mit hSGK1^{K127R} ($2234,5 \pm 315,2$ nA; n=10) erwies sich aber im Student-t-Test als nicht signifikant.

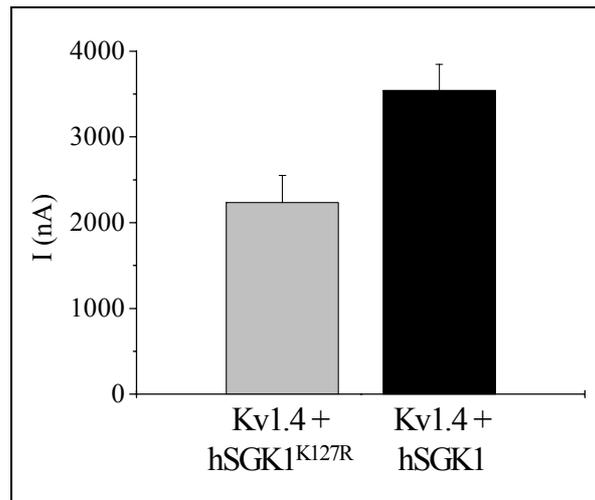


Abb. 26: Koexpression von Kv1.4 mit hSGK1^{K127R} und hSGK1

Auch bei Kv1.5 war keine Stimulation durch hSGK1 ($208,0 \pm 29,9$ nA; n=6) festzustellen. Die Kaliumströme lagen sogar geringfügig unter jenen der Koexpression mit hSGK1^{K127R} ($236,0 \pm 48,1$ nA; n=6).

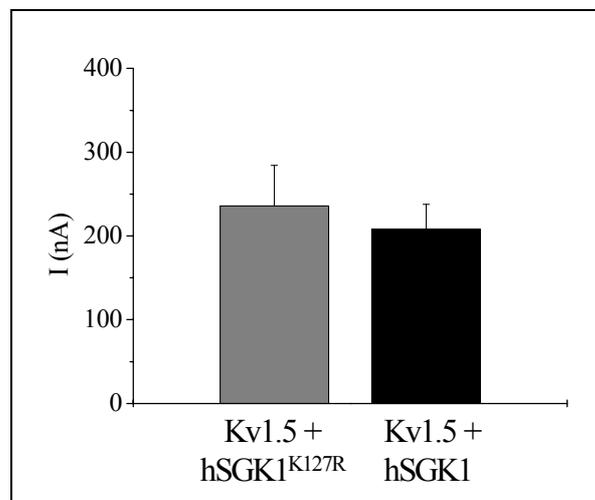


Abb. 27: Koexpression von Kv1.5 mit hSGK1^{K127R} und hSGK1

3.3. Kv1.3 und hSGK1

3.3.1. Stimulation des Kv1.3 durch die hSGK1-Mutante hSGK1^{S422D}

Da der Kv1.3 als einziger der untersuchten Kaliumkanäle eine Wirkung auf hSGK1 zeigte, wurde die Stimulation weiter untersucht.

Bei den folgenden Experimenten wurde sowohl eine konstitutiv aktive hSGK1 als auch ein weiterer inaktiver Kinasemutant verwendet. Die aktive Kinase hSGK1^{S422D} ist eine Mutante der hSGK1, bei welcher die Aminosäure Serin (S) an Position 422 durch Aspartat (D) ersetzt wurde. Üblicherweise wird die hSGK1 an Ser⁴²² durch PDK2 phosphoryliert und dadurch aktiviert. Die Mutante mit Asp⁴²² hat eine höhere Aktivität als die Wildtyp-Kinase [62], da Asp⁴²² mit seiner negativ geladenen Carboxylgruppe die Phosphorylierung an Ser⁴²² der Wildtyp-Kinase imitiert [62]. Auch die hSGK1^{K127N} ist wie hSGK1^{K127R} ein inaktivierter Kinasemutant. Hier wurde lediglich die Aminosäure Lysin (K) an Position 127 zu Asparagin (N) mutiert. Diese Veränderung führte zum Aktivitätsverlust der Kinase.

Die ursprünglich gewählte cRNA-Konzentration des Kv1.3 von 25 ng / µl mußte für die weiteren Messungen auf 5 ng / µl reduziert werden, da unter der aktiveren Kinase hSGK1^{S422D} derart hohe Kaliumströme (über 15 µA) auftraten, daß diese mit dem beschriebenen Versuchsaufbau nicht mehr exakt aufzunehmen waren. Die injizierte cRNA-Menge betrug folglich nur noch 0,125 ng, weshalb auf eine zweizeitige Injektion von Kv1.3 und Kinasen umgestellt wurde (2.3).

Die Kv1.3-spezifischen Kaliumströme wurden zwei Tage nach der letzten Injektion aufgezeichnet. In ND96 wurden die Oozyten auf ein Haltepotential von -80 mV geklemmt. Zur Aktivierung der spannungsabhängigen Kaliumkanäle fanden wiederholt Potentialsprünge auf -10 mV statt. Während des Depolarisationsimpulses war ein deutlicher Kv1.3-spezifischer Auswärtsstrom zu beobachten. Die schnelle Aktivierung ging unmittelbar in die Inaktivierungsphase mit ausgeprägtem Abfall des Kaliumstromes über. Diese erstreckte sich entsprechend der Charakteristik des Kv1.3 als langsam inaktivierendem Kaliumkanal über mehrere Sekunden. Nach Beendigung des Depolarisationsimpulses und Rückkehr auf das Ausgangsmembranpotential von -80 mV war der Kv1.3 wenige Sekunden später wieder vollständig aktivierbar. Der

spannungsinduzierte Kaliumstrom wurde definiert als Differenz der Stromflüsse bei -10 und -80 mV.

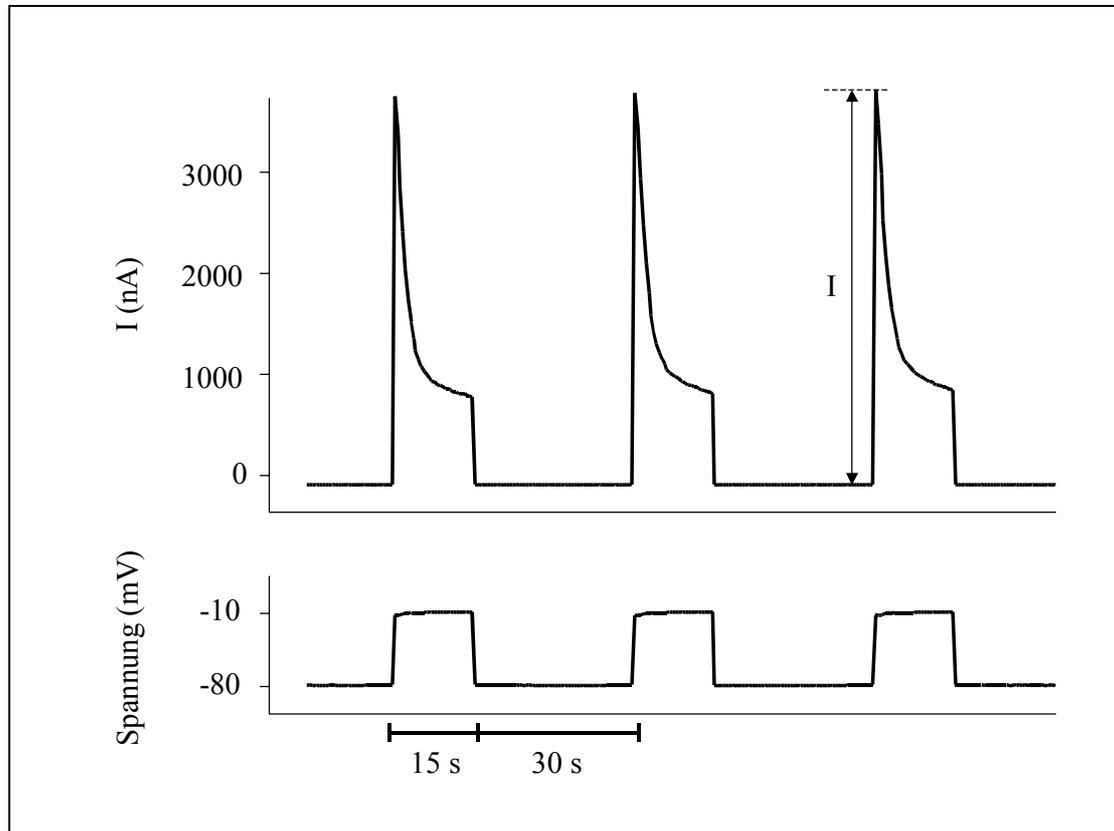


Abb. 28: Originalaufzeichnung: Kv1.3 + hSGK1^{S422D}; I = spannungsinduzierter Kaliumstrom

Bei den Messungen waren wieder drei Versuchsgruppen miteinander zu vergleichen: die Koexpression von Kv1.3 und hSGK1^{S422D}, Kv1.3 als Kontrolle sowie die Negativkontrolle aus Kv1.3 und hSGK1^{K127N}. Unter hSGK1^{S422D} war eine ausgeprägte Stimulation des Kv1.3 zu erkennen ($2319,4 \pm 301,3$ nA). Im Vergleich zur Kontrolle ($576,9 \pm 124,0$ nA) stimulierte die Kinase den Kaliumkanal zu vierfach höheren Werten. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Strömen von Kontrolle und Negativkontrolle ($654,4 \pm 101,1$ nA) war nicht festzustellen.

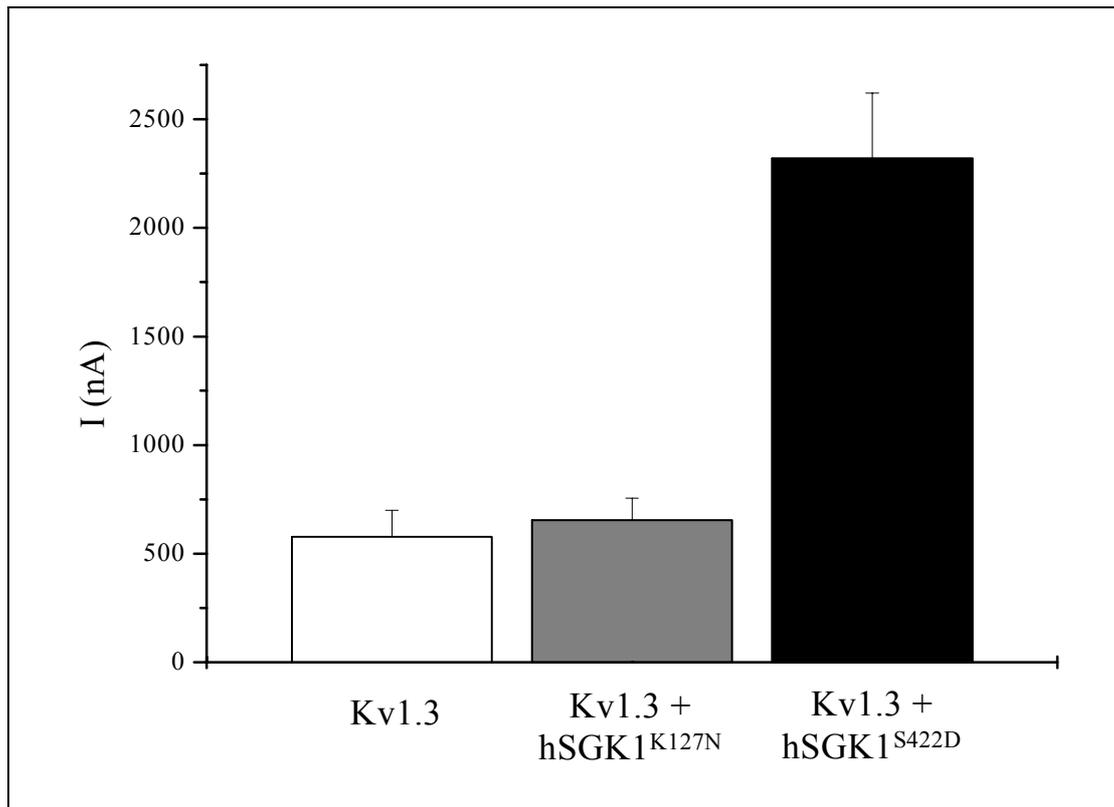


Abb. 29: Stimulation des Kv1.3 durch die hSGK1^{S422D} im Vergleich zu Kontrollgruppe (Kv1.3) und der Koexpression mit hSGK1^{K127N}

	Kv1.3	Kv1.3 + hSGK1 ^{K127N}	Kv1.3 + hSGK1 ^{S422D}
I (nA)	576,9 ± 124,0	654,4 ± 101,1	2319,4 ± 301,3
Zellzahl (n)	8	8	8

Tab. 15: Stimulation des Kv1.3 durch die hSGK1^{S422D}

3.3.2. Zeitlicher Verlauf der Stimulation

Die spannungsinduzierten Kaliumströme wurden ein bis vier Tage nach der letzten cRNA-Injektion aufgezeichnet.

Sowohl die Kontroll- als auch die Negativkontrollzellen hielten sich im zeitlichen Verlauf auf einem relativ konstanten Niveau. Dieses lag für Kv1.3 um $1027,3 \pm 157,1$

3. Versuche und Ergebnisse

nA und für die Koexpression aus Kv1.3 und hSGK1^{K127N} bei $1481,7 \pm 207,7$ nA. Die Koexpression mit der aktiven Kinase lieferte bereits am ersten Expressionstag nahezu doppelt so hohe Kaliumströme ($2258,9 \pm 269,0$ nA) wie die Kontrollgruppe. Nach einer weiteren Steigerung zum zweiten Expressionstag auf $4587,8 \pm 390,0$ nA hielten sich die spannungsinduzierten Ströme ungefähr auf diesem Niveau.

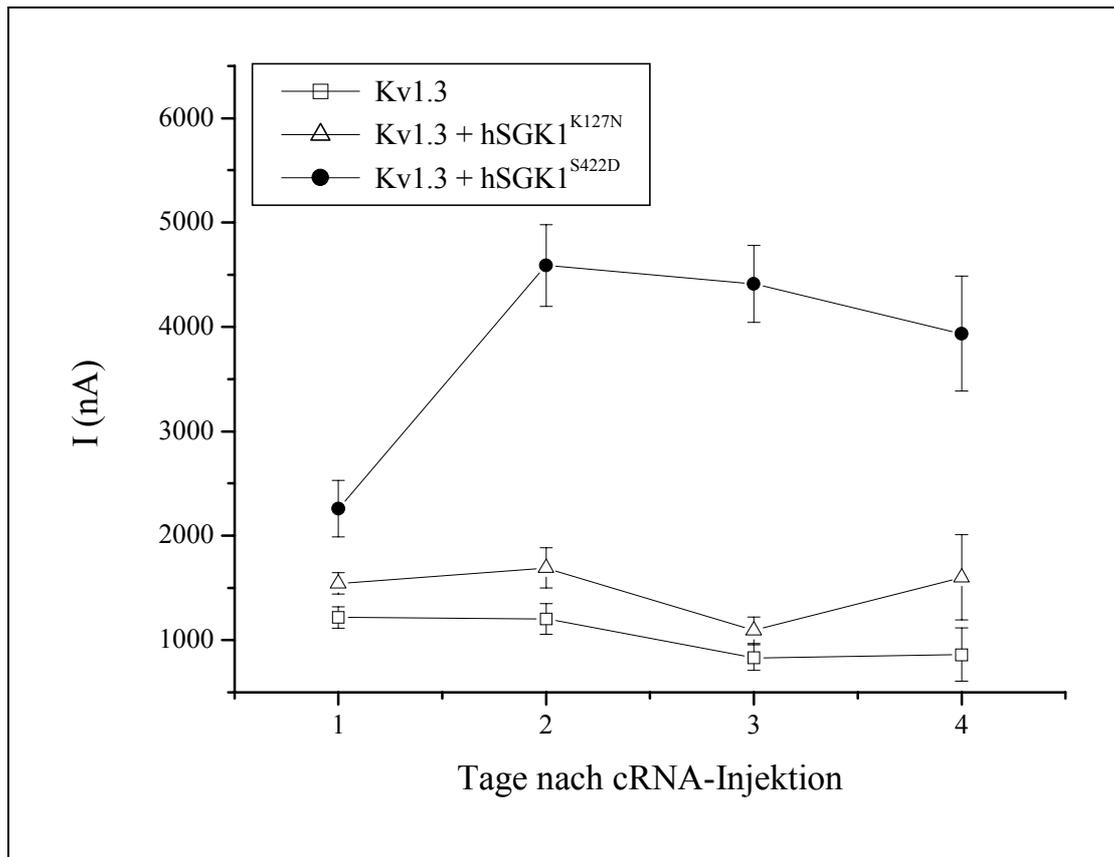


Abb. 30: zeitlicher Verlauf der Kv1.3-Stimulation durch hSGK1^{S422D}

Tage nach letzter cRNA-Injektion	Kv1.3	Kv1.3 + hSGK1 ^{K127N}	Kv1.3 + hSGK1 ^{S422D}
1	1216,0 ± 103,3 nA n = 10	1541,7 ± 102,2 nA n = 9	2258,9 ± 269,0 nA n = 9
2	1202,1 ± 145,8 nA n = 7	1691,7 ± 192,1 nA n = 9	4587,8 ± 390,0 nA n = 9
3	831,9 ± 122,9 nA n = 8	1092,2 ± 127,3 nA n = 9	4411,0 ± 368,7 nA n = 10
4	859,0 ± 256,3 nA n = 5	1601,0 ± 409,3 nA n = 5	3935,8 ± 551,9 nA n = 6

Tab. 16: zeitlicher Verlauf der Kaliumströme; n = Zellzahl

3.3.3. Spannungsabhängigkeit

Mit den folgenden Experimenten sollte der Mechanismus zur Steigerung der spannungsinduzierten Ströme durch die Kinase geklärt werden. Als ein Parameter der biophysikalischen Eigenschaften des Kv1.3 wurde die Spannungsabhängigkeit untersucht. Die Aktivierung des Kv1.3 für den Ionenfluß geht mit einer Translokation des S₄-Segments über die Membran einher. Das S₄-Segment enthält an jeder dritten Stelle die positiv geladene Aminosäure Arginin oder Lysin. Die Depolarisation der Zellmembran löst über das S₄-Segment eine Konformationsänderung des Kanalproteins aus [1, 53, 100].

Ausgehend von -80 mV wurden Depolarisationssprünge durchgeführt. Dabei wurde das ursprüngliche Membranhaltpotential jeweils um 10 mV bis auf eine Spannung von +50 mV gesteigert. Den Depolarisationsimpulsen über 15 Sekunden folgte je ein Intervall auf dem Ausgangspotential von -80 mV, um eine vollständige Aktivierbarkeit des Kv1.3 zu gewährleisten.

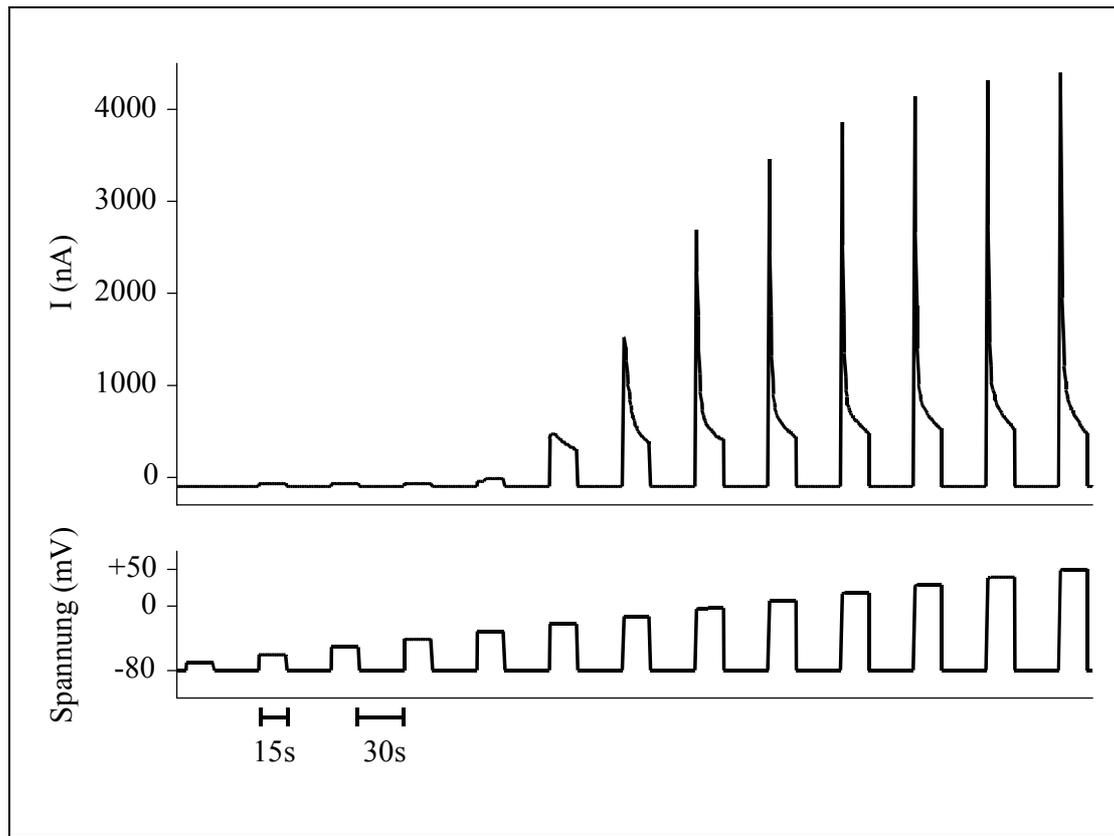


Abb. 31: Originaltracing Kv1.3 + hSGK1^{S422D}; Depolarisationsschwelle zur Aktivierung des Kv1.3 bei ca. -30 mV

Zur Auswertung wurde bei +50 mV der Maximalstrom (I_{\max}) angenommen. Die bei niedrigeren Spannungen gemessenen Ströme (I) wurden zu diesem in Relation gesetzt. Die so errechneten relativen Ströme wurden mittels Boltzmann-Funktion gefittet:

$$f(U) = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + e^{U/n_B})$$

U: Spannung; A_1 : Ausgangswert; A_2 : Endwert; n_B : Boltzmann-Koeffizient

Eine Aktivierung des Kv1.3 war erst bei einer Depolarisation auf Werte um -30 mV zu beobachten. Der Vergleich der Membranhaltspotentiale bei halbmaximalem Stromfluß (U_{50}) lieferte für die drei Versuchsgruppen nahezu identische Werte. Diese lagen zwischen $-4,5 \pm 0,6$ und $-6,5 \pm 0,5$ mV.

