

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen

Abteilung Physiologie I

Leiter: Professor Dr. F. Lang

**Molekulare Determinanten der Regulation von
Kainat- und NMDA-Rezeptoren**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Regina Schwarz
aus
München

2008

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1.Berichterstatter: Privatdozent Dr. G. Seebohm

2.Berichterstatter: Frau Professor Dr. S. Ullrich

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Erregungsleitung im Zentralnervensystem.....	1
1.2 Ionenkanäle	4
1.3 Glutamatrezeptoren	5
1.4 Einteilung der Glutamatrezeptoren	6
1.5 Kainat-Rezeptoren	8
1.5.1 Die Kainatrezeptoruntereinheit GluR6.....	10
1.6 Serum- und Glukokortikoid- induzierte Kinase (SGK).....	11
1.6.1 Glukokortikoide und SGK-Isoformen als Regulatoren von GluR6	12
1.6.2 SGK-Isoformen als Regulatoren von GluR1.....	14
1.7 Potentielle Modulatorproteine von GluR6	14
1.8 NMDA-Rezeptoren.....	16
1.9 Ziele dieser Arbeit	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Verwendete Lösungen und Substanzen	19
2.2 <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten als Expressionssystem.....	24
2.2.1 Operative Entnahme der Oozyten aus <i>Xenopus laevis</i>	24
2.2.2 Präparation der Oozyten	25
2.2.3 Mikroinjektion von cRNA in Oozyten	26
2.3 Elektrophysiologische Messungen mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	27
2.4 Auswertung und Statistik	31

3. Versuche und Ergebnisse	32
3.1 Vergleich von GluR6(M836I)-Strom mit GluR6wt-Strom.....	32
3.2 Unterschiedliche Wirkung von Rab11 auf GluR6wt- und GluR6(M836I)-Stromamplituden	34
3.3 Unterschiedliche Wirkung von Rab5 auf GluR6wt- und GluR6(M836I)-Stromamplituden	36
3.4 Untersuchung der Proteine Grb2, CKAP, Yotiao, RIL, mTOR, NDRG1 und NDRG2 auf ihre mögliche Funktion als Modulatoren der GluR6-Aktivität	38
3.5 Effekt von SGK1, SGK2 und SGK3 auf den Strom von GluR7(K758N).....	43
3.6 Effekt von SGK1, SGK2 und SGK3 auf den Strom des NMDA-Rezeptors NR1-1a/NR2B	46
4. Diskussion	49
4.1 Funktionelle Bedeutung der Mutation M836I in GluR6 und Regulation der GluR6-Aktivität durch Rab5 und Rab11	49
4.2 Identifikation weiterer Modulatoren der GluR6-Aktivität	52
4.3 SGK-Isoformen als Regulatoren von GluR7	55
4.4 SGK-Isoformen als Regulatoren des NMDA-Rezeptorkomplexes NR1-1a/NR2B.....	57
4.5 Schlussfolgerung aus der Arbeit	60
5. Zusammenfassung	62
6. Literaturverzeichnis	64

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere; Einheit der elektrischen Stromstärke
Abb.	Abbildung
Ag	Silber
AgCl	Silberchlorid
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionat
Ca ²⁺	Kalziumionen
cAMP	zyklisches AMP
cDNA	<i>complementary</i> DNA (komplementäre DNA)
Cl ⁻	Chloridionen
Con A	Concanavalin A
COS-7	<i>cercopithecus aethiops, origin-defective SV-40</i> , Zelllinie
cRNA	<i>copy</i> RNA
D	Aspartat (Aminosäure)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
EPSC	<i>excitatory postsynaptic current</i> (exzitatorischer postsynaptischer Strom)
EPSP	<i>excitatory postsynaptic potential</i> (exzitatorisches postsynaptisches Potential)
et al.	und andere
GABA	γ -Aminobuttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
Glu	Glutamat (Aminosäure)
GluR	Glutamatrezeptor