3. Versuche und Ergebnisse

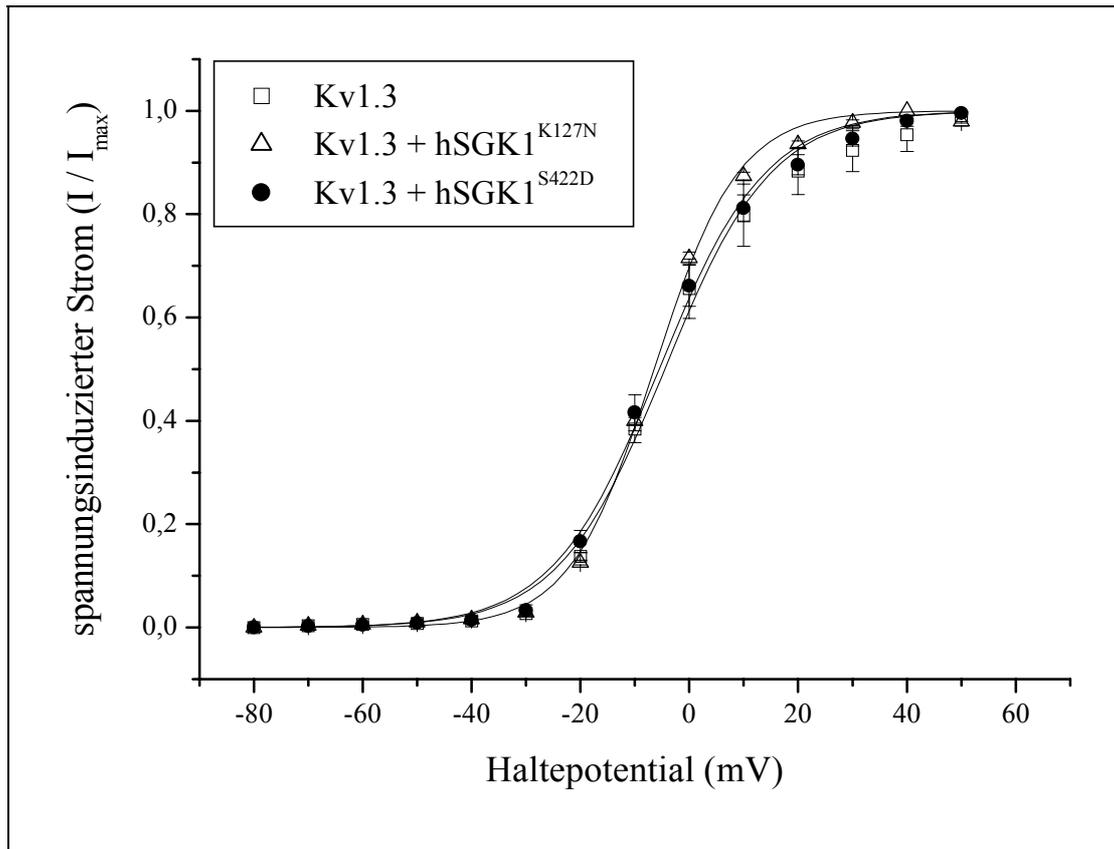


Abb. 32: Spannungsabhängigkeit des Kv1.3

	Kv1.3	Kv1.3 + hSGK1 ^{K127N}	Kv1.3 + hSGK1 ^{S422D}
U_{50}	$-4,5 \pm 0,6$	$-6,5 \pm 0,5$	$-5,5 \pm 0,6$
n_B	$9,79 \pm 0,51$	$7,71 \pm 0,45$	$9,78 \pm 0,51$
Deplarisationsströme bei -10 mV (nA)	$711,0 \pm 93,2$	$993,3 \pm 120,1$	$3308,0 \pm 331,3$
Zellzahl (n)	6	5	5

Tab. 17: Spannungsabhängigkeit des Kv1.3; U_{50} = Haltepotential bei halbmaximalem Stromfluß; n_B = Boltzmann-Koeffizient

3.3.4. Verhalten gegenüber Kanalblockern

Kanalblocker interagieren mit der Porenregion auf der extrazellulären Membranseite [53]. Die Sensitivität zu dem organischen Kation Tetraethylammonium (TEA) und dem Peptidtoxin Margatoxin (MTX) wurde als weiterer Parameter der biophysikalischen Eigenschaften herangezogen und auf eine Modulation durch die Kinase hSGK1^{S422D} untersucht. Die spannungsinduzierten Kaliumströme wurden in Abhängigkeit zur TEA- und MTX-Konzentration gemessen.

3.3.4.1. Hemmung durch Tetraethylammonium (TEA)

Tetraethylammonium ist ein unspezifischer Hemmstoff zur Blockade von Kaliumkanälen [13].

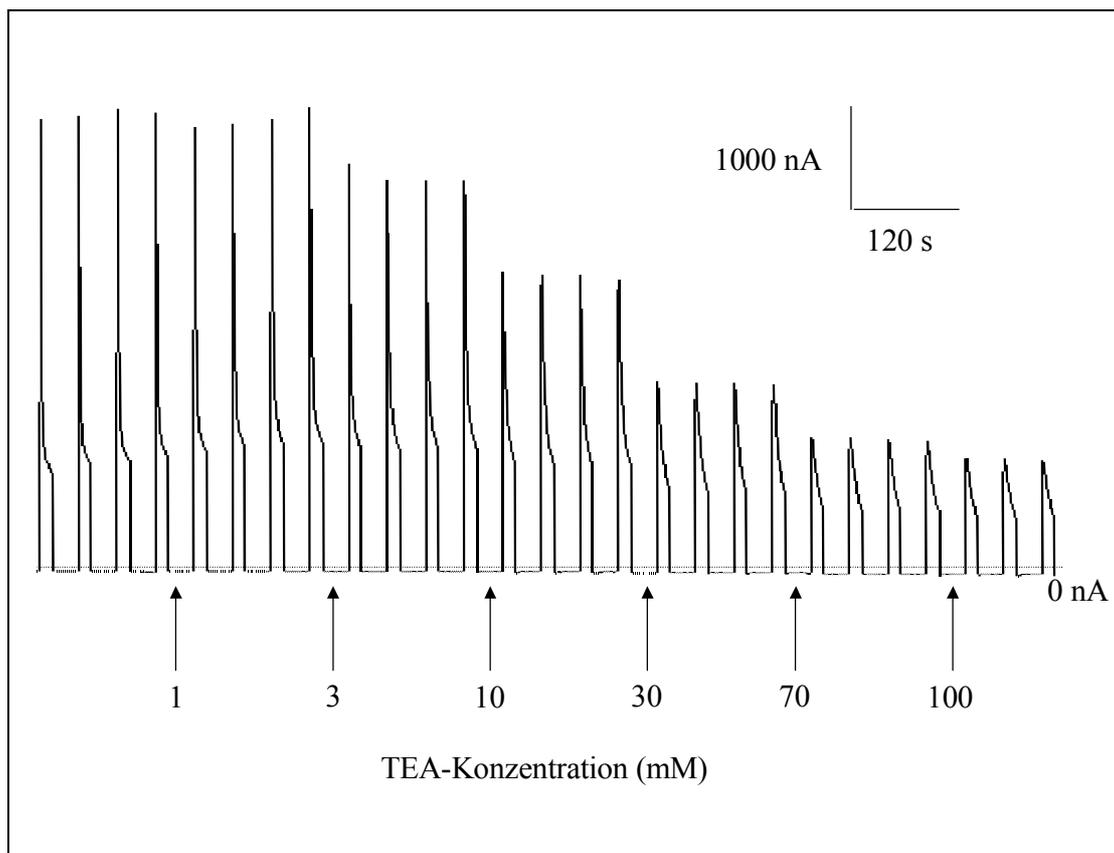


Abb. 33: Originalaufzeichnung Kv1.3 + hSGK1^{S422D}; Abnahme des Kaliumstromes mit steigender TEA-Konzentration

3. Versuche und Ergebnisse

Die Ausgangslösung ND96 wurde durch TEA in steigender Konzentration von 1 bis 100 mM ersetzt. Pro Konzentration betrug die Applikationszeit 120 Sekunden. Eine vollständige Kanalinhibition fand jedoch nicht statt. Selbst bei einer Konzentration von 100 mM TEA war ein deutlicher Kv1.3-spezifischer Reststrom zu beobachten.

Zur Auswertung wurde bei 0mM TEA der Maximalstrom (I_{\max}) angenommen. Die Differenz zwischen Maximalstrom und Kaliumstrom einer entsprechenden TEA-Konzentration (I) wurde zum Maximalstrom in Relation gesetzt und bezeichnet die Inhibition des Kv1.3.

$$\text{Inhibition in \%} = (I_{\max} - I) / I_{\max} \times 100$$

Ein signifikanter Unterschied war zwischen den Versuchsgruppen nicht festzustellen. Die IC_{50} -Werte für halbmaximale Hemmung lagen zwischen $9,7 \pm 0,9$ und $12,7 \pm 1,4$ mM.

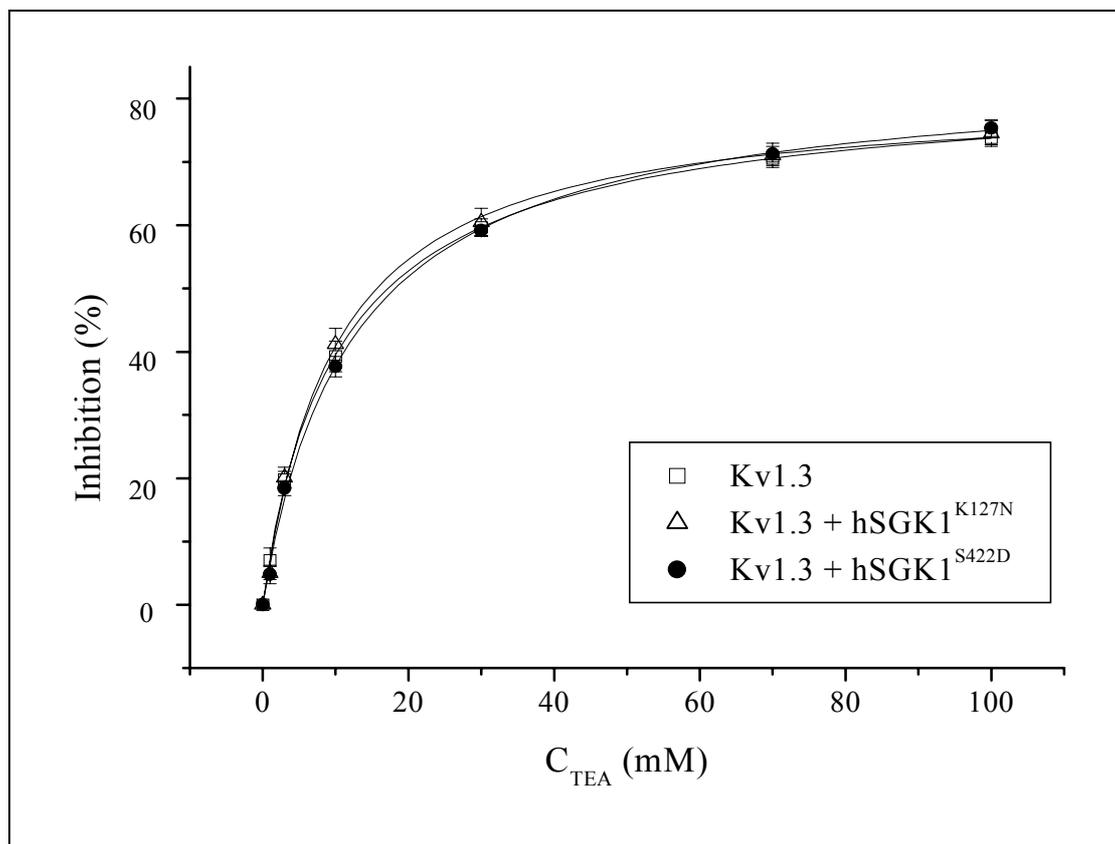


Abb. 34: Hemmung des Kv1.3 induzierten Stromes durch Tetraethylammonium (TEA)

	Kv1.3	Kv1.3 + hSGK1 ^{K127N}	Kv1.3 + hSGK1 ^{S422D}
IC ₅₀ (mM)	11,1 ± 1,3	9,7 ± 0,9	12,7 ± 1,4
n _H	0,94 ± 0,07	1,02 ± 0,07	0,97 ± 0,07
100%-Ströme (nA)	1488,0 ± 121,9	1579,0 ± 329,0	4158,0 ± 192,9
Zellzahl (n)	5	5	5

Tab. 18: Inhibition durch TEA; IC₅₀ = benötigte TEA-Konzentration für die halbmaximale Hemmung in Bezug auf den Reststrom bei 100 mM TEA

3.3.4.2. Hemmung durch Margatoxin (MTX)

Das Skorpiongift Margatoxin (MTX) blockiert sehr potent und relativ spezifisch den Kv1.3-Kaliumkanal [39, 74].

Die Messungen wurden in ND96 gestartet, und die Badlösung durch zunehmend höher konzentriertes MTX ersetzt. Beginnend mit einer Konzentration von 0,001 nM wurde der Peptidhemmstoff bis auf 3 nM gesteigert und für jeweils 120 Sekunden appliziert. Unter einer Konzentration von 3 nM war keine Kv1.3-typische Aktivierungs- und Inaktivierungsphase mehr zu beobachten. Der persistierende minimale Reststrom (I_{Rest}) war auf endogene Oozytenkanäle zurückzuführen.

Zur Auswertung wurde daher bei 3 nM MTX eine vollständige Inhibition des Kv1.3 angenommen. Der Maximalstrom wurde definiert als Differenz des spannungsinduzierten Stroms bei 0 mM MTX (I₀) und dem Reststrom (I_{Rest}). Die bei geringeren MTX-Konzentrationen gemessenen Ströme (I) wurden zum Maximalstrom in Relation gesetzt und bezeichnen die Inhibition:

$$\text{Inhibition in \%} = ((I_0 - I_{\text{Rest}}) - I) / (I_0 - I_{\text{Rest}}) \times 100$$

Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bei Inhibition durch MTX waren nicht festzustellen. Die IC₅₀-Werte für halbmaximale Hemmung lagen zwischen 0,112 ± 0,004 und 0,138 ± 0,005 nM.

3. Versuche und Ergebnisse

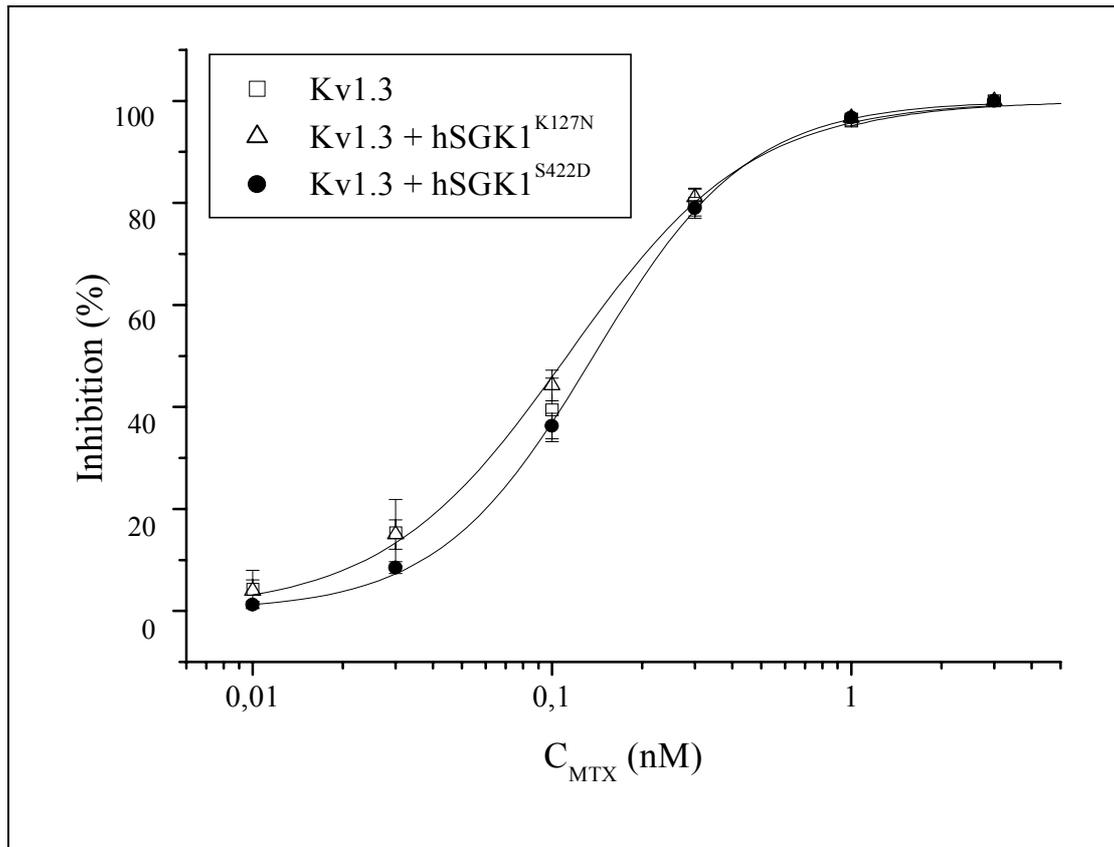


Abb. 35: Hemmung des Kv1.3 durch Margatoxin (MTX)

	Kv1.3	Kv1.3 + hSGK1 ^{K127N}	Kv1.3 + hSGK1 ^{S422D}
IC ₅₀ (nM)	0,123 ± 0,005	0,112 ± 0,004	0,138 ± 0,005
n _H	1,41 ± 0,07	1,42 ± 0,07	1,67 ± 0,08
100%-Ströme (nA)	503,0 ± 98,9	407,0 ± 82,7	1449,0 ± 166,3
Zellzahl (n)	5	5	5

Tab. 19: Inhibition durch Margatoxin; IC₅₀ = MTX-Konzentration bei halbmaximaler Hemmung

3.3.5. Wirkung von Chelerythrin

Chelerythrin (Chel) ist ein Proteinkinase-Hemmstoff, der hauptsächlich auf die Proteinkinase C (PKC) aber auch auf andere Ser-Thr-Kinasen wirkt [25]. Die Aktivität des Kv1.3 wird posttranslational durch das Zusammenspiel verschiedener Kinasen reguliert. Der PKC kommt hierbei entscheidende Bedeutung zu. Sie fungiert bei der Aktivierung als eine Art "master switch" [20]. Der Einfluß von Chelerythrin auf die durch hSGK1^{S422D} induzierte Aktivierung des Kv1.3 war zu untersuchen.

Jeweils die Hälfte der drei Versuchsgruppen wurde einen Tag nach der letzten cRNA-Injektion in 1 µM Chelerythrin inkubiert, während die andere Hälfte in ND96 aufbewahrt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Oozytengruppen gegeneinander gemessen.

Chelerythrin führte zu einem deutlichen Rückgang der Kaliumströme. Die geringste Wirkung zeigte der Proteinkinase-Hemmstoff auf die Negativkontrolle (Kv1.3 + hSGK1^{K127N}). Es war zwar unter Chelerythrin eine Reduktion der Kaliumströme zu beobachten, die Hemmung erwies sich jedoch als nicht signifikant. Die Kontrolle und die Koexpression mit der aktiven Kinase reagierten hingegen mit einer deutlichen Verminderung der Kaliumströme um bis zu 50%. Nach Behandlung mit Chelerythrin waren zwischen der Negativkontrolle und der Koexpression mit hSGK1^{S422D} keine größeren Differenzen mehr festzustellen.

Ohne Inkubation	Kv1.3	Kv1.3 + hSGK1 ^{K127N}	Kv1.3 + hSGK1 ^{S422D}
I (nA)	909,1 ± 134,3	1033,2 ± 141,3	1652,8 ± 193,3
Zellzahl (n)	11	11	9

24 h Inkubation mit Chel 1 µM	Kv1.3	Kv1.3 + hSGK1 ^{K127N}	Kv1.3 + hSGK1 ^{S422D}
I (nA)	471,0 ± 114,6	808,3 ± 151,8	1063,5 ± 133,9
Zellzahl (n)	10	9	10

Tab. 20: Kv1.3-induzierte Ströme: Vergleich nicht inkubierter und mit Chelerythrin (1 µM) inkubierter Zellen

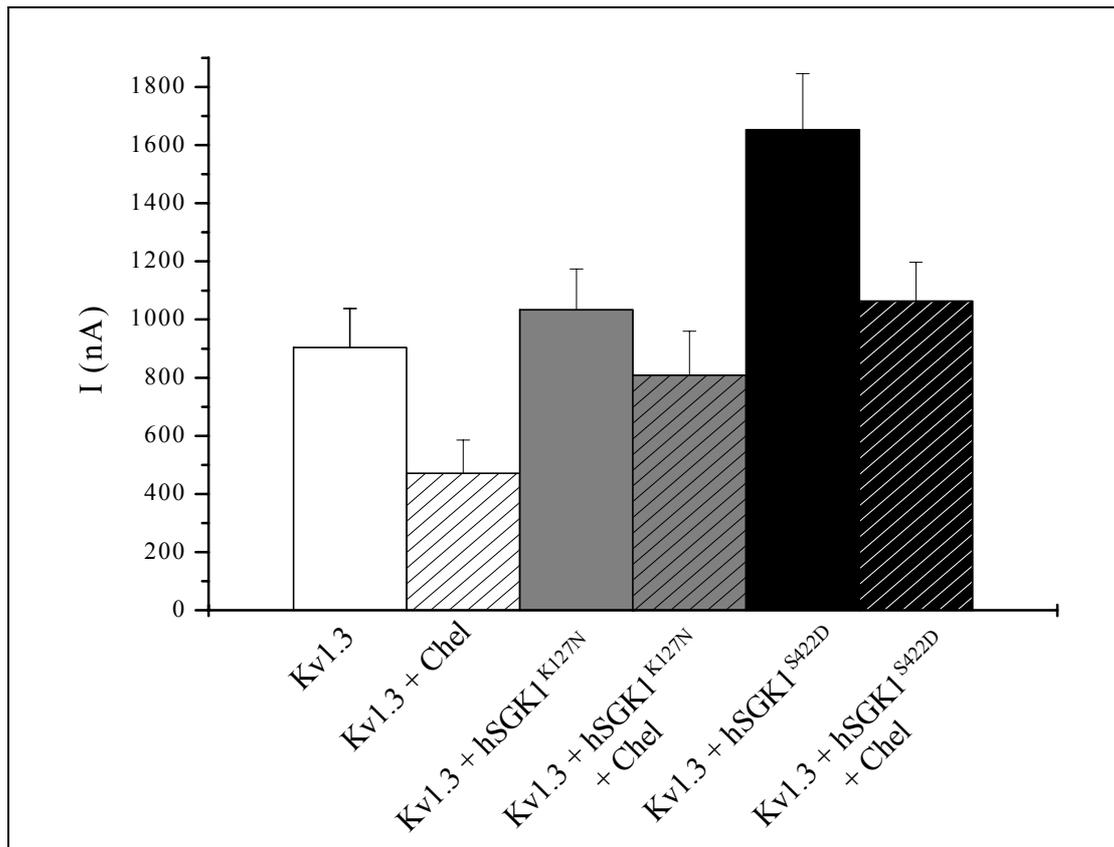


Abb. 36: Reduktion der Kv1.3-induzierten Kaliumströme unter Chelerythrin (1 μ M)

3.3.6. Inaktivierung des Kv1.3

Die Inaktivierung hat großen Einfluß auf die Offenwahrscheinlichkeit und beeinflusst somit den Gesamtstrom durch den Kv1.3 [53, 130]. Die Oozyten wurden im voltage clamp-Modus auf ein Membranhaltepotential von -80 mV geklemmt. Die Depolarisation auf -10 mV führte wieder zur Kanalaktivierung.

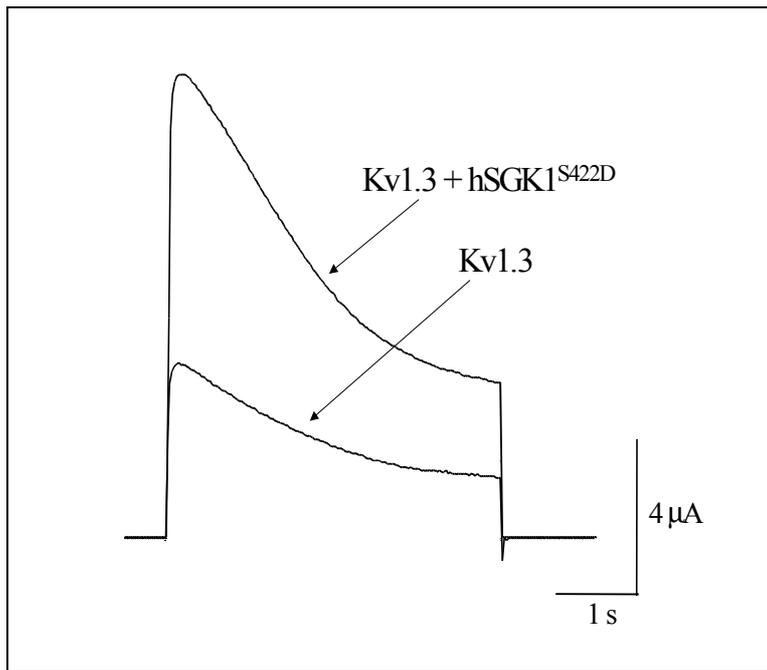


Abb. 37: Originaltracing: Kv1.3 und Kv1.3 + hSGK1^{S422D}

Allerdings wurde die Impulsdauer auf vier Sekunden reduziert, um den steilen Abschnitt der Inaktivierungskurve zu erfassen. Die Inaktivierung entsprach einer exponentiellen Abnahme des Kaliumstroms (vgl. Abb. 28 und Abb. 37).

Die Maximalströme (I_{\max}) zu Beginn und die Minimalströme (I_{\min}) am Ende des Depolarisationsimpulses der drei Versuchsgruppen (Kv1.3, Kv1.3 + hSGK1^{K127N} und Kv1.3 + hSGK1^{S422D}) wurden miteinander verglichen. Aufgrund der typischen Inaktivierung lag I_{\min} bei allen drei Versuchsgruppen deutlich unter dem Maximalstrom.

3. Versuche und Ergebnisse

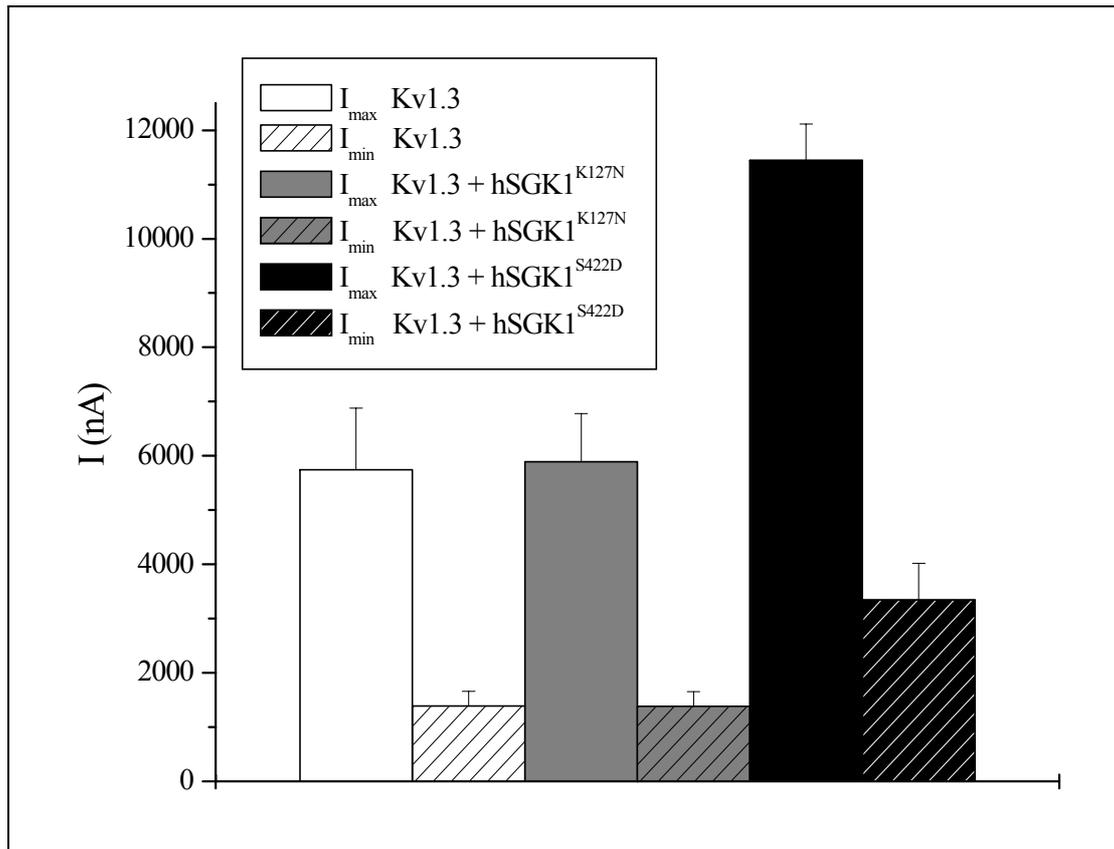


Abb. 38: Maximalströme (I_{\max}) zu Beginn der Depolarisation und Minimalströme (I_{\min}) bei Depolarisationsende

	Kv1.3	Kv1.3 + hSGK1 ^{K127N}	Kv1.3 + hSGK1 ^{S422D}
I_{\max} (nA)	5742,9 ± 432,7	5886,3 ± 891,5	11444,3 ± 666,5
I_{\min} (nA)	1387,1 ± 271,9	1383,8 ± 268,4	3341,4 ± 679,4
Zellzahl (n)	7	8	7

Tab. 21: Vergleich der Maximal- (I_{\max}) und Minimalströme (I_{\min})

Zur besseren Beurteilung wurden die Minimalströme (I_{\min}) zu den Maximalströmen (I_{\max}) in Relation gesetzt und als relative Minimalströme (I_{rel}) bezeichnet.

$$I_{\text{rel}} \text{ in } \% = I_{\min} / I_{\max} \times 100$$

3. Versuche und Ergebnisse

Die relativen Minimalströme wiesen unter hSGK1^{S422D} signifikant höhere Werte auf. Sie betragen den 1,5-fachen Wert und lagen damit rund 10% über jenen der Kontroll- oder Negativkontrollgruppe.

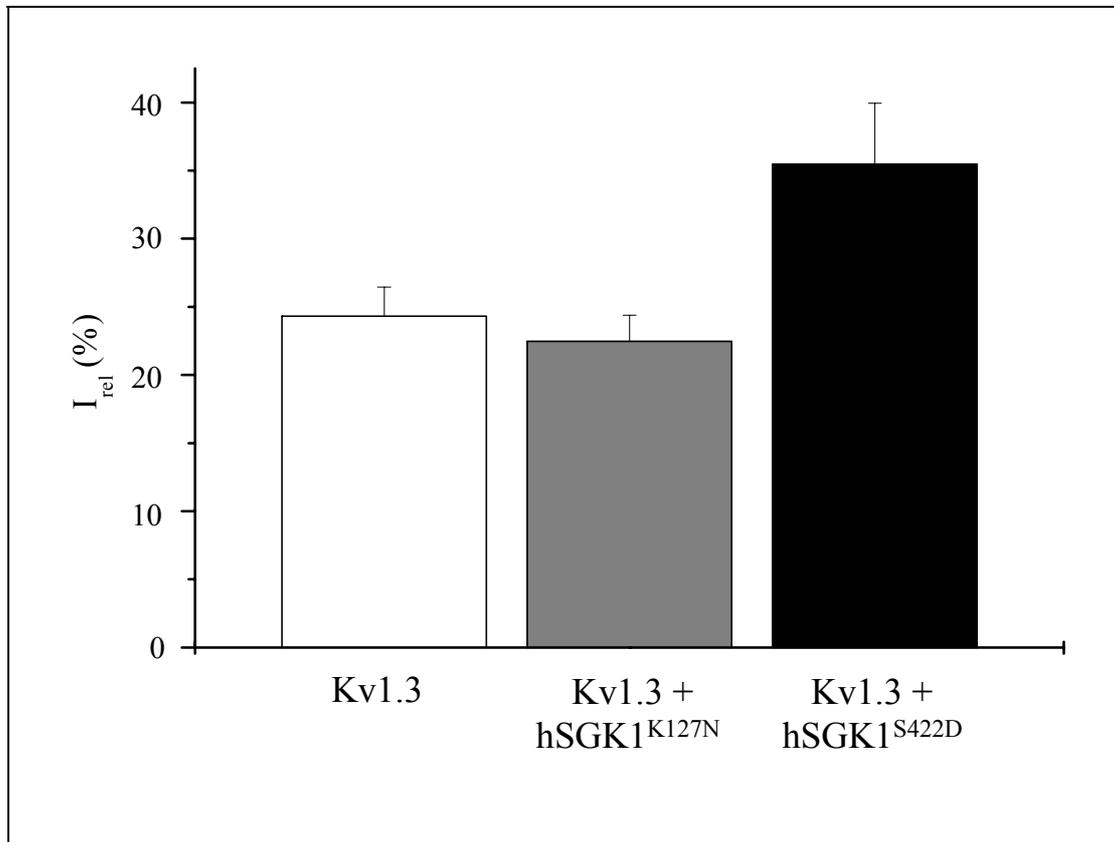


Abb. 39: relative Minimalströme (I_{rel}) bei Depolarisationsende

	Kv1.3	Kv1.3 + hSGK1 ^{K127N}	Kv1.3 + hSGK1 ^{S422D}
I _{rel} in %	24,3 ± 2,1	22,5 ± 1,9	35,5 ± 4,5

Tab. 22: Vergleich der relativen Minimalströme (I_{rel})

Zur Verifizierung der verzögerten Inaktivierung unter hSGK1^{S422D} wurden die Inaktivierungskonstanten (τ) bestimmt. Der Inaktivierungsverlauf (Abb. 40) entsprach

3. Versuche und Ergebnisse

einer exponentiellen Abnahme erster Ordnung und wurde mit folgender Funktion gefittet:

$$f(t) = a * e^{-(t-t_0)/\tau} + y_0$$

y_0 : Offset; a : Amplitude; t : Zeit; t_0 : 0,5 s; τ : Inaktivierungskonstante

Die Inaktivierungskonstante (τ) gibt an, nach welcher Zeit $1/e$ (ca. 36,8%) der Kanäle inaktiviert sind. Auch hier wurde entsprechend den erhöhten relativen Restströmen unter $hSGK1^{S422D}$ eine Verzögerung der Inaktivierung um den Faktor 1,5 deutlich.

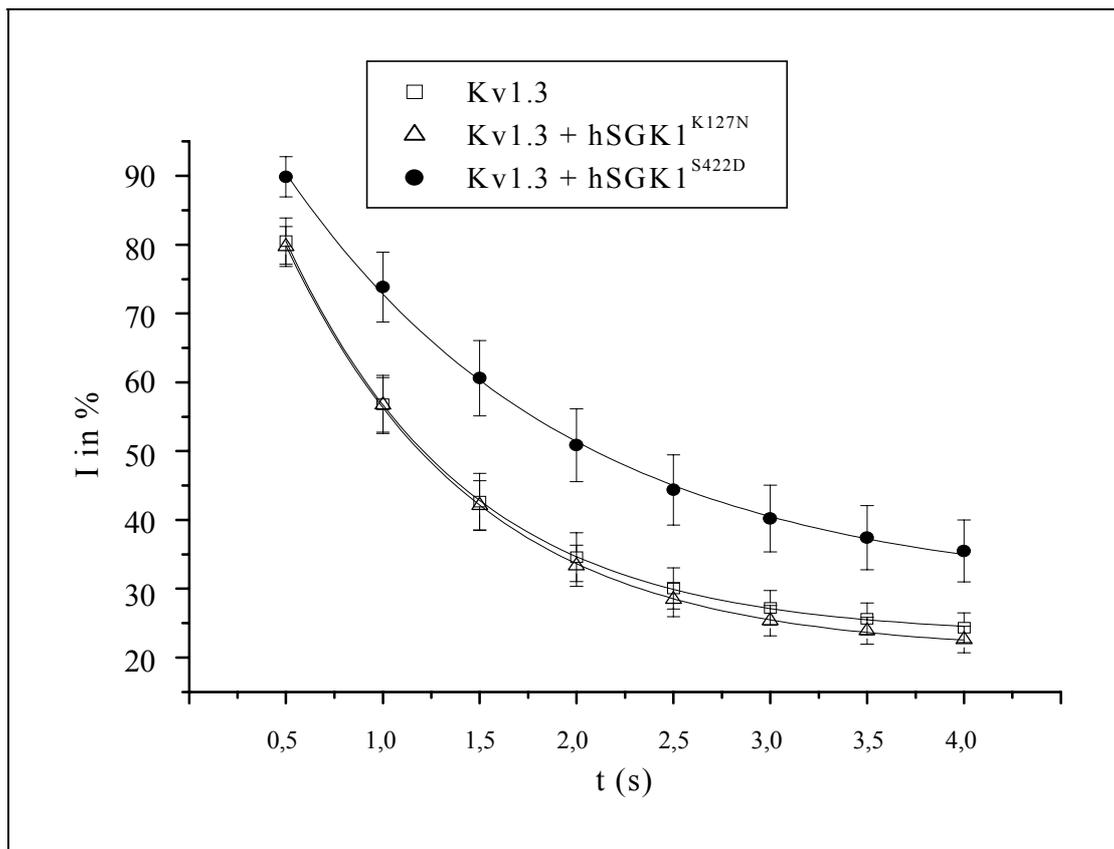


Abb. 40: Verlauf der Inaktivierung; $t = 0$: Depolarisationsbeginn, $t = 0.5$: Beginn der Inaktivierung

	Kv1.3	Kv1.3 + hSGK1 ^{K127N}	Kv1.3 + hSGK1 ^{S422D}
τ (s)	$0,952 \pm 0,126$	$0,971 \pm 0,079$	$1,528 \pm 0,179$

Tab. 23: Inaktivierungskonstanten (τ)

3.3.7. Deletion des N-Terminus

Der N-Terminus ist verantwortlich für die N-Typ-Inaktivierung und spielt auch bei der Regulation der Expressionsdichte des Kv1.3 eine entscheidende Rolle [93, 128, 129]. Zur Prüfung einer Interaktion zwischen N-Terminus und hSGK1^{S422D} wurde eine Kv1.3-Mutante mit Deletion der Aminosäuren 3 bis 36 der N-terminalen Region (Kv1.3^{del3-36}) eingesetzt.

Die Mutante Kv1.3^{del3-36} lieferte mit 1450 ± 100 nA 1,5-fach höhere Kaliumströme als der Wildtyp (950 ± 50 nA). Sowohl Mutante als auch Wildtyp erfuhren durch die hSGK1^{S422D} eine deutliche Steigerung der Kaliumströme. Diese schien jedoch bei Kv1.3^{del3-36} mit einer Steigerung um das 2,9-fache etwas ausgeprägter, als jene des Wildtyps (Zunahme um den Faktor 2,2).

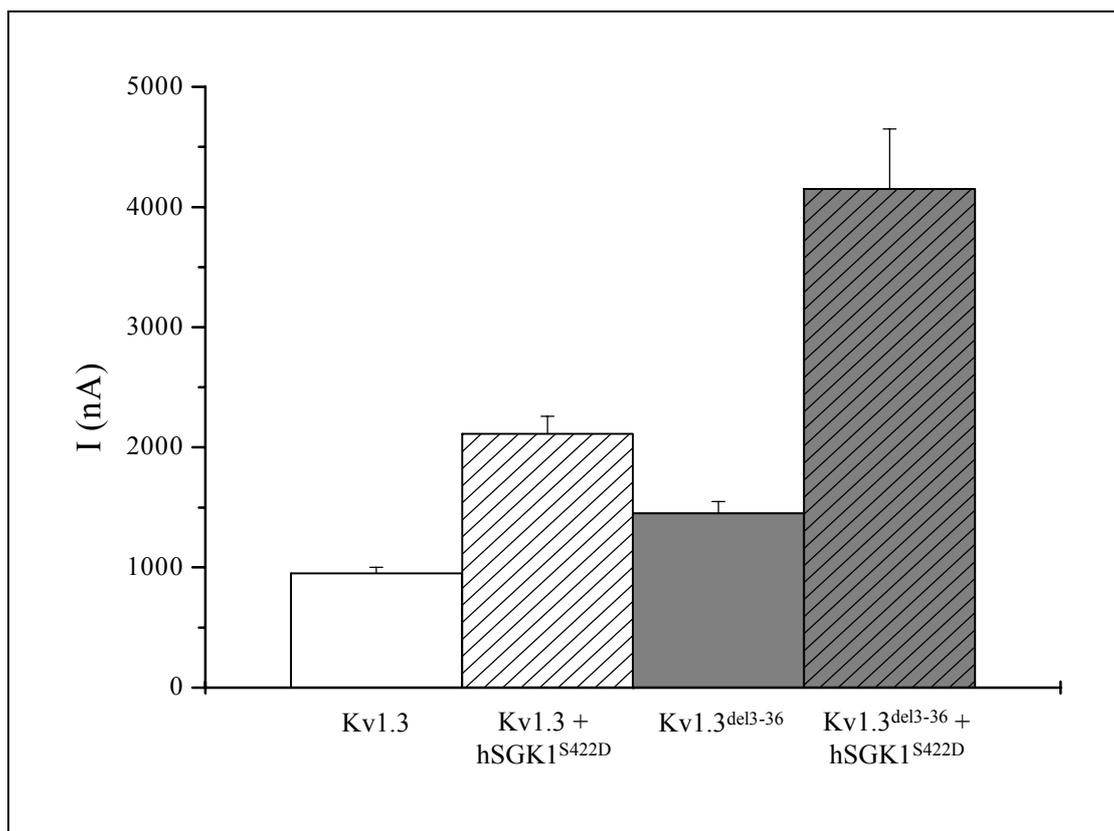


Abb. 41: Deletion der Aminosäuren 3 – 36 des N-Terminus: Vergleich mit Kv1.3-Wildtyp

	Kv1.3	Kv1.3 + hSGK1 ^{S422D}	Kv1.3 ^{del3-36}	Kv1.3 ^{del3-36} + hSGK1 ^{S422D}
I (nA)	950 ± 50	2110 ± 150	1450 ± 100	4150 ± 500
Zellzahl (n)	10	10	10	10

Tab. 24: Spannungsinduzierte Ströme von Kv1.3 und Kv1.3^{del3-36} unter hSGK1^{S422D}

3.3.8. Exozytosehemmung durch Brefeldin A (BFA)

Brefeldin A (BFA) ist ein Hemmstoff der Membranexozytose und verhindert den Einbau bereits synthetisierter Proteine in die Zellmembran [28].