GTP	Guanosintriphosphat
HEK-293	<i>human embryonic kidney</i> , Zelllinie
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N`-(2-ethan-sulfonsäure), hat Pufferfunktion
I	Isoleucin (Aminosäure)
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
I(Ks)	<i>slow outward potassium ion current</i>
IPSP	<i>inhibitory postsynaptic potential</i> (inhibitorisches postsynaptisches Potential)
K	Lysin (Aminosäure)
K ⁺	Kaliumionen
KA	<i>kainic acid</i> (Kainat)
KCl	Kaliumchlorid
LTP	<i>long-term potentiation</i> (Langzeitpotenzierung)
m	Milli; Faktor 10 ⁻³
μ	Mikro; Faktor 10 ⁻⁶
M	molar
M	Mega; Faktor 10 ⁶
M	Methionin (Aminosäure)
Mg ²⁺	Magnesiumionen
mRNA	<i>messengerRNA</i> (Boten-RNA)
n	Nano; Faktor 10 ⁻⁹
n	Symbol für die Anzahl der gemessenen Oozyten
N	Asparagin (Aminosäure)
Na ⁺	Natriumionen
NFR	<i>normal frog ringer</i> , "Normaler Frosch Ringer", (Amphibiensaline, physiologische Frosch-saline nach Ringer)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR1-1a	NMDA-Rezeptor 1 (Spleißvariante 1a)
NR	NMDA-Rezeptor

Ω	Ohm; Einheit des elektrischen Widerstandes
PDK1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1</i> (Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 1)
PI3-Kinase	<i>phosphatidylinositol-3-kinase</i> (Phosphatidylinositol-3-Kinase)
PKA	<i>protein kinase A</i> (Proteinkinase A)
PKB	<i>protein kinase B</i> (Proteinkinase B)
PP1	<i>protein phosphatase 1</i> (Proteinphosphatase 1)
R	Arginin (Aminosäure)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure, RNS)
RNase	Ribonuklease, RNA-abbauendes Enzym
s	Sekunde
S	Serin (Aminosäure)
SGK	<i>serum- and glucocorticoid-induced protein kinase</i> (Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinase)
SNPs	<i>several nucleotide polymorphisms</i>
T	Threonin (Aminosäure)
Tab.	Tabelle
TEVC	<i>Two Electrode Voltage Clamp</i> (Zwei-Elektroden-Spannungsklemme)
TGF	<i>transforming growth factor</i>
V	Volt; Einheit der elektrischen Potentialdifferenz (Spannung)
wt	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

Das gesamte menschliche Nervensystem enthält mehr als 100 Milliarden Nervenzellen. Diese Nervenzellen sind in einem hochpräzisen Netzwerk miteinander verbunden, das es uns ermöglicht zu denken, zu fühlen und zu handeln. Dieses System aus komplex miteinander verknüpften Nervenzellen ist Voraussetzung für die Wahrnehmung unserer Umwelt und die Kommunikation mit unseren Mitmenschen. Es bildet die Grundlage für ein an unsere Umgebung sinnvoll angepasstes Leben (Kandel et al., 1996; Trepel, 1999).

In einem Netzwerk, das aus Milliarden von Nervenzellen (Neuronen) besteht und dabei so grundlegend für ein geordnetes Leben ist, spielt die Kommunikation zwischen den Neuronen eine zentrale und essentielle Rolle.