Die erste Messung der Versuchsgruppen, bestehend aus Kv1.3 und Kv1.3 + hSGK1^{S422D}, erfolgte nach einer Expressionszeit von 24 Stunden. Dies entspricht 0 Stunden auf der Abszisse, da sich der angegebene Zeitverlauf auf den Zeitpunkt nach der ersten Messung bezieht. Direkt nach der zweiten Messung drei Stunden später wurde jeweils die Hälfte der Versuchsgruppen mit Brefeldin A (5 µM) behandelt. Der dritte Meßpunkt nach 24 Stunden zeigt die Wirkung von BFA. Die letzte Messung weitere 24 Stunden später erfolgte nach Wiederauswaschung von BFA.

Erstaunlicherweise zeigte die Koexpression von Kv1.3 und hSGK1^{S422D} selbst unter Exozytosehemmung durch Brefeldin A einen deutlichen Anstieg der gemessenen Ströme, wohingegen Zellen, die nur Kv1.3 exprimierten, unter BFA eine Reduktion der Kaliumströme erfuhren. Nach Wiederauswaschen von BFA erholten sich die Kv1.3 exprimierenden Zellen deutlich, die mit hSGK1^{S422D} injizierten Zellen hielten sich auf nahezu konstantem Niveau.

3. Versuche und Ergebnisse

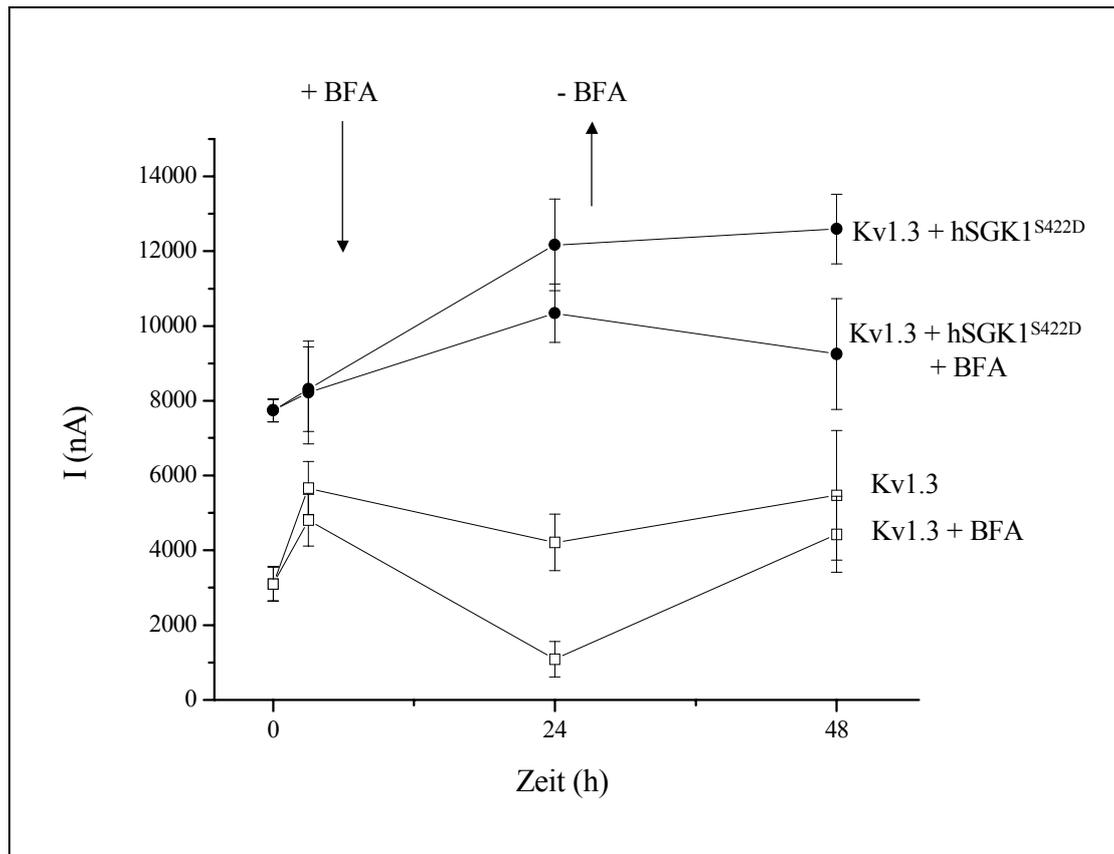


Abb. 42: Hemmung der Exozytose durch Brefeldin A (BFA, 5 μ M), BFA-Applikation nach 3 Stunden, Wiederauswaschung nach 24 Stunden

Zeit (h)	Kv1.3	Kv1.3 + BFA	Kv1.3 + hSGK1 ^{S422D}	Kv1.3 + hSGK1 ^{S422D} + BFA
0	3100 ± 457 n = 9	3100 ± 457 n = 9	7740 ± 300 n = 9	7740 ± 300 n = 9
3	5688 ± 711 n = 10	4808 ± 693 n = 10	8310 ± 1131 n = 10	8224 ± 1374 n = 10
24	4210 ± 755 n = 10	1090 ± 473 n = 10	12167 ± 1225 n = 9	10337 ± 779 n = 9
48	5474 ± 1730 n = 9	4430 ± 1020 n = 10	12590 ± 930 n = 10	9248 ± 1482 n = 9

Tab. 25: Spannungsinduzierte Kaliumströme unter BFA (nA)

3.3.9. Immunfluoreszenzfärbungen

Zur Differenzierung der Wirkung der aktiven Kinase hSGK1^{S422D} auf den Kv1.3 wurden unter der Annahme einer Beeinflussung der Oberflächenexpression Immunfluoreszenzfärbungen der in die Membran integrierten Kv1.3-Proteine durchgeführt. Die Membranen aller drei Versuchsgruppen zeigten eine deutliche Anfärbbarkeit, ein signifikanter Unterschied war jedoch nicht festzustellen.

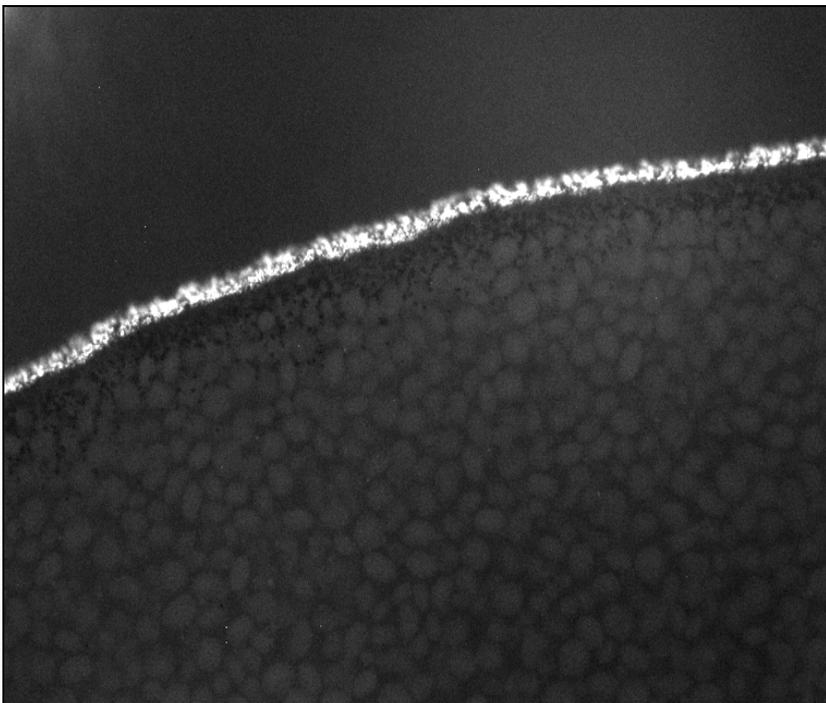


Abb. 43: Immunfluoreszenzfärbung Kv1.3

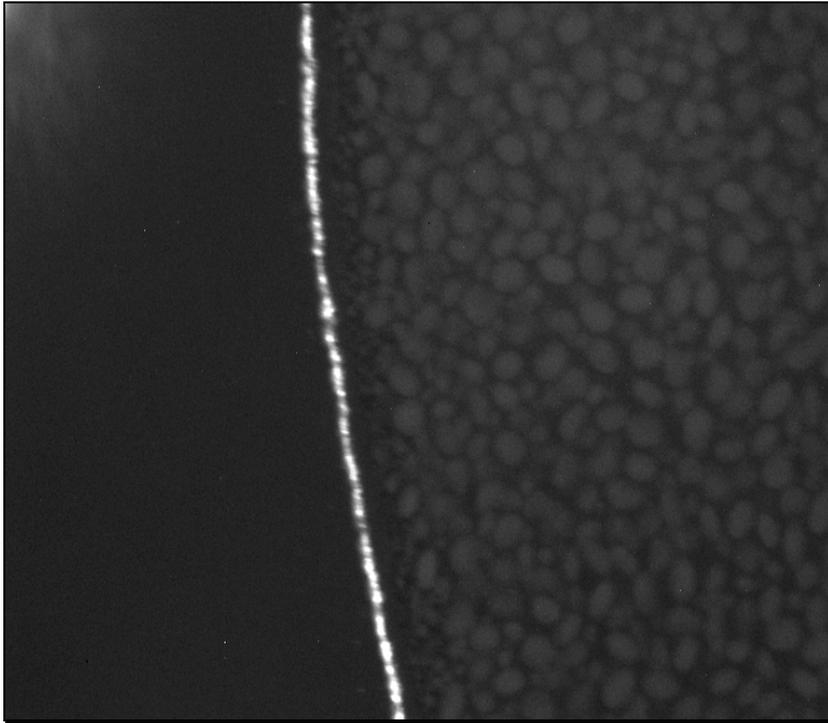


Abb. 44: Immunfluoreszenzfärbung Kv1.3 + hSGK1^{S422D}

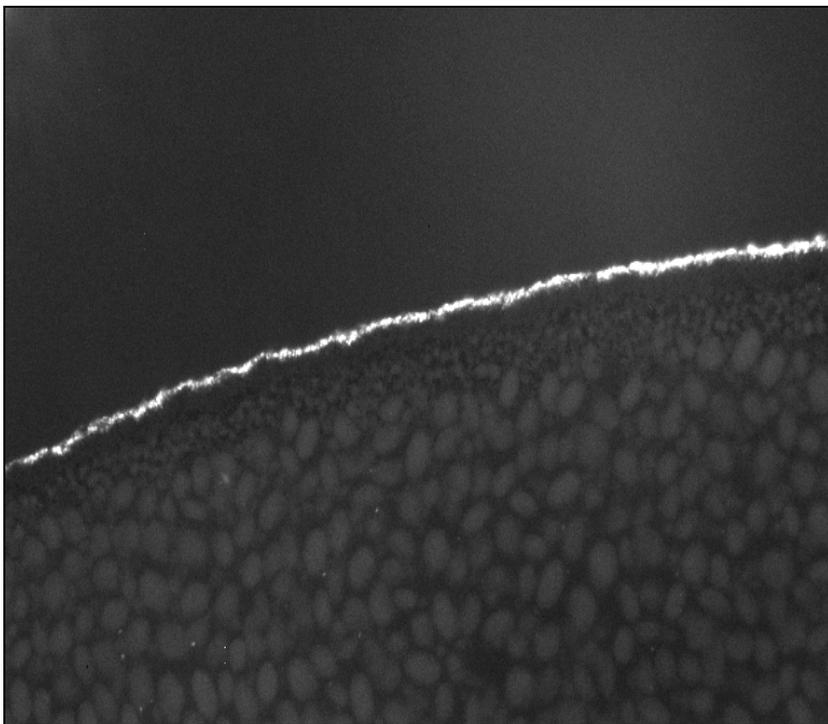


Abb. 45: Immunfluoreszenzfärbung Kv1.3 + hSGK1^{K127N}

4. Interpretation und Diskussion

4.1. Oozyten als Expressionssystem

Die Oozyten wiesen hinsichtlich ihrer Qualität zum Teil große Unterschiede auf. Diese war einerseits abhängig vom Entwicklungszustand und Alter der operierten Frösche, andererseits wiesen aber auch die entnommenen Oozyten desselben Frosches untereinander verschiedene Reifegrade auf. Einen weiteren Einfluß auf die Qualität der Oozyten hatte die Verdauung der sie umgebenden Bindegewebestrukturen mit Kollagenase im Rahmen der Oozytenpräparation. So traten nach Kollagenasebehandlung des öfteren Alterationen der Zellmembran auf. Oozyten mit sichtbaren Membranschäden wurden in einer ersten Selektion sofort aussortiert, dennoch bestand die Möglichkeit einer latenten Membran- oder Zellschädigung und deren Einfluß auf die Proteinexpression und basalen Ströme. Membranalterationen äußerten sich zumeist im Ausgangsmembranpotential und traten nach Anlegen einer Klemmspannung als überhöhte Leckströme in Erscheinung. Eine weitere Auslese nach optischen Gesichtspunkten wurde vor der cRNA-Injektion getroffen. Direkt vor den Messungen wurden die Oozyten zum dritten Mal selektiert. Es wurden, um allzu große Unterschiede auszuschließen, nur Oozyten gewertet, die bei der Messung von $\alpha\beta\gamma$ -ENaC in ND96 einen Amilorid-sensitiven Mindeststrom von 30 nA aufwiesen. Bei Kv1.3 wurde auf eine kanaltypische Inaktivierung nach Depolarisation auf -10 mV Wert gelegt.

Eine weitere potentielle Fehlerquelle stellte die cRNA-Injektion dar. Die cRNA-Qualität unterlag synthesebedingt geringen Schwankungen; sie wurde als Stamm-lösung aufbewahrt, aus der die zu injizierenden Konzentrationen verdünnt wurden. Meist mußte im Mikroliterbereich pipettiert werden, was eine geringfügige Pipettier-ungenauigkeit zur Folge hatte. Auch die Injektion mittels Injektomat wies Ungenauigkeiten bei einer Injektionsmenge von 50 nl cRNA auf. Dies dürfte bei Injektionen mit höheren cRNA-Konzentrationen die Expressionsrate kaum beeinflußt haben, bei geringeren cRNA-Konzentrationen von 5 ng/ μ l allerdings, wie sie bei Kv1.3 in Koexpression mit hSGK1^{S422D} verwendet wurden, waren durchaus Unterschiede in der Oberflächenexpression festzustellen. Um die Ungenauigkeiten zu minimieren wurde daher eine zweizeitige cRNA-Injektion (2.3.) vorgenommen.

Die Proteinexpression schien von mehreren Faktoren abhängig: sowohl Schwankungen der Temperatur während der Inkubation oder Unterschiede in der Zusammensetzung der Oozytenaufbewahrungslösung, als auch die Oozyten selbst hatten Einfluß auf die Expressionsrate.

Die Verwendung von *Xenopus laevis* Oozyten als Expressionssystem birgt Fehlerquellen in sich. Es ist anzunehmen, daß die Oozyten artenspezifische endogene Proteine enthalten, welche mit den zu exprimierenden Kanälen auf unbekannte Art und Weise interagieren und somit zu Fehlinterpretationen der Versuchsergebnisse führen können. Außerdem stellt sich aufgrund der Mischung von RNA der verschiedenen Spezies und deren Interaktion die Frage der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Säugerzellen.

4.2. Lösungen

Die genaue Zusammensetzung der Aufbewahrungs- und Testlösungen wurde mit ionenselektiven Elektroden für Kalium, Chlorid und Calcium überprüft, Schwankungen über 1 % wurden nicht toleriert. Auch die Gesamtmolarität und der pH-Wert der Lösungen wurden regelmäßig kontrolliert. Verunreinigungen der Testsubstanzen durch den Herstellungsprozeß konnten nicht ausgeschlossen werden.

Die hergestellten Mischungen wurden z.T. als Stammlösungen aufbewahrt. Die Chemikalien konnten sich jedoch unter dem Einfluß von Temperatur oder Licht verändern, weshalb die Stammlösungen und Testsubstanzen regelmäßig frisch angesetzt und vor direkter Lichteinstrahlung geschützt im Kühl- oder Gefrierschrank aufbewahrt wurden.

4.3. Geräte

Der gesamte Meßaufbau war durch einen Faradayschen Käfig vor möglichen externen elektrischen Störeinflüssen geschützt. Die Meßelektroden mit AgCl₂-Beschichtung wurden im Laufe der Versuche abgenutzt, was zu einer Erhöhung des Elektroden-

widerstands führte. Auch eine Verstopfung der Glaskapillarenspitze konnte den Widerstand erhöhen. Aus diesem Grunde wurde vor jedem Experiment der Elektrodenwiderstand in der Badlösung kontrolliert. Dieser hatte zwischen Werten von 0,3 und 3,0 m Ω zu liegen. Bei zu großer Abweichung wurden die Me β elektroden neu chloridiert und ein Wechsel der Glaskapillaren vorgenommen.

4.4. ENaC und hSGK1

4.4.1. Wirkung der hSGK1 auf den ENaC

Die Koexpression von hSGK1 und ENaC in *Xenopus* Oozyten zeigte, da β die Kinase den Epithelialen Natriumkanal um den Faktor f \ddot{u} nf stimulierte. Im zeitlichen Verlauf wurde die Steigerung des Natriumstroms durch die hSGK1 bereits am ersten Expressionstag deutlich. Die aktive Kinase stimulierte den Natriumstrom \ddot{u} ber den gesamten Verlauf zu deutlich h \ddot{o} heren Werten im Vergleich zu den Kontrollgruppen (ENaC, ENaC+hSGK1^{K127R}). Allerdings relativierte sich der Abstand zu den Kontrollzellen (ENaC) ab dem vierten Tage betr \ddot{a} chtlich. Die Natriumstr \ddot{o} me der Kontrollgruppe nahmen fortan stark zu, mit einem Kurvenverlauf, der jenem der Stimulation \ddot{a} hnelte. Die verz \ddot{o} gert einsetzende Zunahme der Natriumstr \ddot{o} me k \ddot{o} nnte die $\alpha\beta\gamma$ -ENaC-Expression ohne Kinaseeinflu β widerspiegeln, denkbar ist aber auch der zunehmende Einflu β einer endogenen Kinase, welche sich ab dem vierten Tag bemerkbar machen k \ddot{o} nnte. Die Negativkontrolle lieferte \ddot{u} ber den gesamten zeitlichen Verlauf relativ konstant bleibende, aber sehr geringe Str \ddot{o} me. Die inaktive Kinase hemmte offensichtlich die Aktivit \ddot{a} t oder den Einbau des $\alpha\beta\gamma$ -ENaC in die Membran. Dies ist wahrscheinlich in einem dominant negativen Einflu β der inaktiven \ddot{u} ber die endogen aktivierte Kinase begr \ddot{u} ndet [117].

Der Wirkungsmechanismus der hSGK1 auf den ENaC ist nicht vollst \ddot{a} ndig gekl \ddot{a} rt. Als Serin-Threonin-Kinase ist die hSGK1 in der Lage, andere Proteine zu phosphorylieren. Bislang konnte jedoch keine direkte Wirkung der hSGK1 auf den ENaC nachgewiesen werden [18]. Grunds \ddot{a} tzlich sind f \ddot{u} r die Stimulation des Natriumstroms durch die hSGK1 folgende Erkl \ddot{a} rungsmodelle denkbar: \ddot{u} ber einen direkten Angriff am

Natriumkanal könnte die Kinase sowohl die Einzelkanalkinetik und Öffnungswahrscheinlichkeit als auch das Trafficking des Kanalproteins und somit die Oberflächenexpression beeinflussen. Die genannten Mechanismen könnten jedoch auch indirekt über die Phosphorylierung anderer Regulatorproteine durch die hSGK1 zustande kommen [4, 18].

Die Ser-Thr-Kinase hSGK1 war nur in der Lage die Koexpressionen von $\alpha\gamma$ -ENaC und $\alpha\beta\gamma$ -ENaC zu stimulieren, bei α -ENaC oder $\alpha\beta$ -ENaC war kein Effekt festzustellen. Es ist möglich, daß bei den Expressionen von α -ENaC oder $\alpha\beta$ -ENaC die gemessenen Natriumströme zu gering waren, um eine Stimulation durch die hSGK1 beobachten zu können. Gleichwohl scheint aber die Anwesenheit der γ -Untereinheit die Wirkung der hSGK1 zu begünstigen. Es ist bekannt, daß Aldosteron, Insulin, PKA und PKC die Aktivität des ENaC durch Phosphorylierung der β - und γ -Untereinheiten an Ser- und Thr-Residuen der C-terminalen Region modulieren [3, 4, 98]. Die Phosphorylierung der C-Termini beeinflußt die Interaktion mit Regulatorproteinen und endozytotischer Transportmaschinerie sowie die kinetischen Eigenschaften des ENaC [98]. Die hSGK1 jedoch, obwohl ein Mediator der Aldosteronwirkung, entfaltet ihre Wirkung wahrscheinlich nicht über eine Änderung des Phosphorylierungszustands des β - und γ -ENaC [98, 18]. Alvarez de la Rosa et al. zeigten, daß selbst Kanäle ohne β - und γ -Untereinheit durch die hSGK1 stimuliert werden [3]. Es ist daher anzunehmen, daß an der Wirkung der hSGK1 weitere Regulatorproteine über Phosphorylierung durch die Kinase beteiligt sind [3]. Möglicherweise existieren endogene Oozytenproteine, die ein Ziel der hSGK1 darstellen und über die Phosphorylierung durch die hSGK1 aktiviert werden. Diese könnten dann ihrerseits die ENaC-Aktivität, evtl. über Phosphorylierung der β - und γ -Untereinheiten, beeinflussen.

Das Ubiquitinationsprotein Nedd4-2 ist ein solches Regulatorprotein, das maßgeblich die Oberflächenexpression des ENaC determiniert [101]. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß in den als Expressionssystem verwendeten Oozyten der Einfluß eines endogenen Nedd4-2-ähnlichen Proteins bei der Kanalexpression zum Tragen kam. Nedd4-2 enthält multiple WW-Domänen, die mit den PY-Motiven der C-Termini des β - und γ -ENaC interagieren. Das Ubiquitinationsprotein reduziert in nicht phosphoryliertem Zustand die Expressionsdichte des ENaC indem es die Endozytose des gesamten Kanalkomplexes mit folgendem lysosomalem Abbau steigert [101, 104]. Die

Phosphorylierung von Nedd4-2 an Ser422 und Ser338 (WW-Domänen) durch die hSGK1 reduziert den hemmenden Einfluß des Suppressorproteins. Dies führt letztlich zu einer gesteigerten Expressionsdichte des ENaC [26, 55, 101]. Die Anwesenheit von β - oder γ -ENaC könnte daher notwendig sein, um die Stimulation des Natriumstroms via ENaC durch die hSGK1 beobachten zu können.

Eine Erklärung für die stimulierten Natriumströme unter hSGK1 ist somit sicherlich in der Erhöhung der Expressionsdichte des ENaC in der Plasmamembran zu suchen, was auch immunozytochemisch in Oozyten bestätigt wurde [71]. Zusätzlich zur Hemmung der Membranendozytose durch Nedd4-2 gibt es Hinweise, daß durch die hSGK1 auch bereits in der Membran befindliche ruhende Natriumkanäle rekrutiert werden [3, 4]. Firsov et al. beschrieben, daß tatsächlich eine große Anzahl der in der Membran von Oozyten befindlichen Kanäle in inaktivem Zustand vorliegen [33, 35]. Durch diesen Prozeß könnte die Expressionsdichte zusätzlich verstärkt werden.

4.4.2. Pharmakologische Hemmung

An der Amiloridbindung sind α -, β - und γ -Untereinheit des heterotetrameren ENaC beteiligt [91]. Die Amilorid-Konzentration zur halbmaximalen Hemmung (IC_{50}) des ENaC liegt typischerweise unter $0,1\mu\text{mol/l}$ [9, 40, 99]. Für Amilorid und dessen Analoga gilt folgendes Sensitivitätsprofil: Phenamil \sim Benzamil $>$ Amilorid \gg Ethylisopropylamilorid (EIPA) [9].

Die Kinase hSGK1 führte beim ENaC zu einer deutlichen Zunahme des IC_{50} -Wertes für Amilorid um den Faktor zwei, während bei der Inhibition durch EIPA eine fünf-fache Abnahme des IC_{50} -Wertes zu beobachten war. Demnach wurden unter dem Einfluß der hSGK1 die Affinitäten von Amilorid und EIPA entgegengesetzt geregelt. Bei Amilorid war eine Reduktion der Sensitivität um den Faktor zwei, bei EIPA hingegen eine Steigerung um das Fünffache zu beobachten.

Einflußfaktoren auf die Amiloridbindung wie transmembranäre Spannung, extrazellulärer pH-Wert und die extrazelluläre Natriumkonzentration [40, 91] wurden bei den Messungen konstant gehalten und dürfen daher vernachlässigt werden.

Die Ergebnisse passen gut zu den Beobachtungen anderer Forschungsgruppen, die feststellten, daß die Sensitivität des ENaC, welcher auch in den Hepatozyten von Ratten im Rahmen der regulatorischen Volumenzunahme exprimiert wird, ein verändertes Profil gegenüber Amilorid und dessen Analogon aufwies: die Affinität von EIPA war erhöht, wohingegen die Affinität von Amilorid zum ENaC vermindert schien [9]. Da die hSGK1 in nahezu allen Geweben vorkommt und die höchsten Expressionslevel in Pankreas, Leber und Herz gefunden wurden [119], könnte hier ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Stimulation des ENaC durch die hSGK1 und dem veränderten Sensitivitätsprofil bestehen [9].

4.4.3. Sensitivität gegenüber Natrium

Die Amiloridbindungsstelle steht in enger räumlicher Beziehung zu Kanalpore [6, 40, 59, 99]. Aufgrund der Sensitivitätsänderung der ENaC-Inhibitoren Amilorid und EIPA unter hSGK1 wurde ein Einfluß der Kinase auf die Porenregion des Natriumkanals vermutet. Anhand der Natriumsensitivität sollten die biophysikalischen Eigenschaften des ENaC bei Koexpression mit hSGK1 weiter charakterisiert werden.

Die Messungen lieferten jedoch keinen Hinweis auf eine Beeinflussung der Natriumsensitivität durch die hSGK1. Die biophysikalischen Eigenschaften des ENaC schienen durch die Kinase nicht verändert zu werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen, die einen Effekt der Kinase auf die Offenheitswahrscheinlichkeit oder die Einzelkanalleitfähigkeit ausschließen [3]. Auch unter Stimulation durch die hSGK1 weist der ENaC das bekannte Selektivitätsprofil auf: $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ \gg \text{K}^+ \gg \text{Cs}^+$ [81]. Gesteigerte Ströme unter hSGK1 lassen sich auch bei anderen Kationen wie Li^+ oder Cs^+ beobachten, wobei die Sensitivität aber unbeeinflusst bleibt [117].

4.4.4. Interaktion mit der Proteinkinase A

Aldosteron und ADH verhalten sich synergistisch in ihrer Wirkung auf den Epithelialen Natriumkanal. Beide Hormone steigern die Expression aktiver Kanäle in der Membran [40, 101, 102]. ADH führt über die Aktivierung der Adenylatzyklase zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Der intrazelluläre second messenger cAMP stimuliert die PKA [40, 99]. Wie in Abb. 7 zu sehen, laufen die intrazellulären Signalkaskaden von Aldosteron und ADH wahrscheinlich völlig unabhängig voneinander ab [112].

Die Experimente sollten eine Interaktion zwischen der hSGK1, als Mediator der Aldosteronwirkung, und der PKA in der Wirkung auf den ENaC detektieren. IBMX ist ein Inhibitor der Phosphodiesterase und diente als Stimulans für die PKA [40]. Es führt über die Hemmung des Abbaus von cAMP zu einer gesteigerten intrazellulären Konzentration des second messenger mit nachfolgender Aktivierung der PKA [40, 99]. Nach Inkubation mit IBMX über 24 Stunden waren bei den Kontrollzellen doppelt so hohe Natriumströme zu messen. Im Vergleich dazu war der durch die hSGK1 bereits stimulierte Natriumstrom durch IBMX nur noch geringfügig zu steigern.

Wie bereits erwähnt steigern Aldosteron und PKA über Phosphorylierung der β - und γ -Untereinheiten die ENaC-Funktion [97]. Zusätzlich scheint die Beeinflussung weiterer Regulatorproteine durch die PKA eine Rolle zu spielen [6, 40]. Die C-Termini der ENaC-Untereinheiten enthalten Sequenzen, welche die Internalisation und Expressionsdichte des Natriumkanals regulieren [40]. Dies geschieht nicht zuletzt über die Interaktion mit dem Ubiquitinationsprotein Nedd4-2 [55, 104]. Die Wirkungsmechanismen von hSGK1 und PKA scheinen sich in Bezug auf die Steigerung des Natriumstroms zu gleichen. Die PKA führt ebenso wie die hSGK1 über die Rekrutierung inaktiver Kanäle zu einer Steigerung der ENaC-Expressionsdichte, ohne die Öffnungswahrscheinlichkeit zu beeinflussen [6, 40, 98, 99, 102].

Möglicherweise wirken hSGK1 und PKA über Phosphorylierung derselben Loci an ENaC-Untereinheiten oder Regulatorproteinen wie dem Nedd4-2. Die Annahme eines agonistischen Effekts der beiden Kinasen könnte die geringe additive Wirkung des Natriumstroms der Koexpression aus ENaC und hSGK1 auf IBMX erklären. Vermutlich lag bereits eine maximale Stimulation des ENaC durch die hSGK1 vor,

sodaß der Effekt durch IBMX nicht mehr zum Tragen kommen konnte. Die Koexpression mit der inaktiven Kinase zeigte relativ gesehen die stärkste Stimulation auf IBMX, möglicherweise aufgrund der stark supprimierenden Wirkung von hSGK1^{K127R}.

Außerdem sollte berücksichtigt werden, daß die hSGK1 Teil eines komplexen Regulationsnetzwerkes ist. Zusätzlich zur Regulation über die Genexpression, wird die Aktivität der hSGK1 durch mehrere Proteinkinasen moduliert. Zu diesen gehört neben PDK1 und PDK2 auch die PKA [86]. Inwieweit dies bei den Versuchen eine Rolle gespielt haben könnte, ist schwer zu beurteilen.

4.5. Kaliumkanäle und hSGK1

Aufgrund der Austauschfunktion der Na⁺-K⁺-ATPase stellt ein zellulärer Kaliumefflux eine notwendige Voraussetzung für den transepithelialen Natriumtransport dar. Aldosteron stimuliert im ASDN nicht nur die Natriumaufnahme sondern auch die Kaliumsekretion [112]. Es blieb daher zu prüfen, ob die hSGK1 als Mediator der Aldosteronwirkung neben der Stimulation des ENaC auch Einfluß auf die Aktivität von renal exprimierten Kaliumkanälen nimmt.

Mehrere in Frage kommende Kaliumkanäle wurden einem Screening auf Stimulation durch die hSGK1 unterzogen. Die Messungen ergaben beim I_{Ks}-Kanal (KCNE1 + KCNQ1) und bei Kv1.4 zwar eine Zunahme des Kaliumstroms durch die hSGK1, diese erwies sich jedoch bei der Analyse mittels Student-t-Test als nicht signifikant. Bei den Kanälen Kir2, Kv1.2 und Kv1.5 war kein Effekt durch die hSGK1 festzustellen. Als einziger der untersuchten Kaliumkanäle zeigte der Shaker-Kanal Kv1.3 eine deutliche Stimulation auf die hSGK1. Im Vergleich zur Negativkontrolle war eine ca. dreifache Zunahme der spannungsinduzierten Kaliumströme zu beobachten. Die weiteren Untersuchungen sollten Aufschluß über die Mechanismen der Stimulation des Kv1.3 geben und zeigen, ob Parallelen zur Aktivierung des ENaC bestehen.

4.5.1. Stimulation des Kv1.3 durch die hSGK1-Mutante hSGK1^{S422D}

Bei den folgenden Experimenten wurde die veränderte aktive Kinase hSGK1^{S422D} eingesetzt. Die Mutation von Serin (Ser) an Position 422 der hSGK1 zu Aspartat (Asp) führt zu einer deutlichen Zunahme der Kinaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp. Aufgrund der negativen Ladung ist Asp422 bei der Mutante in der Lage, die Aktivierung der Wildtyp-Kinase durch Phosphorylierung an Ser422 zu imitieren. Die Mutante hSGK1^{S422D} weist hierdurch eine ca. 10-fach höhere Aktivität als deren Wildtyp auf [61, 62]. Tatsächlich zeigte die Koexpression von Kv1.3 und hSGK1^{S422D} durchschnittlich 1,5-fach höhere Ströme als jene von Kv1.3 und hSGK1.

Verglichen mit den Kontrollzellen (Kv1.3) waren unter hSGK1^{S422D} vier- bis fünffach höhere Kaliumströme zu messen. Im Gegensatz zu den Beobachtungen beim Epithelialen Natriumkanal war bei der als Negativkontrolle eingesetzten dominant negativen Kinase hSGK1^{K127N} keine Suppression festzustellen. Die Regulation des Kv1.3 funktioniert über die Interaktion mehrerer, sich zum Teil auch gegenseitig hemmender Kinasen [19]. Möglicherweise verhilft die inaktive Kinase hSGK1^{K127N} in dem komplexen Regulationssystem den stimulierenden Einflüssen zu einem leichten Übergewicht, ohne den Kv1.3 direkt zu beeinflussen. Im zeitlichen Verlauf lagen die Ströme der Negativkontrolle tendenziell über jenen der Kontrollgruppe. Beide hielten sich über die Zeit auf einem nahezu konstanten Niveau. Ein signifikanter Unterschied war jedoch nicht festzustellen. Die Koexpression von Kv1.3 und hSGK1^{S422D} erreichte zwei Tage nach cRNA-Injektion ein Maximum und blieb dann relativ konstant mit deutlich höheren Werten als die beiden Kontrollen.

Bei den Versuchen wurden keine Einzelkanalmessungen durchgeführt, sondern immer der Gesamtstrom über die Membran gemessen. Da die Gesamtleitfähigkeit (G) einer Zelle definiert ist durch

$$G = P_o * g * N$$

konnte die Erhöhung der Ströme bei Stimulation durch die hSGK1^{S422D} auf mehrere Mechanismen zurückzuführen sein: eine erhöhte Offenheitswahrscheinlichkeit (P_o), eine Zunahme der Einzelkanalleitfähigkeit (g) oder eine höhere Expressionsdichte der funktionellen Kanalproteine an der Zelloberfläche (N) [93]. Die folgenden Experimente sollten Hinweise auf den Mechanismus der Kanalstimulation liefern.

4.5.2. Spannungskinetik

Proteinkinasen wie die PKC führen über die Verschiebung der Spannungsabhängigkeit zur Kanalaktivierung bei negativeren Potentialen und somit zu einer Aktivitätssteigerung des Kv1.3. Dieser Shift wird besonders bei physiologisch relevanten Membranpotentialen beobachtet [15, 19, 53].

Die hSGK1^{S422D} schien keinen Einfluß auf die Spannungssensitivität des Kv1.3 zu nehmen, da sich bei den drei Versuchsgruppen im Hinblick auf die Spannungskinetik keinerlei signifikante Unterschiede ergaben. Die Kv1.3-Aktivierungsschwelle entsprach den in der Literatur berichteten Werten (-25 mV) [128]. Sie lag bei allen drei Versuchsgruppen um -30 mV. Ab dieser Spannung war ein Kaliumauswärtsstrom zu beobachten, der den charakteristischen Verlauf eines langsam inaktivierenden Kaliumkanals annahm. Die maximale Aktivierung des Kv1.3 war ab einer Depolarisation auf ca. +20 mV erreicht.

Eine Verschiebung der Spannungskurve zu negativeren Werten, d.h. eine frühzeitigere Aktivierbarkeit des Kv1.3 war nicht zu beobachten. Daher kann ein Einfluß der hSGK1^{S422D} auf die Spannungskinetik des Kv1.3 wahrscheinlich ausgeschlossen werden.

4.5.3. Inhibition durch Margatoxin und Tetraethylammonium

Margatoxin (MTX) ist ein in Tier- und Pflanzenwelt vorkommendes Peptidtoxin. Es ist ein hochpotentes Gift, das sehr spezifisch die Kaliumkanäle Kv1.2 und Kv1.3 blockiert. Bereits bei einer MTX-Konzentration unter 1 nM ist aufgrund dessen hoher Affinität eine ausgeprägte Inhibition der beiden genannten Kaliumkanäle zu beobachten [7, 39, 47, 74]. Das anorganische Kation TEA hat hingegen einen eher unspezifisch hemmenden Effekt auf eine Vielzahl der verschiedenen Kaliumkanal-subtypen. Es sind für eine entsprechende Blockade der Kaliumkanäle deutlich höhere Konzentrationen nötig. Diese liegen bei vielen Kv-Kanälen im Bereich von mehreren mM [13].

Die Messungen zur MTX- oder TEA-Kinetik ließen bei den drei Versuchsgruppen nahezu keine Unterschiede erkennen. Die IC_{50} -Werte der beiden Kaliumkanalblocker entsprachen den in der Literatur angegebenen Werten und zeigten sich unter hSGK1^{S422D} unbeeinflusst. Zur Hemmung des Kv1.3 durch TEA waren, wie zu erwarten, deutlich höhere Konzentrationen nötig [39, 47]. Auffallend war jedoch, daß eine Maximalhemmung, wie bei Inhibition durch Margatoxin zu beobachten, auch bei Konzentrationen von 100 mM TEA nicht zu erreichen war. Dies ist wahrscheinlich auf die deutlich geringere Affinität von TEA zum Kv1.3 zurückzuführen [13].

4.5.4. Hemmung der Proteinkinase C durch Chelerythrin

Der Shaker-Kanal Kv1.3 unterliegt einer sehr komplexen posttranslationalen Modulation [20, 49]. Auf dem Kanalprotein befinden sich verschiedene Loci zur Phosphorylierung durch die unterschiedlichen Proteinkinasen wie Ser-Thr-Kinasen, PKA und PKC sowie die Calmodulin-abhängige Kinase (CaMKII) [20]. Die Kinasen beeinflussen sich gegenseitig in ihrem Effekt auf den Kv1.3. Bei der Aktivierung des Kv1.3 spielt die PKC eine entscheidende Rolle, denn sie fungiert als Hauptaktivator (“master switch“). Ohne Aktivierung durch die PKC weist der Kanal eine stark reduzierte Aktivität auf [19, 20]. Die Proteinkinase C gehört auch zu den Serin-Threonin-Kinasen und weist in ihrer katalytischen Domäne eine große Sequenzhomologie (48 % Übereinstimmung) zur hSGK1 auf [119].

Bei den Experimenten zur Interaktion zwischen hSGK1^{S422D} und Proteinkinase C wurde Chelerythrin als Kinasehemmstoff eingesetzt. Chelerythrin wirkt relativ spezifisch auf die PKC, kann jedoch auch die hSGK1^{S422D} inhibieren [25].

Die Inkubation mit Chelerythrin führte bei Kv1.3 + hSGK1^{S422D} und der Kontrollgruppe zu einem beträchtlichen Rückgang der Kaliumströme. So konnten nach Behandlung mit Chelerythrin nur noch 50 – 60 % der Maximalströme gemessen werden. Die Ströme der Negativkontrolle wurden hingegen kaum beeinflusst.

Die Grundaktivierung des Kv1.3 durch die Proteinkinase C scheint für die Kanalaktivität eine entscheidende Rolle zu spielen. Ohne diese Basisstimulation (“master switch“) ist die Aktivierbarkeit des Shaker-Kanals durch die hSGK1^{S422D} deutlich

eingeschränkt. Wahrscheinlich greift auch die hSGK1^{S422D} in das komplexe Regulationssystem der Kinasen ein, welche den Kv1.3 aktivieren. Es ist anzunehmen, daß die hSGK1^{S422D} eine zur PKC additiv stimulatorische Wirkung hat, welche jedoch stark von der Basisstimulation des Kv1.3 durch die Proteinkinase C abhängig ist, weshalb eine Steigerung des Kaliumstroms durch die hSGK1^{S422D} nur unter PKC-Stimulation zu beobachten war. Eine gegenseitige Hemmung von hSGK1^{S422D} und PKC, wie sie bei Interaktion von PKC und PKA vorkommt [19] und evtl. aufgrund der ähnlichen Struktur der beiden Kinasen zu vermuten wäre, kann wohl ausgeschlossen werden. Es bleibt zu überprüfen, ob die Aktivität der PKC unbedingte Voraussetzung für eine Stimulation durch die hSGK1^{S422D} darstellt.

Auch hier ist unklar, wie die Wirkungen auf den Kaliumstrom zustande kommen. Phosphorylierungsvorgänge könnten direkt das Kanalprotein selbst betreffen oder aber über die Modulation akzessorischer Moleküle, wie Kv- β -Untereinheiten, Ankerproteinen oder dem Zytoskelett vonstatten gehen [20].