1.1 Erregungsleitung im Zentralnervensystem

Nervenzellen besitzen die Fähigkeit über weite Distanzen mit einer Vielzahl anderer Neurone zu kommunizieren. Im menschlichen Gehirn existieren ungefähr 10^{14} Verbindungen, über die Nervenzellen miteinander in Kontakt treten. Für die Zellkommunikation besitzen Nervenzellen spezielle Zellfortsätze, die in Axone und Dendriten unterteilt werden. Über die Dendriten empfängt ein Neuron viele verschiedene Informationen von anderen Nervenzellen und verarbeitet sie zu einer einzigen Antwort (Integration). Axone dienen der Weitergabe von Signalen. Bei den Signalen handelt es sich um elektrische Erregungen, die als Aktionspotentiale über das Axon fortgeleitet werden. Die Erregungsübertragung zwischen einzelnen Neuronen findet an bestimmten Verbindungsstellen statt, den Synapsen. Synapsen sind Orte, an denen kommunizierende Nervenzellen miteinander in Kontakt treten. Ein einzelnes Neuron bildet rund 1000 synaptische Verbindungen zu anderen Neuronen aus und empfängt noch mehr synaptische Eingänge. Man unterscheidet die chemische von der elektrischen Synapse. Im Zentralnervensystem ist vor allem die chemische Übertragung von Bedeutung. Bei der chemischen Synapse sind

die Neurone durch einen 20-40 nm großen Spalt, den sog. synaptischen Spalt, voneinander getrennt. Vor dem Spalt liegt das präsynaptische Neuron, dahinter das postsynaptische Neuron. Bei Eintreffen eines Aktionspotentials in die präsynaptische Nervenendigung findet lokal die Ausschüttung eines chemischen Überträgerstoffes (Neurotransmitters) statt. Die Transmittermoleküle werden in Vesikeln des präsynaptischen Neurons gespeichert und als Reaktion auf ein elektrisches Signal in den synaptischen Spalt entleert. Die freigesetzten Neurotransmitter diffundieren durch den Spalt zum postsynaptischen Neuron und binden dort an spezifische Rezeptoren in der Zellmembran. Dies bewirkt in der postsynaptischen Zelle das Öffnen (oder Schließen) von Ionenkanälen. Dadurch ändern sich die Membranleitfähigkeit und das Potential des postsynaptischen Neurons. Die Informationen, die ein Neuron über chemische Synapsen erhält, können erregend (exzitatorisch) oder hemmend (inhibitorisch) sein. Hemmende Synapsen führen meist zu einer Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran und erzeugen ein inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP). Erregende Synapsen depolarisieren die postsynaptische Membran und führen zu einem exzitatorischen postsynaptischen Potential (EPSP). Im Falle einer Depolarisation bis zur Feuerschwelle wird in der postsynaptischen Zelle ein Aktionspotential ausgelöst und dadurch die Weiterleitung des elektrischen Signals sichergestellt (Abb. 1.1).