4.5.5. Inaktivierung des Kv1.3

Die Inaktivierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle hat großen Einfluß auf die Kanalleitfähigkeit, da über die Öffnungszeit der Kaliumstrom maßgeblich determiniert wird [19]. Grundsätzlich sind drei Inaktivierungsmechanismen für den Kv1.3 bekannt: C-Typ-Inaktivierung und N-Typ-Inaktivierung betreffen direkt das Kanalprotein, zusätzlich ist eine Inaktivierung über assoziierte β -Untereinheiten (1.6.3.) möglich [20].

Beim Vergleich der Restströme des Kv1.3 gegen Ende der Depolarisationsphasen war festzustellen, daß diese unter Stimulation durch hSGK1^{S422D} in Relation zu den Maximalströmen (I_{\min} / I_{\max}) deutlich höher lagen, als jene der Kontroll- und Negativkontrollgruppe. Auch die Inaktivierungskonstanten (τ) für die Koexpression von Kv1.3 und hSGK1^{S422D} betragen den 1,5-fachen Wert bezogen auf jene der Kontroll- und Negativkontrollgruppe. Demzufolge bewirkte die Stimulation durch die hSGK1^{S422D} offensichtlich eine Inaktivierungsverzögerung des Kv1.3 um den Faktor 1,5.

Die verzögerte Inaktivierung führt möglicherweise zu einer Zunahme des “open window current“ und würde hiermit zumindest teilweise die beobachtete Erhöhung der Gesamtleitfähigkeit bei Koexpression von Kv1.3 und hSGK1^{S422D} erklären. Der genaue Mechanismus der Inaktivierungsverzögerung, und welcher Inaktivierungstyp beeinflusst wird, bleibt momentan noch unklar.

Es ist jedoch bekannt, daß die Effekte vieler Kinasen und Phosphatasen sich offenbar auf eine Änderung des Phosphorylierungszustands strukturell assoziierter Proteine, z.B. β -Untereinheiten, zurückführen lassen. Diese modulieren die Eigenschaften der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle besonders über die Beeinflussung der Inaktivierungskinetik [20, 53, 78]. Es ist nicht auszuschließen, daß bei den Experimenten endogene Oozytenproteine in die Regulation des Kv1.3 involviert waren und möglicherweise die Interaktion zwischen Kanal und Kinase maßgeblich mitbestimmt haben.

4.5.6. Deletion am N-Terminus

Die intrazellulär lokalisierten N-Termini der Shaker-Proteine enthalten Abschnitte, die entscheidend an der Regulation der Kanalfunktion beteiligt sind [93]. Die N-terminale Region determiniert die Inaktivierungsgeschwindigkeit (N-Typ-Inaktivierung) und reguliert die Zusammensetzung der Kanaluntereinheiten zum voll funktionsfähigen Kanal sowie die Bildung von Heteromultimeren (T₁-Domäne, AS 42 – 185). Außerdem moduliert sie die Expressionsdichte der Kanalproteine an der Membranoberfläche (T₀-Domäne, AS 3-39) [17, 93, 129, 130].

Die Deletion der T₀-Domäne mit den Aminosäuren 3 – 39 des N-Terminus entspricht einer “gain-of-function“-Mutation, welche bei Kanalexpression in *Xenopus*-Oozyten zu einer 7- bis 13-fachen Zunahme des Kv1.3-Stromes im Vergleich zum Wildtyp führt. Der Effekt ist beinahe ausschließlich auf eine massive Zunahme der Expressionsdichte der Kanalproteine in der Membran zurückzuführen. Die biophysikalischen Eigenschaften des Kv1.3 bleiben nahezu unbeeinflusst [93, 130].

Da außer der Inaktivierungsgeschwindigkeit die Kanaleigenschaften unter hSGK1^{S422D} nahezu unbeeinflusst blieben und die Verzögerung der Inaktivierung als alleinige

Ursache für die Stimulation der Kaliumströme nicht auszureichen schien, lag ein Einfluß der Kinase auf die Expressionsdichte des Kv1.3 nahe. Hierzu sollte die Interaktion zwischen hSGK1^{S422D} und N-Terminus näher analysiert werden. In den Experimenten wurde eine Kv1.3-Mutante eingesetzt, welche eine Deletion der Aminosäuren 3 – 36 (Kv1.3^{del3-36}) des N-Terminus aufwies. Diese Veränderung dürfte der zuvor beschriebenen Deletion der T₀-Domäne des Shaker-Kanals entsprechen.

Wie zu erwarten lieferte die Mutante deutliche höhere Kaliumströme als der Wildtyp, wenngleich eine Zunahme um das 7- bis 13-fache nicht festzustellen war. Die Kaliumströme waren lediglich um das doppelte gesteigert. Der Wildtyp zeigte unter Koexpression mit der aktiven Kinase hSGK1^{S422D} eine ca. 2,2-fache Steigerung der Kaliumströme, die Mutante hingegen eine ca. 2,9-fache Stimulation. Statistisch waren diese Differenzen jedoch nicht signifikant. Die Wirkung der Kinase war folglich auch in Abwesenheit des N-Terminus zu beobachten. Aufgrund der relativ gleichwertigen Stimulation von Wildtyp und Mutante ist davon auszugehen, daß die Stimulation des Kv1.3 durch die hSGK1^{S422D} unabhängig von der N-terminalen Region funktioniert oder zumindest über weitere differente Regulationsmechanismen abläuft. Ein Einfluß der hSGK1^{S422D} auf die Oberflächenexpression des Shaker-Kanals kann hierdurch aber nicht ausgeschlossen werden, da die Expressionsdichte durch eine Vielzahl weiterer Faktoren bestimmt wird [93].

4.5.7. Exozytosehemmung durch Brefeldin A

Unter physiologischen Bedingungen findet in allen Zellen ein stetiger Membranaustausch statt. Ausgehend vom Golgi-Apparat werden anterograd Vesikel in die Zellmembran transportiert und mit ihr fusioniert [28]. Auf diese Weise wird der Einbau ständig neu synthetisierter Proteine in die Membran gewährleistet. Diesem Prozeß steht ein retrograder Membranfluß, d.h. die Membrandozytose mit folgendem Proteinabbau gegenüber. Anterograde und retrograde Membranbewegungen stehen normalerweise in einem Gleichgewicht [28].

Brefeldin A (BFA), ein Stoffwechsel-Metabolit bei Pilzen (*Penicillium brefeldianum*), hemmt reversibel den anterograden Transport von Vesikeln in die Membran, ohne

dabei den retrograden Membranfluß (Membranendozytose) zu beeinflussen. Es werden alle Exozytoseprozesse unterdrückt. Die Folge ist eine langsame Depletion der Membran an Proteinen aller Art [28].

Unter Exposition mit BFA fielen die spannungsinduzierten Ströme der Kontrollgruppe (Kv1.3) deutlich ab. Der Effekt zeigte sich nach Auswaschung von BFA als nahezu vollständig reversibel, sodaß sich die Ströme wieder erholten und den Ausgangswerten näherten. Nach Wiederauswaschung von BFA war kein signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Zellen mehr meßbar. Ein Abfall der spannungsinduzierten Ströme unter BFA war bei der Koexpression von Kv1.3 und hSGK1 nicht zu beobachten. Allerdings blieben die gemessenen Ströme auch deutlich hinter jenen der parallelen Gruppe ohne BFA zurück, die im gleichen Zeitraum einen Anstieg der spannungsinduzierten Ströme aufwiesen. Die BFA-Wirkung schien nach Wiederauswaschung bei der Koexpression von ENaC und hSGK1^{S422D} nicht vollständig reversibel. Die Analyse der Ströme unbehandelter und mit BFA behandelter Oozyten per Student-t-Test lieferte jedoch keinen signifikanten Unterschied, sodaß auch hier wahrscheinlich von einer Reversibilität der BFA-Wirkung ausgegangen werden kann.

Die Ergebnisse legen einen positiven Effekt der hSGK1^{S422D} auf die Oberflächenexpression des Kv1.3 nahe. Aufgrund der sehr potenten Hemmung sämtlicher Exozytosevorgänge in einer Zelle durch BFA [28] kann eine übermäßige Steigerung der Membranexozytose als Ursache für die Stimulation des Kv1.3 durch die hSGK1^{S422D} ausgeschlossen werden. Wahrscheinlich beruht der Effekt der Kinase auf einer Verminderung der Endozytose der Kanalproteine. Möglicherweise werden die in die Membran integrierten Kanalproteine durch die hSGK1^{S422D} stabilisiert und verbleiben dadurch länger an der Zelloberfläche. Eine Reduktion der Endozytosevorgänge würde aufgrund des physiologischen Membranflusses zu einer gesteigerten Expressionsdichte des Kv1.3 führen.

Es ist anzunehmen, daß die Kv1.3-Kanäle Sequenzen enthalten, welche sie für den Endozytosevorgang erkennbar machen oder diesen steuern. Diese Proteinregionen oder die Aktivität anderer an der Endozytose beteiligter Proteine (in Analogie zu Nedd4-2 bei ENaC) könnten durch die hSGK1^{S422D} moduliert werden. Ob eine Erhöhung der Expressionsdichte letztendlich zu den erhöhten Kaliumströmen beiträgt, bleibt aber durch andere Methoden noch zu klären.

4.5.8. Oozytenfärbungen

Die Immunfluoreszenzfärbungen lieferten ein deutliches Signal für die in die Oozytenmembran integrierten Kv1.3-Proteine. Differenzen in der Intensität zwischen den einzelnen Versuchsgruppen waren nicht festzustellen. Obwohl die injizierte cRNA-Menge pro Zelle (0,125 ng) relativ gering war, zeigten die Messungen eine derart starke Anfärbung von Kv1.3 in der Membran, daß möglicherweise bereits eine Sättigung des Signals vorlag. Versuche mit einer niedrigeren cRNA-Konzentration waren jedoch nicht durchführbar, da die Ergebnisse durch zufällige Pipettierungenauigkeiten bei der Verdünnung der cRNA-Stammlösung und durch instrumentenbedingte Abweichungen bei der cRNA-Injektion zunehmend verfälscht worden wären. Vielleicht ist aber in der Proteinexpression tatsächlich kein Unterschied vorhanden. So könnte sich die Wirkung der Kinase auch auf der Rekrutierung bereits in der Membran befindlicher, ruhender Kv1.3-Kanäle begründen. Es liegen Hinweise vor, daß in den Membranen nahezu aller Zellen zahlreiche exprimierte Kanäle in einem inaktiven Zustand vorliegen, die nicht am Ionenfluß teilnehmen [33]. Die Immunfluoreszenzfärbung erfaßt jedoch alle exprimierten Shaker-Proteine, unabhängig davon, in welchem Zustand sie vorliegen. Die Wirkung der Kinase auf die Oberflächenexpression sollte daher anhand anderer oder sensiblerer Untersuchungsmethoden noch verifiziert werden.

4.6. Integration der Ergebnisse in den Mechanismus der Natriumresorption

Das Mineralokortikoid Aldosteron ist an der Regulation der Natrium- und Kaliumkonzentration im Plasma beteiligt [41, 83, 106, 112]. Der frühe Aldosteroneffekt beruht auf der Steigerung der Natrium- und Kaliumleitfähigkeit der apikalen luminalen Membran im ASDN [41]. Zusätzlich findet eine Steigerung der Umsatzrate der basolateral lokalisierten $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ statt [112]. Die Synthese neuer struktureller Elemente der Transportmaschinerie und die weitere zelluläre Differenzierung sind Teil der verzögert einsetzenden anabolen Aldosteronantwort [77, 112, 113].

Die frühe Hormonwirkung scheint maßgeblich durch die Induktion des Regulatorproteins hSGK1 determiniert zu werden [112]. Die Wirkung der hSGK1 auf den ENaC ist bereits nachgewiesen [112]. Da nahezu jeder Natriumeinstrom in eine Zelle mit einer Erhöhung des Kaliumausstroms einhergeht, lag die Stimulation von Kaliumkanälen durch die hSGK nahe. Die Kinase erhöht jedoch keinesfalls die gesamte Kaliumleitfähigkeit der Zellen, sondern scheint spezifisch den Shaker-Kanal Kv1.3 zu betreffen. Es liegen jedoch auch Hinweise auf eine Stimulation des ROMK-2 durch hSGK1 in Anwesenheit von NHE-RF2 vor [116, 131]. ROMK-2 ist der Kaliumkanal mit der höchsten Expressionsdichte in der apikalen Membran in den Zellen des distalen Nephron und verantwortlich für die renale Kaliumsekretion [41].

Die Aldosteronwirkung in der Frühphase ist auf eine Steigerung der Expressionsdichte der Kanalproteine in der apikalen Membran zurückzuführen [83]. Die Experimente zur Wirkung der hSGK1 auf ENaC und Kv1.3 lassen vermuten, daß die Wirkung der hSGK1 ebenso hauptsächlich auf der Steigerung der Oberflächenexpression beruht. Untersuchungen zur Lokalisation des Kv1.3 ergaben eine gesteigerte Kanalexpression des Shaker-Kanals in den Hauptzellen des distalen Nephron [116], dem Hauptaktionsort von Aldosteron [41, 111]. Das durch Aldosteron induzierte Regulatorprotein hSGK1 vermittelt vermutlich die frühe Hormonwirkung auf zellulärer Ebene.

Die hohe Kaliumkonzentration im Zytoplasma der Tubuluszellen wird durch die energieabhängige, basolateral lokalisierte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ aufrechterhalten. Kaliumkanäle sorgen für die Kaliumleitfähigkeit der basolateralen und apikalen Membran [41, 70, 123]. Kaliumkanäle der basolateralen Membran erlauben ein Recycling und stellen so einen adäquaten Vorrat an Kalium in den Lösungskompartimenten zwischen den Zellen sicher, um ein Funktionieren der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in der basolateralen Membran zu gewährleisten [41]. Die in der apikalen Membran der Hauptzellen lokalisierten Kaliumkanäle des distalen Tubulus und der Sammelrohre vermitteln unter anderem die Kaliumsekretion [41]. Apikale und basolateral exprimierte Kaliumkanäle generieren durch Ionendiffusion ein zellnegatives Potential, welches als treibende Kraft für den Eintritt positiv geladener Teilchen über die apikale Membran der Tubuluszellen einen wichtigen Faktor bei der Natriumresorption darstellt [41, 123].

Die Resorption von Ionen und Molekülen aus dem Primärharn führt durch deren osmotische Aktivität zur Schwellung der Tubulusepithelien. Die renal tubulären Zellen sind jedoch in der Lage durch Steigerung der Aktivität apikaler und basolateraler Kaliumkanäle der Volumenzunahme entgegenzuwirken. Die gleichzeitige Zunahme der Anionenleitfähigkeit erlaubt es den Kaliumionen die Zellen entlang eines elektrochemischen Gradienten zu verlassen und das originale Zellvolumen wiederherzustellen [41, 123].

Änderungen der Aldosteronlevel und die Rate der Kaliumsekretion korrelieren jedoch nicht direkt miteinander [82, 83]. Es liegen neben der Induktion durch Aldosteron auch Hinweise für eine Stimulation der hSGK1 durch Zellvolumenzunahme vor [119]. Die Kinase spielt möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Integration der Einflüsse verschiedener Faktoren auf Natrium- und Kaliumtransportprozesse.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, daß die durch Aldosteron und Zellschwellung induzierte Kinase hSGK1 neben der Natriumresorption durch Einfluß auf die Expressionsdichte des ENaC auch die Kaliumsekretion im distalen Nephron stimuliert. Hierbei könnten dem apikal lokalisierten Shaker-Kaliumkanal Kv1.3 folgende Funktionen zukommen: die Sekretion von Kalium zur Wahrung der Kaliumhomöostase des Gesamtorganismus, die Regulation des Zellvolumens sowie die Aufrechterhaltung des Membranpotentials als treibende Kraft für die Natriumresorption [41].

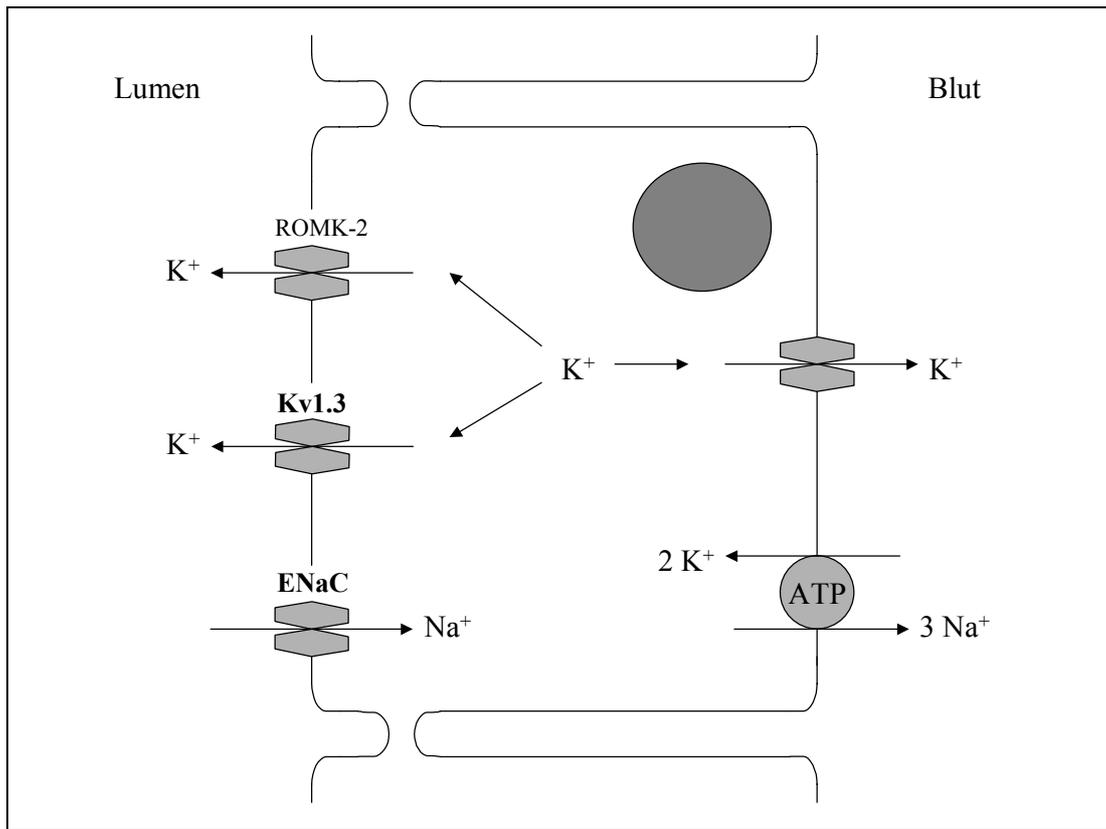


Abb. 46: Einbindung der Kaliumkanäle in die Na^+ -Resorption: die Natriumresorption über den ENaC führt zur Zelldepolarisation. Kompensatorisch findet ein Kaliumausstrom aus der Zelle über apikal und basolateral lokalisierte Kaliumkanäle statt. Dies führt zur Repolarisation und Aufrechterhaltung des Membranpotentials sowie des transzellulären Potentials, das die treibende Kraft der Natriumresorption repräsentiert. ROMK-2 und Kv1.3 sind apikal lokalisiert und sezernieren Kalium. Die basolateral lokalisierten Kaliumkanäle stellen K^+ für das Recycling über die $Na^+-K^+-ATPase$ zur Verfügung. (modifiziert nach Giebisch 1998: Renal potassium transport: mechanisms and regulation) [41]

5. Zusammenfassung

Das Mineralokortikoid Aldosteron stimuliert sowohl die Natriumresorption als auch die Kaliumsekretion in den Aldosteron-sensitiven Epithelien, v.a. im distalen Tubulus und Sammelrohr der Niere. Das Hormon induziert hier die Transkription der Serum- und Glukokortikoid-sensitiven Kinase SGK1, einem Mediator der Aldosteronantwort. Der Epitheliale Natriumkanal ENaC und verschiedene Kaliumkanäle wurden auf eine Stimulation durch SGK1 untersucht. Die unterschiedlichen Ionenkanäle wurden in *Xenopus laevis* Oozyten mit der humanen SGK1 (hSGK1) koexprimiert und per voltage clamp gemessen. Unter den analysierten Kanälen zeigte neben dem Epithelialen Natriumkanal nur der spannungsgesteuerte Shaker-Kaliumkanal Kv1.3 eine Stimulation durch die hSGK1.

Die Serin-Threonin-Kinase stimulierte den ENaC zu einer bis zu fünffach höheren Aktivität. Unter der Kinasewirkung wurden die pharmakologischen Eigenschaften des ENaC stark beeinflusst: die Sensitivität der Kanalinhhibitoren Amilorid und EIPA wurde entgegengesetzt verändert. Die Affinität von EIPA wurde fünffach gesteigert, wohingegen jene von Amilorid um den Faktor zwei reduziert wurde. Ein Einfluß auf die Natriumkinetik war jedoch nicht festzustellen, sodaß trotz der engen räumlichen Beziehung zwischen Amiloridbindungsstelle und Kanalpore [59, 91], entsprechend den Beobachtungen anderer Forschungsgruppen [98, 99, 101], kein direkter Einfluß der hSGK1 auf die Porenregion anzunehmen ist. Der Epitheliale Natriumkanal unterliegt der Modulation durch mehrere Kinasen, die selbst in ein komplexes Regulationssystem eingebunden sind [112]. Experimente zur Interaktion zwischen hSGK1 und PKA lieferten einen synergistischen, jedoch keinen additiven Effekt der beiden Kinasen, wahrscheinlich aufgrund eines ähnlichen Mechanismus zur Aktivierung des ENaC. Unklar bleibt, ob die Kinasewirkung direkt über einen Angriff am Kanalprotein selbst zustande kam, oder ob in die Regulation durch die hSGK1 akzessorische Proteine, wie das Nedd4-2 [101], involviert waren.