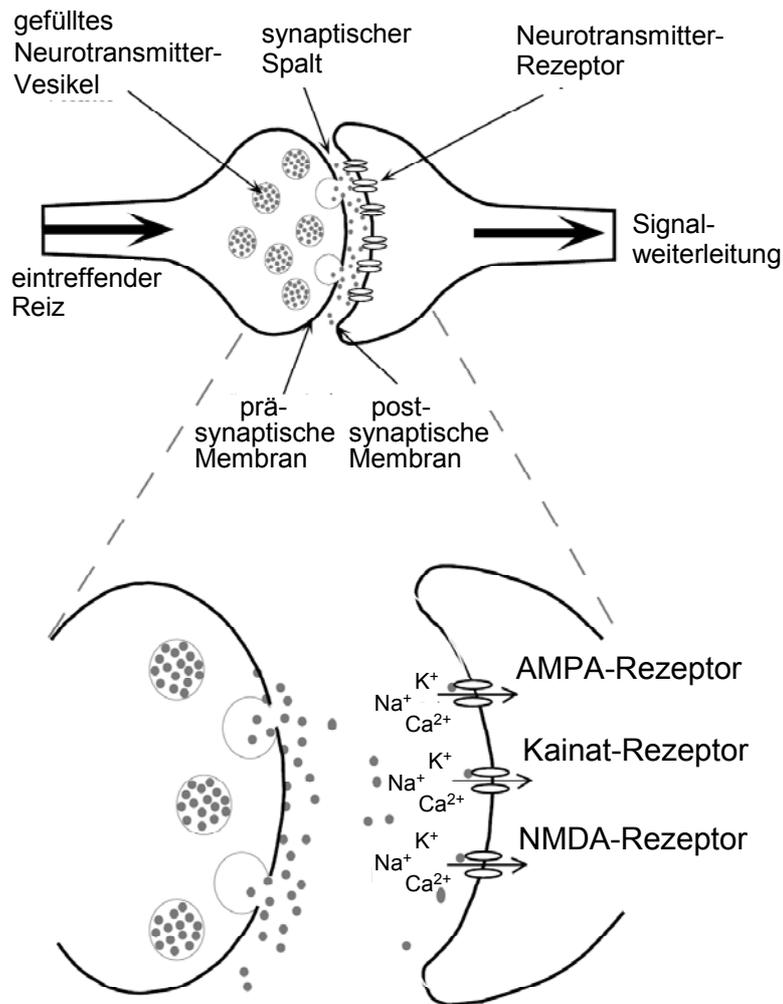


Abb. 1.1: Darstellung einer chemischen Synapse und der synaptischen Transmission. In der präsynaptischen Nervenendigung führt das Eintreffen eines elektrischen Reizes zur Fusion der mit Neurotransmitter gefüllten Vesikel mit der präsynaptischen Membran. Die Neurotransmittermoleküle werden in den synaptischen Spalt entleert und diffundieren zur postsynaptischen Membran. Dort binden sie an spezifische Rezeptoren und aktivieren diese dadurch. Durch die Bindung wird die Erregungweiterleitung initiiert.

1.2 Ionenkanäle

Die Zellmembran ist für Ionen nicht durchlässig und daher ein elektrischer Isolator. Elektrische Prozesse an Zellmembranen sind jedoch Voraussetzung für eine Vielzahl physiologischer Vorgänge. Dies gilt auch für die Signalleitung und den Informationsaustausch zwischen Neuronen im Nervensystem. Ein geregelter Ionenfluss durch die Zellmembran ist über Ionenkanäle möglich. Ionenkanäle sind integrale Membranproteine, die über eine hydrophile Pore den Intra- mit dem Extrazellulärraum verbinden. Sie sind meist selektiv für bestimmte Ionen. Durch die Kanalpore können Ionen wie Na^+ , K^+ , Cl^- und Ca^{2+} entsprechend ihres elektrochemischen Gradienten durch die Zellmembran diffundieren. Ionenkanäle stellen effektive elektrische Leiter dar. In Nervenzellen leiten Ionenkanäle Ionen mit sehr hoher Geschwindigkeit durch die Zellmembran. Durch einen einzelnen Kanal können bis zu 100 Millionen Ionen pro Sekunde fließen. Die Größe des Ionenstroms ist dabei abhängig von der Leitfähigkeit und der Offenwahrscheinlichkeit des Kanalproteins.

Ionenkanäle können verschiedene Konformationen annehmen (Gating), wodurch die Transportrate der Ionen verändert wird. Es gibt offene und geschlossene Zustände. Auslöser für Konformationsänderungen der Kanäle sind z.B.:

- Änderung der Membranspannung (spannungsgesteuerte Kanäle)
- Änderung von Transmitterkonzentrationen (ligandengesteuerte Kanäle)
- Mechanische Kräfte wie Zug oder Druck (mechanisch gesteuerte Kanäle)

Ligandengesteuerte (transmittergesteuerte) Ionenkanäle spielen bei der chemischen synaptischen Übertragung im Zentralnervensystem eine wesentliche Rolle. Sie sind Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

1.3 Glutamatrezeptoren

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische (erregende) Neurotransmitter im Zentralnervensystem der Wirbeltiere. Bei diesem Transmitter handelt es sich um eine Aminosäure, die im Gehirn und Rückenmark an Glutamatrezeptoren bindet und diese dadurch aktiviert. Glutamatrezeptoren sind wesentlich an der Entstehung erregender postsynaptischer Potentiale bei Neuronen im ZNS beteiligt und spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation synaptischer Prozesse im ZNS (Sheng und Kim, 2002; Sheng und Nakagawa, 2002). Im Rahmen der Plastizität des Nervensystems sind Glutamatrezeptoren an Vorgängen langanhaltender synaptischer Modifikation beteiligt (Sheng und Kim, 2002) und direkt involviert in kognitive Funktionen wie Gedächtnis und Lernen (Shimizu et al., 2000).

Eine übermäßige Freisetzung oder Zufuhr von Glutamat kann für Neurone toxisch sein. Die meisten Gehirnzellen besitzen Rezeptoren für Glutamat und reagieren bei Bindung der Aminosäure an den Rezeptor. Bei zu hohen Glutamatkonzentrationen kommt es zu einer Übererregung der Neurone und zum exzitatorischen Zelltod (Glutamatexzitotoxizität). Zellschädigung und Zelltod infolge exzessiver Glutamatfreisetzung sind bei der Pathogenese bestimmter Erkrankungen von Bedeutung. Beispiele hierfür sind neurodegenerative Erkrankungen (Meldrum und Garthwaite, 1990), wie Morbus Parkinson (Blandini et al., 1996), Morbus Alzheimer (Advokat und Pellegrin, 1992; Francis, 2005), Chorea Huntington (Storey et al., 1992) oder Amyotrophe Lateralsklerose (Appel, 1993), sowie Epilepsie (Dingledine et al., 1990) und ischämische Erkrankungen des Gehirns (Choi und Rothman, 1990; Turley et al., 2005).

Exzitotoxizität kann auch durch die Aufnahme von Glutamat mit der Nahrung ausgelöst werden. V.a. chinesische Gerichte enthalten Glutamat als Geschmacksverstärker. Das sog. China-Restaurant-Syndrom führt zu Kopfschmerzen, Übelkeit und Schwindel.

1.4 Einteilung der Glutamatrezeptoren

Die Glutamatrezeptoren werden in zwei Hauptklassen unterteilt. Man unterscheidet zwischen ionotropen Glutamatrezeptoren und metabotropen Glutamatrezeptoren.

Ionotrope Glutamatrezeptoren sind ligandengesteuerte Kationenkanäle, die Rezeptor und Ionenkanal in einem Makromolekül vereinigen („Rezeptorkanäle“). Die Anlagerung eines Liganden bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins, was zur Öffnung der Kanalpore führt.

Metabotrope Glutamatrezeptoren sind intrazellulär mit G-Proteinen gekoppelt. Der Rezeptor ist nicht integraler Bestandteil eines Ionenkanals. Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor löst intrazellulär eine sekundäre Signalkaskade aus, wodurch der biochemische Zustand der Zelle verändert wird. Metabotrope Glutamatrezeptoren können Ionenkanäle indirekt steuern.

Ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren sind nicht sequenzverwandt. Innerhalb der Hauptklassen unterscheidet man verschiedene Glutamatrezeptoruntereinheiten, die in Familien unterteilt werden (Abb. 1.2).