Die unter hSGK1 beobachtete Zunahme der Natriumleitfähigkeit ist wahrscheinlich auf die Steigerung der Expressionsdichte des ENaC und die Rekrutierung von in der Membran ruhenden inaktiven Kanälen zurückzuführen [33].

Beim spannungsgesteuerten Shaker-Kaliumkanal Kv1.3 war unter hSGK1 eine Zunahme des spezifischen Kaliumstroms um das Vier- bis Fünffache zu beobachten. Der Kv1.3 unterliegt einer komplexen posttranslationalen Modulation durch verschiedene Kinasen, die sich in ihrer Wirkung zum Teil gegenseitig aufheben [20, 49]. Hierbei fungiert die PKC als "master switch" [20]. Die hSGK1 wies eine zur PKC agonistische Wirkung auf. Die Wirksamkeit der hSGK1 schien jedoch stark von der Aktivität der PKC, d.h. der Basisstimulation des Kv1.3, abhängig zu sein. Die Kinase zeigte weder auf die Aktivierungsschwelle des spannungsabhängigen Kv1.3 noch auf die pharmakologischen Eigenschaften einen Einfluß. So blieb die Sensitivität zu den Kaliumkanal-Hemmstoffen MTX und TEA auch unter Kinaseeinfluß unverändert. Bei der Inaktivierungskinetik war ein deutlicher Effekt der hSGK1 zu beobachten. Die Inaktivierung war unter Stimulation durch die Kinase verzögert mit einer signifikant (1,5-fach) höheren Inaktivierungskonstante. Die Hemmung der zellulären Exozytosevorgänge mit folgender Depletion der Membranproteine durch Brefeldin A läßt eine verlängerte Halbwertszeit des Kv1.3 unter hSGK1 in der Zellmembran vermuten. Eine vermehrte Oberflächenexpression in der Immunfluoreszenzfärbung war jedoch nicht festzustellen.

Insgesamt scheint die Zunahme der Kanalaktivität des Kv1.3 unter hSGK1 auf zwei Mechanismen zurückzuführen zu sein: der Inaktivierungsverzögerung mit gesteigertem "open window current" und größerer Einzelkanalleitfähigkeit sowie der Stabilisierung der Kanalproteine in der Zellmembran mit verminderter Membranendozytose. Möglicherweise spielt auch hier die Rekrutierung in der Membran ruhender inaktiver Shaker-Kanäle durch die hSGK1 eine Rolle [33, 35].

Analog zu den Experimenten des ENaC konnte auch bei der Stimulation des Kv1.3 nicht geklärt werden, ob die Kinasewirkung über eine direkte Modulation des Kanalproteins selbst zustande kommt, oder ob akzessorische Proteine, wie Kv- β -Untereinheiten, in die Regulation durch die hSGK1 involviert sind.

Lokalisationsuntersuchungen zu Kv1.3 ergaben eine vermehrte Expression in den Hauptzellen des distalen Nephrons, dem Hauptexpressionsort des ENaC [41, 111, 116]. Die Stimulation des Kv1.3 durch Kinase hSGK1 könnte über die Stabilisierung des Membranpotentials in den Zellen des distalen Tubulus und Sammelrohr eine wichtige Rolle bei der Natriumresorption spielen.

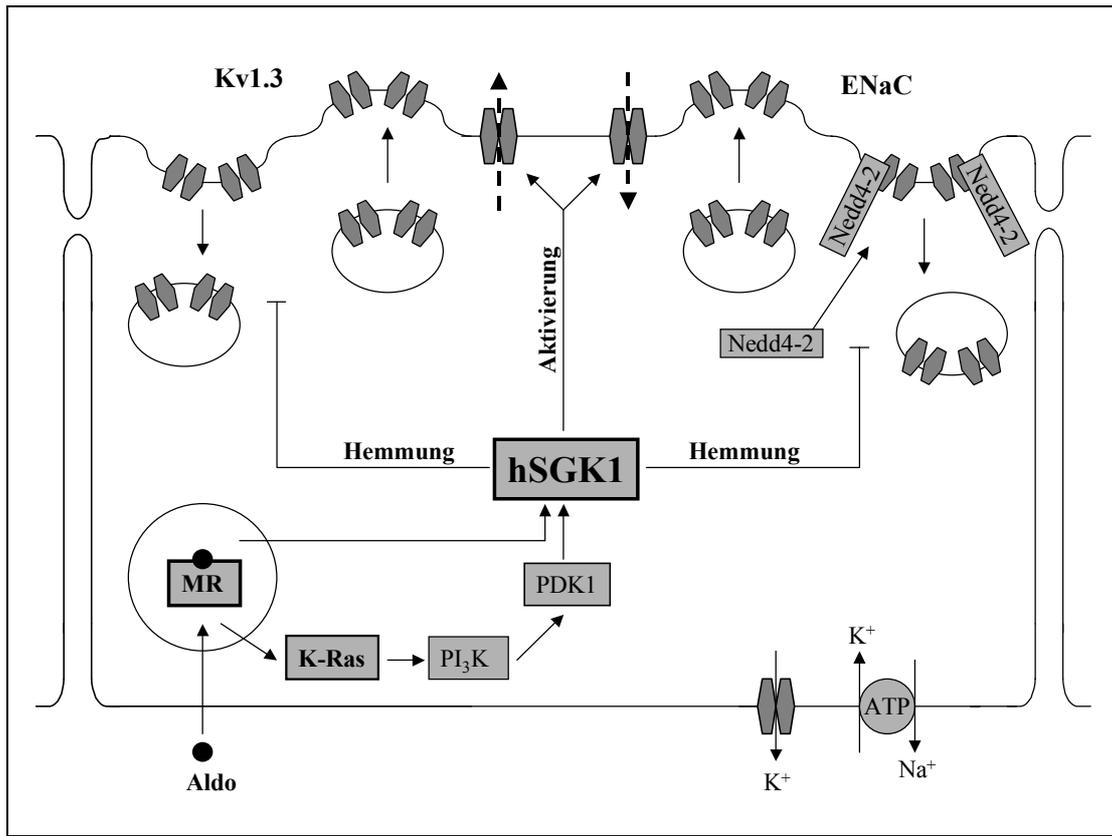


Abb. 47: Modell der hSGK1-Wirkung auf ENaC und Kv1.3: Aktivierung in der Membran ruhender inaktiver ENaC und Kv1.3 sowie Stabilisierung der Kanalproteine in der Membran durch Hemmung der Endozytose mit folgender Proteindegradation
 Abkürzungen: Aldo=Aldosteron; MR=Mineralokortikoidrezeptor; PI₃K=Phosphatidylinositol-3-Kinase; PDK1=3-Phosphoinositidabhängige Kinase1 (modifiziert nach Verrey et al. 1999) [112]

6. Literaturverzeichnis

1. Aidley, D. J. and Stanfield, P. R. (1996)
Ion Channels: Molecules In Action
Cambridge University Press
2. Alessandri-Haber, N.; Lecoq, A.; Gasparini, S.; Grangier-Macmath, G.;
Jacquet, G.; Harvey, A.; de Medeiros, C.; Rowan, E. G.; Golat, M.; Ménez, A.
and Crest, M. (1999)
Mapping the Functional Anatomy of BgK on Kv1.1, Kv1.2, and Kv1.3
Clues to design analogs with enhanced selectivity
J. Biol. Chem.; 274 (50): 35653 – 61
3. Alvarez de la Rosa, D.; Zhang, P.; Nárday-Fejes-Tóth, A.; Fejes-Tóth, G. and
Canessa, C. M. (1999)
The Serum and Glucocorticoid Kinase sgk Increases the Abundance of
Epithelial Sodium Channels in the Plasma Membrane of Xenopus Oocytes
J. Biol. Chem.; 274 (53): 37834 – 39
4. Alvarez de la Rosa, D.; Canessa, C. M.; Fyfe, G. K. and Zhang, P. (2000)
Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels
Annu. Rev. Physiol.; 62, 573 – 94
5. Awayda, M. S.; Bourdreaux M. J.; Reger, R. L. and Hamm, L. L. (2000)
Regulation of the epithelial Na⁽⁺⁾ channel by extracellular acidification
Am. J. Physiol. Cell Physiol.; 279 (6); C1896 – 905
6. Barbry, P. and Hofman P. (1997)
Molecular biology of Na⁺ absorption
American Physiological Society, invited review, 0193-1857/97
7. Bednarek, M. A.; Bugianesi, R. M.; Leonard, R. J. and Felix, J. P. (1994)
Chemical synthesis and structure-function studies of margatoxin, a potent
inhibitor of voltage-dependent potassium channel in human T lymphocytes
Biochem. Biophys. Res. Commun.; 198 (2): 619 – 25
8. Berdiev, B. K.; Shlyonsky, V. G.; Karlson, K. H.; Stanton, B. A. and Ismailov,
I. I. (2000)
Gating of amiloride-sensitive Na⁽⁺⁾ channels: subunit-subunit interactions and
inhibition by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Biophys. J.; 78 (4): 1881 - 94

9. Böhmer, C.; Wagner, C. A.; Beck, S.; Moschen, I.; Melzig, J.; Werner, A.; Lin, J.-T.; Lang, F. and Wehner, F. (2000)
The Shrinkage-activated Na⁺ Conductance of Rat Hepatocytes and its Possible Correlation to rENaC
Cell Physiol. Biochem.; 10: 187 –194
10. Bonny, O.; Chraïbi, A.; Loffing, O.; Jaeger, N. F.; Grunder, S.; Horisberger, J. D. and Rossier, B. C. (1999)
Functional expression of a pseudohypoaldosteronism type I mutated epithelial Na⁺ channel lacking the pore-forming region of its alpha subunit
J. Clin. Invest.; 104 (7); 967 – 974
11. Bowlby, M. R.; Fadool, D. A.; Holmes, T. C. and Levitan I. B. (1997)
Modulation of the Kv1.3 Potassium Channel by Receptor Tyrosine Kinases
J. Gen. Physiol.; Vol. 110, 601 – 610
12. Brennan, F. E. and Fuller, P. J. (2000)
Rapid upregulation of serum- and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) gene expression by corticosteroids in vivo
Mol. Cell Endocrinol.; 166 (2): 129 – 36
13. Bretschneider, F.; Wrisch, A.; Lehrmann-Horn, F. and Grissmer, S. (1999)
External Tetraethylammonium As a Molecular Caliper for Sensing the Shape of the Outer Vestibule of Potassium Channels
Biophysical Journal, Vol. 76, 2351 – 2360
14. Busjahn, A.; Aydin, A.; Uhlmann, R.; Krasko, C.; Bähring, S.; Szelestei, T.; Feng, Y.; Dahm, S.; Sharma, A. M.; Luft, F. C. and Lang, F. (2002)
Serum- and glucocorticoid-regulated kinase (SGK1) gene and blood pressure Hypertension; 40 (3): 256 - 60
15. Cai, Y. C. and Douglass, J. (1993)
In vivo and in vitro phosphorylation of the T lymphocyte type n (Kv1.3) potassium channel
J. Biol. Chem.; 268 (31): 23720 – 7
16. Canessa, C. M.; Schild, L.; Buell, G.; Thorens, B.; Gautschi, I.; Horisberger, J.-D. and Rossier, B. C. (1994)
Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits
Nature; 367: 463 - 467
17. Chalfant, M.L.; Denton, J.S.; Langoh, A.L.; Karlson, K.H.; Loffing, J.; Benos, D.J. and Stanton, B.A. (1999)
The NH(2) terminus of the epithelial sodium channel contains an endocytotic motif
J. Biol. Chem.; 274 (46): 32889 – 96

18. Chen, S. Y.; Bhargava, A.; Mastroberardino, L.; Meijer, O. C.; Wang, J.; Buse, P.; Firestone, G. L.; Verrey, F. and Pearce, D. (1999)
Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 96 (5); 2514 – 9
19. Chung, I. and Schlichter L. C. (1996)
Native Kv1.3 Channels are Upregulated by Protein Kinase C
J. Membrane Biol.; 156, 73 – 85
20. Chung I. and Schlichter L.C. (1997)
Regulation of native Kv1.3 channels by cAMP-dependet protein phosphorylation
Am. J. Physiol. 273 (Cell Physiol. 42): C622 - C633
21. Classen, M.; Diehl, V.; Kochsiek, K. (1998)
Innere Medizin
Urban & Schwarzenberg
22. Coleman, S. K.; Newcombe, J.; Pryke J. and Dolly, J. O. (1999)
Subunit composition of Kv1 channels in human CNS
J. Neurochem.; 73 (2): 849 – 58
23. Cowling, R. T. and Birnboim, H. C. (2000)
Expression of serum- and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) mRNA is up-Regulated by GM-CSF and other proinflammatory mediators in human granulocytes
J. Leukoc. Biol.; 67 (2): 240 – 8
24. Dai, F.; Yu, L.; He, H.; Zhao, Y.; Yang, J.; Zhang, X. and Zhao, S. (1999)
Cloning and mapping of a novel human serum / glucocorticoid regulated kinase-like gene, SGKL, to chromosome 8q12.3 – q13.1
Genomics; 62 (1): 95 – 7
25. Davies, S. P.; Reddy, H.; Caivano, M. and Cohen, P. (2000)
Specifity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors
Biochem J.; 351 (Pt 1): 95-105
26. Debonneville, C.; Flores, S. Y.; Kamynina, E.; Plant, P. J.; Tauxe, C.; Thomas, M. A.; Munster, C.; Chraibi, A.; Pratt, J. H.; Horisberger, J. D.; Pearce, D.; Loffing, J. and Straub, O. (2001)
Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression
EMBO J.; 20 (24): 7052 - 9

27. Deetjen, P.; Speckmann, E.-J. (1994)
Physiologie
Urban & Schwarzenberg
28. Dinter, A. and Berger, E. G. (1998)
Golgi-disturbing agents
Histochem. Cell Biol.; 109: 571 - 590
29. Duc, C.; Farman, N.; Canessa, C. M.; Bonvalet, J. P. and Rossier, B. C. (1994)
Cell-specific expression of epithelial sodium channel alpha, beta and gamma subunits in aldosterone-responsive epithelia from the rat: localization by in situ hybridization and immunocytochemistry
J. Cell Biol.; 127 (6 Pt 2); 1907 – 21
30. Eskandari, S.; Snyder, P. M.; Kremani, M.; Zampighi, A.; Welsh, M. J. and Wright, E. M. (1999)
Number of Subunits Comprising the Epithelial Sodium Channel
J. Biol. Chem.; 274 (38): 27281 – 86
31. Faletti, C.J.; Perotti, N.; Taylor, S.I. and Blazer-Yost, B.L. (2002)
Sgk: an essential converging point for peptide and steroid hormone regulation of ENaC-mediated Na⁺ transport
Am. J. Physiol. Cell Physiol.; 282 (3): C494 - 500
32. Fillon, S.; Warntges, S.; Matskevitch, J.; Moschen, I, Setiawan, I.; Gamper, N.; Feng, Y.X.; Stegen, C.; Friedrich, B.; Waldegger, S.; Broer, S.; Wagner, C.A.; Huber, S.M.; Klingel, K.; Vereninov, A. and Lang, F. (2001)
Serum- and glucocorticoid-dependent kinase, cell volume, and the regulation of epithelial transport
Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.; 130 (3): 367 - 76
33. Firsov, D.; Schild, L.; Gautschi, I.; Merillat, A. M.; Schneeberger, E. and Rossier, B. C. (1996)
Cell surface expression of the epithelial sodium channel and a mutant causing Liddle syndrome: a quantitative approach
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 93 (26); 15370 – 5
34. Firsov, D.; Gautschi, I.; Merillat, A. M.; Rossier, B. C. and Schild, L. (1998)
The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC)
EMBO J.; 17 (2); 344 – 52
35. Firsov, D.; Robert-Nicoud, M.; Gruender, S.; Schild, L. and Rossier, B. C. (1999)
Mutational analysis of cysteine-rich domains of the epithelial sodium channel (ENaC). Identification of eysteines essential for channel expression at cell surface
J. Biol. Chem.; 274 (5): 2743 – 9

36. Fyfe, G. K.; Quinn, A. and Canessa, C. M. (1998)
Structure and function of the Mec-ENaC family of ion channels
Semin. Nephrol.; 18 (2); 138 – 51
37. Fyfe, G. K. and Canessa, C. M. (1998)
Subunit composition determines the single channel kinetics of the epithelial sodium channel
J. Gen. Physiol.; 112 (4): 423 – 32
38. Gamper, N.; Fillon, S.; Huber, M.; Feng, Y.; Kobayashi, T.; Cohen, P. and Lang, F. (2002)
IGF-1 up-regulates K(+) channels via PI₃-Kinase, PDK1 and SGK1
Pflugers Arch. 443 (4): 625 - 34
39. Garcia-Calvo M.; Leonard, R. J.; Novick, J.; Stevens, S. P.; Schmalhofer, W.; Kaczorowski, G. J. and Garcia, M. L. (1993)
Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centuroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels
J. Biol. Chem.; 268 (25): 18866 – 74
40. Garty, H. and Palmer, L. G. (1997)
Epithelial Sodium Channels: Function, Structure and Regulation
Physiological Reviews, Vol. 77, 359 – 396
41. Giebisch, G. (1998)
Renal potassium transport: mechanisms and regulation
Am. J. Physiol. 274 (Renal Physiol. 43): F817 – F833
42. Golenhofen, K. (1997)
Physiologie
Urban & Schwarzenberg
43. Greger, R. (1998)
Molecular Pathophysiology of Inborn Renal Na⁺ Transport Defects
Kid. Blood Pres. Res.; 21, 222 – 225
44. Grissmer, S.; Nguyen, A. N.; Aiyar, J.; Hanson, D. C.; Mather, R. J.; Gutman, G. A.; Karmilowicz, M. J.; Auperin, D. D. and Chandy, K. G. (1994)
Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5 and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines
Mol. Pharmacol.; 45 (6): 1227 – 34
45. Grunder S.; Firsov, D.; Chang, S. S.; Jaeger, N. F.; Gautschi, I.; Schild, L.; Lifton, R. P. and Rossier, B. C. (1997)
A mutation causing pseudohypoaldosteronism type 1 identifies a conserved glycine that is involved in the gating of the epithelial sodium channel
EMBO J.; 16 (5); 899 – 907

46. Hamilton, K. L. and Eaton, D. C. (1991)
cAMP-induced potassium channel activity in apical membrane of cultured A6 kidney cells
Am. J. Physiol.; 261 (6 Pt 2): F1055 – 62
47. Helms, L. M. H.; Felix, J. P.; Bugianesi, R. M.; Garcia, M. L.; Stevens, S.; Leonard, R. J.; Knaus, H.-G.; Koch, R.; Wanner, S. G.; Kaczorowski, G. J. and Slaughter, R. S. (1997)
Margatoxin Binds to a Homomultimer of Kv1.3 Channels in Jurkat Cells. Comparison with Kv1.3 Expressed in CHO Cells
Biochemistry; 36, 3737 – 3744
48. Hildebrandt, F. (1998)
Molecular Genetics and Clinical Phenotype in Heritable Disorders of Tubular Na⁺ Transport
Kid. Blood Pres. Res.; 21, 217 – 222
49. Holmes, T. C.; Fadool, D. A. and Levitan I. B. (1995)
Tyrosine Phosphorylation of the Kv1.3 Potassium Channel
Journal of Neuroscience; 16 (5), 1581 – 1590
50. Horster, M. (2000)
Embryonic epithelial membrane transporters
Am. J. Physiol. Renal Physiol.; 279 (6); F982 – F996
51. Hummler, E. (1998)
Epithelial Sodium Channel and Its Implication in the Control of Blood Pressure
Kid. Blood Pres. Res.; 21, 253 – 255
52. Itani, O. A.; Auerbach, S. D.; Husted, R. F.; Volk, K. A.; Ageloff, S.; Knepper, M. A.; Stokes, J. B. and Thomas C. P. (2002)
Glucocorticoid-stimulated lung epithelial Na(+) transport is associated with regulated ENaC and sgk1 expression
Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.: 282 (4): L631 - 41
53. Jan L. Y. and Jan, Y. N. (1997)
Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes
Annu. Rev. Neurosci.; 20, 91- 123
54. Jiang, Q.; Li, J.; Dubroff, R.; Ahn, Y. J.; Foskett, J. K.; Engelhardt, J. and Kleyman, T. R. (2000)
Epithelial sodium channel regulate cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels in *Xenopus* oocytes
J. Biol. Chem.; 275 (18): 13266 - 74