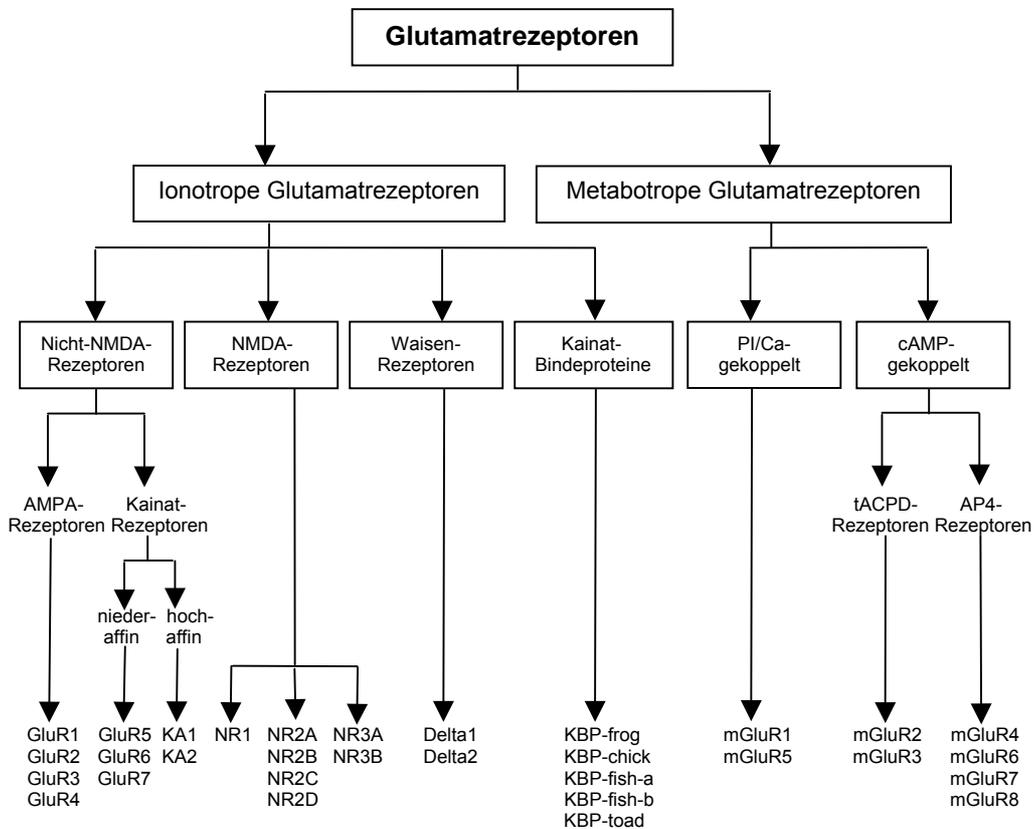


Abb. 1.2: Einteilung der Glutamatrezeptoren. Es werden zwei Hauptklassen unterschieden. Innerhalb der Hauptklassen werden die Glutamatrezeptoruntereinheiten in Familien unterteilt.

Ionotrope Glutamatrezeptoren werden entsprechend spezifischer Agonisten in α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionat (AMPA)-Rezeptoren, Kainat (KA)-Rezeptoren und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren unterteilt (Dingledine et al., 1999). AMPA- und Kainat-Rezeptoren werden zusammenfassend als Nicht-NMDA-Rezeptoren bezeichnet. Die sog. Waisenrezeptoren und Kainatbindeproteine gehören aus Homologiegründen ebenfalls zu den ionotropen Glutamatrezeptoren.

Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind Glutamatrezeptoruntereinheiten, die am Aufbau von Kainat- bzw. NMDA-Rezeptoren beteiligt sind.

1.5 Kainat-Rezeptoren

Kainat-Rezeptoren sind Kationenkanäle, die für Na^+ , K^+ und Ca^{2+} permeabel sind. Man unterscheidet Kainat-Rezeptoren mit niedriger Kainat-Affinität und Kainat-Rezeptoren mit hoher Affinität.

Zur Unterfamilie der niederaffinen Kainat-Rezeptoren gehören die Glutamatrezeptoruntereinheiten GluR5, GluR6 und GluR7. Sie werden zu den Kainat-Rezeptoren gezählt, da sie im Vergleich zu anderen Glutamatrezeptorunterfamilien eine hohe Affinität zu Kainat und eine vergleichsweise geringe Affinität zu Glutamat besitzen. Der K_D -Wert für Kainat liegt für GluR5 bei 70nM (Sommer et al., 1992), für GluR6 bei 95nM (Bettler et al., 1992) und für GluR7 bei 77nM (Bettler et al., 1992).

Die Glutamatrezeptoruntereinheiten KA1 und KA2 bilden die Unterfamilie der hochaffinen Kainat-Rezeptoren. Im Vergleich zu GluR5-7 besitzen sie weitaus größere Affinitäten für Kainat. Der K_D -Wert für Kainat liegt für KA1 bei 4,7 nM (Werner et al., 1991) und für KA2 bei 15 nM (Herb et al., 1992). KA1 und KA2 zeigen 69% Aminosäuresequenzidentität untereinander sowie 42-44% Aminosäuresequenzidentität mit den niederaffinen Kainat-Rezeptoren (GluR5, GluR6, GluR7).

Kainat-Rezeptoren kommen ubiquitär im Zentralnervensystem vor. Man findet sie sowohl an der Präsynapse als auch an der Postsynapse. Kainat-Rezeptoren tragen zur Entstehung exzitatorischer postsynaptischer Potentiale bei und modulieren die Freisetzung von Neurotransmittern (GABA, Glutamat) durch präsynaptische Mechanismen (Chittajallu et al., 1999; Mülle et al., 2000; Contractor et al., 2001; Kamiya, 2002). Es wurde gezeigt, dass präsynaptische Kainat-Rezeptoren zu exzitatorischen postsynaptischen Strömen (EPSC) an verschiedenen Typen von Synapsen beitragen (Frerking und Nicoll, 2000; Lerma et al., 2001). Kainat-Rezeptoren werden während der Gehirnentwicklung und durch neuronale Aktivität reguliert (Kidd und Isaac, 1999).

Alle Kainat-Rezeptoren können in *Xenopus laevis*-Oozyten exprimiert werden, wobei nicht alle Rezeptoren Ströme zeigen. GluR5 und GluR6 bilden in homomerer oder heteromerer Anordnung funktionelle Ionenkanäle aus und

können durch Glutamat, Kainat, Domoat und Quisqualat aktiviert werden. Bei Expression in *Xenopus*-Oozyten liefern sie messbare Ströme. GluR7 galt lange Zeit als nicht-funktionelle Untereinheit bezüglich seiner Ionenkanalfunktion. Für GluR7 ließen sich in *Xenopus laevis*-Oozyten keine Ströme messen (Bettler et al., 1992; Lomeli et al., 1992). Schiffer et al. zeigten für diese Untereinheit, dass sie Ionenkanalfunktion in HEK-293-Zellen aufweist, wenn sie mit Kainat oder Glutamat in Konzentrationen von größer als 10 mM aktiviert wird (Schiffer et al., 1997). Für die Messung von GluR7-Strömen in *Xenopus*-Oozyten sind solche hohe Agonisten-Konzentrationen jedoch nicht geeignet, da sie Artefakte auslösen.

Strutz et al. führten 2001 Domänenaustauschexperimente zwischen GluR7 und GluR6 durch und fanden, dass die L3-Domäne von GluR7 für die funktionellen Unterschiede beider Rezeptoren verantwortlich ist. Chimären von GluR7, die mindestens die L3-Domäne von GluR6 enthielten, zeigten agonisten-induzierte Ströme, die mit denen von GluR6wt vergleichbar waren und in *Xenopus*-Oozyten nach Aktivierung mit Agonisten in mikromolarer Konzentration gemessen werden konnten (Strutz et al., 2001). Des Weiteren generierten Strutz et al. verschiedene GluR7-Punktmutanten, von denen vier funktionell waren und nach Applikation eines Agonisten in mikromolarer Konzentration messbare Ströme in *Xenopus*-Oozyten lieferten. Alle Punktmutationen lagen in der L3-Domäne der Rezeptoruntereinheit. Die Punktmutante GluR7(K758N) zeigte dabei die größten Ströme unter allen GluR7-Mutanten verglichen mit den GluR6wt-Stromamplituden (~2% GluR6wt-Strom). Zum ersten Mal war es gelungen, GluR7-Punktmutanten mit physiologischen Agonistenkonzentrationen zu messen. Strutz et al. kamen zu dem Ergebnis, dass GluR7 nicht nicht-funktionell ist, sondern vielmehr einen Rezeptor mit extrem geringer Porenöffnungseffizienz darstellt, wobei die Determinanten für die geringe Effizienz der Ionenporenöffnung offensichtlich in der L3-Domäne von GluR7 lokalisiert sind (Strutz et al., 2001).