55. Kamynina, E.; Debonneville, C.; Bens, V.; Vandewalle, A. and Staub, O. (2001)
A novel mouse Nedd4 protein suppresses the activity of the epithelial Na⁺ channel
FASEB J.; 15 (1): 204 - 214
56. Kellenberger, S.; Gautschi, I.; Rossier, B. C. and Schild, L. (1998)
Mutations causing Liddle syndrome reduce sodium-dependent downregulation of the epithelial sodium channel in the *Xenopus* oocyte expression system
J. Clin. Invest.; 101 (12); 2741 – 50
57. Kellenberger, S.; Hoffmann-Pochon, N.; Gautschi, I.; Schneeberger, E. and Schild, L. (1999)
On the molecular basis of ion permeation in the epithelial Na⁺ channel
J. Gen. Physiol.; 114 (1): 13 - 30
58. Kerem, E.; Bistrizter, T.; Hanukoglu, A.; Hofmann, T.; Zhou, Z.; Bennett, W.; MacLaughlin, E.; Barker, P.; Nash, M.; Quittell, L.; Boucher R. and Knowles, M. R. (1999)
Pulmonary epithelial sodium-channel dysfunction and excess airway liquid in pseudohypoaldosteronism
N. Engl. J. Med.; 341 (3): 156 - 62
59. Kieber-Emmons, T.; Lin, C.; Foster, M. H. and Kleyman T. R. (1999)
Antiidiotypic Antibody Recognizes an Amiloride Binding Domain within the α Subunit of the Epithelial Na⁺ Channel
J. Biol. Chem.; 274 (14): 9648-55
60. Klingel, K.; Wärntges, S.; Bock, J.; Wagner, C. A.; Sauter, M.; Waldegger, S.; Kandolf, R. and Lang, F. (2000)
Expression of cell volume-regulated kinase h-sgk in pancreatic tissue
Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.; 279: G998 – G1002
61. Kobayashi, T.; Deak, M.; Morrice, N. and 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
62. Kobayashi, T. and 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

63. Koch, R. O.; Wanner, S. G.; Koschak, A.; Hanner, M.; Schwarzer, C.; Kaczorowski, G. J.; Slaughter, R. S.; Garcia, M. L. and Knaus, H. G. (1997)
Complex Subunit Assembly of Neuronal Voltage-gated K⁺ Channels
Basis for High-Affinity Toxin Interactions and Pharmacology
J. Biol. Chem.; 272 (44): 27577 – 81
64. Kumar, J. M.; Brooks, D. P.; Olson, B. A. and Laping, N. J. (1999)
Sgk, a putative serine / threonine kinase, is differentially expressed in the
kidney of diabetic mice and humans
J. Am. Soc. Nephrol.; 10 (12): 2488 – 94
65. Kunzelmann, K. (1997)
Regulation and Amiloride-Binding Site of Epithelial Na⁺ Channels
Kid. Blood Pres. Res.; 20, 151 – 153
66. Lang, F.; Ritter, M.; Gamper, N.; Huber, S.; Fillon, S.; Tanneur, V.; Lepple-
Wienhues, A.; Szabo, I and Gulbins, E. (2000)
Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death
Cell Physiol. Biochem.; 10 (5 – 6): 417 - 28
67. Lang, F.; Klingel, K.; Wagner, C. A.; Stegen, C.; Wärntges, S.; Friedrich, B.;
Lanzendörfer, M.; Melzig, J.; Moschen, I.; Steuer, S.; Waldegger, S.; Sauter,
M.; Paulmichl, M.; Gerke, V.; Risler, T.; Gamba, G.; Capasso, G.; Kandolf, R.;
Hebert, S. C.; Massry, S. G. and Bröer, S. (2000)
Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in
diabetic nephropathy
PNAS; Vol. 97, No. 14, 8157 – 8162
68. Lang, F. and Cohen, P. (2001)
Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced
protein kinase isoforms
Sci. STKE; 2001 (108): RE 17
69. Levite, M.; Cahalon, L.; Peretz, A.; HersHKoviz, R.; Sobko, A.; Ariel, A.;
Desai, R.; Attali, B. and Lider, O. (2000)
Extracellular K(+) and opening of voltage-gated potassium channels activate T-
cell integrin function: physical and functional association between Kv1.3
channels and beta1 integrins
K. Exp. Med.; 191 (7): 1167 – 76
70. Ling, B. N.; Hinton, C. F. and Eaton D. C. (1991)
Potassium permeable channels in primary cultures of rabbit cortical collecting
Tubule
Kidney Int.; 40 (3): 441 – 52

71. Loffing, J.; Zecevic, M.; Feraille, E.; Kaisserling, B.; Asher, C.; Rossier, B.C.; Firestone, G.L.; Pearce, D. and Verrey, F. (2001)
Aldosterone induces rapid apical translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK
Am. J. Physiol. Renal Physiol.; 280(4): F675 - 82
72. Loffing, J.; Summa, V.; Zecevic, M. and Verrey, F. (2001)
Mediators of aldosterone action in the renal tubule
Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.; 10 (5): 667 – 75
73. Loffing, J.; Loffing-Cueni, D.; Valderrabano, V.; Klausli, L.; Hebert, S.C.; Rossier, B.C.; Hoenderop, J.G.; Bindels, R.J. and Kaisserling, B. (2001)
Organization of the mouse distal nephron: distributions of transcellular calcium and sodium transport pathways
Am. J. Physiol. Renal Physiol.; epub ahead of print
74. Lipkind, J. M. and Fozzard, H. A. (1997)
A model of scorpion toxin binding to voltage-gated K⁺ channels
J. Membr. Biol.; 158 (3): 187 – 96
75. Masilamani, S.; Kim, G.-H.; Mitchell, C.; Wade, J. M. and Knepper, M. A. (1999)
Aldosterone-mediated regulation of ENaC α , β and γ subunit proteins in rat kidney
J. Clin. Invest.; 104: R19 – R23
76. Matalon, S and O'Brodivich H. (1999)
Sodium channels in alveolar epithelial cells: molecular characterization, biophysical properties, and physiological significance
Ann. Rev. Physiol.; 61: 627 - 61
77. May, A.; Puoti, A.; Gaeggler, H. P.; Horisberger, J. D. and Rossier, B. C. (1997)
Early effect of aldosterone on the rate of synthesis of the epithelial sodium channel alpha subunit in A6 renal cells
J. Am. Nephrol.; 8 (12); 1813 – 22
78. McCormack, T.; McCormack, K.; Nadal, M. S.; Vieira, E.; Ozaita, A. and Rudy, B. (1999)
The Effects of Shaker β -Subunits in the Human Lymphocyte K⁺ Channel Kv1.3
J. Biol. Chem.; 274: 20123 – 26
79. Naray-Fejes-Toth, A.; Canessa, C.; Cleaveland, E. S.; Aldrich, G. and Fejes-Toth, G. (1999)
Sgk is an Aldosterone-induced Kinase in the Renal Collecting Duct Effects on Epithelial Na⁺ Channels
J. Biol. Chem.; 274 (24): 16973 – 78

80. Náray-Fejes-Tóth, A. and Fejes-Tóth, G. (2000)
The sgk, an aldosterone-induced gene in mineralocorticoid target cells,
regulates the epithelial sodium channel
Kidney Int., 57: 1290 – 94
81. Ott, M. (1999)
Regulation des epithelialen Natriumkanals (ENaC) durch die volumenregulierte
Kinase h-sgk
Medizinische Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
82. Palmer, G. (1999)
Potassium secretion and the regulation of distal nephron K channels
Am. J. Physiol. 277 (Renal Physiol. 46): F821 – F825
83. Palmer, L. G. and Frindt, G. (2000)
Aldosterone and potassium secretion by the cortical collecting duct
Kidney Int.; Vol. 57, pp. 1324 – 1328
84. Park, J.; Leong, M. L.; Buse, P.; Maiyar, A. C.; Firestone, G. L. and
Hemmings, B. A. (1999)
Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-
stimulated signaling pathway
EMBO J.; 18 (11): 3124 – 33
85. Pearce, D.; Verrey, F.; Chen, S.-Y.; Mastroberardino, L.; Meijer, O. C.; Wang,
J. and Bhargava, A. (2000)
Role of SGK in mineralocorticoid-regulated sodium transport
Kidney Int., 57: 1283 – 89
86. Perrotti, N.; He, R. A.; Phillips, S. A.; Renfrew Haft, C and Taylor, S. I. (2000)
Activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase (SGK) by
cyclic AMP and insulin
J. Biol. Chem.; epub ahead of print
87. Pradervand, S.; Barker, P. M.; Wang, Q.; Ernst, S. A.; Beermann, F.; Grubb, B.
R.; Burnier, M.; Schmidt, A.; Bindels, R. J.; Gatzky, J. T.; Rossier, B. C. and
Hummler, E. (1999)
Salt restriction induces pseudohypaldosteronism type 1 in mice expressing
low levels of the beta-subunit of the amiloride-sensitive epithelial sodium
channel
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 96 (4); 1732 – 7
88. Reddy, M. M.; Light, M. J. and Quinton, P. M. (1999)
Activation of the Epithelial Na⁺ channel (ENaC) requires CFTR Cl⁻ channel
Function
Nature; 402 (6759); 301 – 4

89. Rotin, D. (2000)
Regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by accessory proteins
Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.; 9 (5); 529 – 34
90. Schild, L.; Gautschi, I.; Schneeberger, E.; Lifton, R. P. and Rossier, B. C. (1996)
Identification of a PY motif in the epithelial Na channel subunits as target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome
EMBO J.; 15 (10); 2381 – 7
91. Schild, L.; Schneeberger, E.; Gautschi, I. and Firsov, D. (1997)
Identification of Amino Acid Residues in the α , β and γ Subunits of the Epithelial Sodium Channel (EnaC) Involved in Amiloride Block and Ion Permeation
J. Gen. Physiol., Volume 109, 15 – 26
92. Schmitt, R.; Ellison, D. H.; Farman, N.; Rossier, B. C.; Reilly, R. F.; Reeves, W. B.; Oberbäumer, I.; Tapp, R. and Bachmann, S. (1999)
Developmental expression of sodium entry pathways in rat nephron
Am. J. Physiol. 276 (Renal Physiol. 45); F367 – F381
93. Segal, A. S.; Yao, X. and Desir, G. V. (1999)
The T0 domain of rabbit Kv1.3 regulates steady state channel protein level
Biochem. Biophys. Res. Comm.; 254 (1): 54 – 64
94. Sheng, Z. F.; Skach, W.; Santarelli, V. and Deutsch, C. (1997)
Evidence for Interaction between Transmembrane Segments in Assembly of Kv1.3
Biochemistry; 36, 15501 – 15513
95. Sheng, S.; Li, J.; McNulty, K. A.; Kieber-Emmons, T. and Kleyman, T. R. (2000)
Epithelial Sodium Channel Pore Region: Structure and Role in Gating
JBC, Manuscript M008117200
96. Shigaev, A.; Asher, C.; Latter, H.; Garty, H. and Reuveny, E. (2000)
Regulation of sgk by aldosterone and its effects on the epithelial Na⁺ channel
Am. J. Physiol. Renal Physiol.; 278: F613 – F619
97. Shimkets, R. A.; Lifton, R. P. and Canessa, C. M. (1997)
The activity of the epithelial sodium channel is regulated by clathrin-mediated endocytosis
J. Biol. Chem.; 272 (41): 25537 – 41
98. Shimkets, R. A.; Lifton, R. and Canessa, C. M. (1998)
In vivo phosphorylation of the epithelial sodium channel
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 95, 3301 – 3305

99. Smith, P. R. and Benos, D. J. (1991)
Epithelial Na⁺ Channels
Annu. Rev. Physiol.; 53, 509-30
100. Snyder, P. M.; Bucher, D. B. and Olson, D. R. (2000)
Gating Induces a Conformational Change in the Outer Vestibule of ENaC
J. Gen. Physiol.; 116 (6); 781 – 790
101. Snyder, P. M.; Olson, D. R. and Thomas, B. C. (2002)
Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na⁺ channel
J. Biol. Chem.; 277 (1): 5 – 8
102. Snyder P. M. (2002)
The epithelial Na(+) channel: cell surface insertion and retrieval in Na(+) homeostasis and hypertension
Endocr. Rev.; 23 (2): 258 – 75
103. Spencer, R. H.; Sokolov, Y.; Li, H.; Takenaka, B.; Milici, A. J.; Aiyar, J.; Nguyen, A.; Park, H.; Jap, B. K.; Hall, J. E.; Gutman, G. A. and Chandy, K. G. (1997)
Purification, Visualization, and Biophysical Characterization of Kv1.3 Tetramers
J. Biol. Chem.; 272: 2389 – 2395
104. Staub, O.; Abriel, H.; Plant, P.; Ishikawa, T.; Kanelis, V.; Saleki, R.; Horisberger, J. D.; Schild, L. and Rotin, D. (2000)
Regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 and ubiquitination
Kidney Int.; 57 (3): 809 – 15
105. Stockand, J. D.; Bao, H. F.; Schenk, J.; Malik, B.; Middleton, P.; Schlanger, L. E. and Eaton, D. C. (2000)
Differential effects of protein kinase C on the levels of epithelial Na⁺ channel subunit proteins
J. Biol. Chem.; 275 (33); 25760 – 5
106. Stockand, J.D. (2002)
New ideas about aldosterone signaling in epithelia
Am. J. Physiol. Renal Physiol.; 282 (4): F559 – 76
107. Summa, V. ; Mordasini, D. ; Roger, F.; Bens, M.; Martin, P.Y.; Vandewalle, A. Verrey, F. and Feraille, E. (2001)
Short term effect of aldosterone on Na,K-ATPase cell surface expression in kidney collecting duct cells
J. Biol. Chem.; 276 (50): 47087 - 93

108. Tu, L. W.; Wang, J.; Helm, A.; Skach, W. R. and Deusch, C. (2000)
Transmembrane Biogenesis of Kv1.3
Biochemistry; 39, 824 – 836
109. Vallet, V.; Chraïbi, A.; Gaeggeler, H. P.; Horisberger, J. D. and Rossier, B. C. (1997)
An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel
Nature; 389(6651): 607 – 10
110. Vallet, V.; Horisberger, J. D. and Rossier, B. C. (1998)
Epithelial sodium channel regulatory proteins identified by functional expression cloning
Kidney Int. Suppl.; 76: S109 - 14
111. Verrey, F.; Spindler, B. and Mastroberardino, L. (1997)
Regulation of Na⁺ Reabsorption in Aldosterone Target Epithelia
Kidney and Blood Pressure Research; 20, 148 – 150
112. Verrey, F. (1999)
Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport
Am. J. Physiol. 277 (Renal Physiol. 46): F319 – F327
113. Verrey, F.; Pearce, D.; Pfeiffer, R.; Spindler, B; Mastroberardino, L.; Summa, V. and Zecevic, M. (2000)
Pleiotropic action of aldosterone in epithelia mediated by transcription and post-transcription mechanisms
Kidney Int.; 57 (4): 1277 – 1282
114. Volk, K. A.; Husted, R. F.; Pruchno, C. J. and Stokes, J. B. (1994)
Functional and molecular evidence for Shaker-like K⁺ channels in rabbit renal papillary epithelial cell line
Am. J. Physiol.; 267 (4 Pt 2): F671 – 8
115. Volk, K. A.; Husted, R. F.; Snyder, P. M. and Stokes, J. B. (2000)
Kinase regulation of hENaC mediated through a region in the COOH-terminal Portion of the α -subunit
Am. J. Physiol. Cell Physiol.; 278; C1047 – C1054
116. Wagner, C. A. (2002)
persönliche Mitteilung
117. Wagner, C.A.; Ott, M.; Klingel, K.; Beck, S.; Melzig, J.; Friedrich, B.; Wild, K. N.; Broer, S.; Moschen, I.; Albers, A.; Waldegger, S.; Tummler, B.; Egan, M. E.; Geibel, J. P.; Kandolf, R. and Lang, F. (2001)
Effects of the serine/threonine kinase SGK1 on the epithelial Na(+) channel (ENaC) and CFTR: implications for cystic fibrosis
Cell. Physiol. Biochem.; 11 (4): 209 - 18

118. Waldegger, S. (1997)
Physiologische und pathophysiologische Bedeutung zellvolumenregulatorischer Mechanismen
Habilitationsschrift für das Fach Physiologie; Eberhard-Karls-Universität Tübingen
119. Waldegger, S.; Barth, P. ; Raber, G. and Lang, F. (1997)
Cloning and characterization of a putative human serine / threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations in cell volume
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; Vol. 94, pp. 4440 – 4445
120. Waldegger, S.; Barth, P.; Forrest, J. R. Jr.; Greger, R. and Lang, F. (1998)
Cloning of sgk serine-threonine protein kinase from shark rectal gland – a gene induced by hypertonicity and secretagogues
Pflügers Arch - Eur. J. Physiol.; 436: 575 – 580
121. Waldegger, S.; Erdel, M.; Nagel, U. O.; Barth, P.; Raber, G.; Steuer, S.; Utermann, G.; Paulmichl, M. and Lang, F. (1998)
Genomic Organization and Chromosomal Localization of the Human SGK Protein Kinase Gene
Genomics; 51, 299 – 302
122. Waldegger, S.; Gabrysch, S.; Barth, P.; Fillon, S. and Lang, F. (2000)
h-sgk serine-threonine protein kinase as transcriptional target of p38/MAP kinase pathway in HepG2 human hepatoma cells
Cell Physiol. Biochem.; 10 (4): 203 – 8
123. Wang, W.; Hebert, S. C.; Giebisch, G. (1997)
Renal K⁺ Channels: Structure and Function
Annu. Rev. Physiol.; 59: 413 – 36
124. Warntges, S.; Grone, H.J.; Capasso, G. and Lang, F. (2001)
Cell volume regulatory mechanisms in progression of renal disease
J. Nephrol.; 14 (5): 319 - 26
125. Warntges, S.; Friedrich, B.; Henke, G.; Duranton, C.; Lang, A.; Waldegger, S.; Meyermann, R.; Kuhl, D.; Speckmann, J.; Obermuller, N.; Witzgall, R.; Mack, F.; Wagner, J.; Wagner, A.; Broer, S. and Lang, F. (2002)
Cerebral localization and regulation of the cell volume-sensitive serum- and glucocorticoid-dependent kinase SGK1
Pflugers Arch.; 443 (4): 617 - 24
126. Webster, M. K.; Goya, L.; Ge, Y.; Maiyar, A. C. and Firestone, G. L. (1993)
Characterization of sgk, a novel member of the serine / threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum
Mol. Cell. Biol.; 13 (4): 2031 – 40

127. Wulff, P.; Vallon, V.; Huang, D. Y.; Volkl, H.; Yu, F.; Richter, K.; Jansen, M.; Schlunz, M.; Klingel, K.; Loffing, J.; Kauselmann, G.; Bosl, M. R.; Lang, F. and Kuhl, D. (2002)
Impaired renal Na⁽⁺⁾ retention in the *sgk1*-knockout mouse
J. Clin. Invest.; 110 (9): 1263 - 8
128. Yao, X.; Chang, A. Y.; Boulpaep, E. L.; Segal, A. S. and Desir G. V. (1996)
Molecular Cloning of a Glibenclamide-sensitive, Voltage-gated Potassium Channel Expressed in Rabbit Kidney
J. Clin. Invest.; Vol. 97, No. 11, 2525 – 2533
129. Yao, X.; Huang, Y.; Kwan, H. Y.; Chan, P.; Segal, A. S. and Desir, G. (1998)
Characterization of a regulatory region in the N-terminus of rabbit Kv1.3
Biochem. Biophys. Res. Commun.; 249 (2): 492 – 8
130. Yao, X.; Liu, W.; Tian, S.; Rafi, H.; Segal, A. S. and Desir, G. V. (2000)
Close Association of the N Terminus of Kv1.3 with the Pore Region
J. Biol. Chem.; 275 (15), 10836 – 59
131. Yun, C. C.; Chen, Y. and Lang, F. (2002)
Glucocorticoid activation of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger isoform 3 revisited. The roles of SGK and NHERF2
J. Biol. Chem.; 277 (10): 7676 - 83

7. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Florian Lang für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit zur Promotion.

Besonderer Dank gebührt meinem Betreuer Herrn Dr. Carsten A. Wagner für seine freundliche Unterstützung während der gesamten Arbeit. Er führte mich in die Elektrophysiologie ein und begleitete mich stets mit Begeisterung, Kritik und Anregungen trotz der oftmals schwierigen Kommunikation aufgrund seiner Forschungsaufenthalte im Ausland.

Frau Birgitta Noll danke ich für die methodische Einarbeitung und Unterstützung bei der Oozytenpräparation und cRNA-Injektion sowie für die cRNA-Synthese. Sie sorgte mit ihrer ständigen Hilfsbereitschaft und humorvollen Art für stets für eine angenehm lebhaft Atmosphäre im Labor.

Herrn Dr. Björn Friedrich möchte ich für seine konstruktive Diskussionsbereitschaft und für die Durchführung fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen an Xenopus-Oozyten danken.

Dank für ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft gilt den Herren Priv. Doz. Dr. Stefan Bröer und Priv. Doz. Dr. Stephan Huber.

Meinen Laborkollegen Herrn Dr. Ivano Moschen, Herrn Paul Stehberger, Herrn Iwan Setiawan, Herrn Guido Henke und Frau Dr. Alexandra Albers bin ich dankbar für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die gemeinsamen Mensabesuche.

Ich bedanke mich bei allen Kollegen am Physiologischen Institut für ihre Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die meinen Werdegang stets unterstützt haben.

Lebenslauf

Sascha Daniel Beck

Geburtsdatum: 09. März 1976

Geburtsort: Friedrichshafen

1982 – 1986 Grund- und Hauptschule Manzenberg, Tett nang

1986 – 1995 Montfort-Gymnasium Tett nang

Juni 1995 Abitur; Allgemeine Hochschulreife

08/95 – 09/96 Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz in Tett nang

10/96 – 03/97 Zeitarbeitsvertrag beim Deutschen Roten Kreuz in Friedrichshafen

04/97 – 05/03 Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

April 1999 Ärztliche Vorprüfung

April 2000 Erstes Staatsexamen

April 2002 Zweites Staatsexamen

Mai 2003 Drittes Staatsexamen