Für die Kainatrezeptoruntereinheiten KA1 und KA2 konnte bis jetzt keine Ionenkanalfunktion gefunden werden, wenn sie homomer oder heteromer (KA1-

KA2) in *Xenopus*-Oozyten exprimiert werden. KA1 und KA2 sind jedoch in der Lage funktionelle Heteromerkomplexe mit GluR5 oder GluR6 zu bilden.

Alle messbaren Kainat-Rezeptoren weisen bei Expression in *Xenopus*-Oozyten und nach Aktivierung durch Agonisten eine schnelle Desensitisierung auf, d.h. sie werden gegenüber dem Liganden schnell unempfindlich. Dies macht es unmöglich maximale Ströme zu messen. Um eine solche Desensitisierung zu verhindern kann bei elektrophysiologischen Messungen eine Inkubation der Oozyte mit dem Lektin Concanavalin A (ConA) vor Agonistenapplikation erfolgen. Danach werden Stromantworten deutlich potenziert gefunden.

GluR6 und GluR7wt weisen bei Expression in *Xenopus laevis*-Oozyten sehr unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften auf. GluR6 zeigt sehr große Ströme, GluR7wt-Ströme sind in *Xenopus*-Oozyten nicht messbar. Trotz dessen sind GluR6 und GluR7 in ihrer Aminosäuresequenz zu 86% identisch (Bettler et al., 1992). Beide Untereinheiten werden im Gehirn an ähnlichen Stellen exprimiert. Koexpressionsstudien zeigten, dass GluR7 bei heteromerer Expression mit GluR6 dessen Stromamplitude reduziert und eine negativ modulierende Rolle in heteromeren Kainat-Rezeptoren besitzt (Cui und Mayer, 1999; Strutz et al., 2001).

1.5.1 Die Kainatrezeptoruntereinheit GluR6

Die Kainatrezeptoruntereinheit GluR6 wird im Gehirn in Regionen ausgeprägt exprimiert, die für Lern- und Gedächtnisfunktionen wichtig sind, wie z.B. dem Hippocampus. Ebenso findet man GluR6 in zerebralen Strukturen, die der Motorik und der Motivationsausprägung dienen, wie den Basalganglien und dem Kleinhirn (Mulle et al., 1998). Mittels genetischer Deletion von GluR6 (Mulle et al., 1998) konnte gezeigt werden, dass diese Untereinheit eine wichtige und entscheidende Rolle für die synaptische Übertragung und die Plastizität im Hippocampus spielt (Bureau et al., 1999; Contractor et al., 2000; Contractor et al., 2001; Huettner, 2001). Über die Regulation von GluR6 war bis vor kurzem sehr wenig bekannt. Frühere Studien deuteten darauf hin, dass die

GluR6-Aktivität durch Proteinphosphorylierung moduliert wird (Wang et al., 1993).

Jamain et al. zeigten, dass GluR6 signifikant mit Autismus assoziiert ist (Jamain et al., 2002), einer Kontaktstörung, bei der die erkrankten Individuen zurückgezogen in ihrer eigenen Vorstellungs- und Gedankenwelt leben und eine eingeschränkte Fähigkeit besitzen, sozial adäquat zu interagieren. Jamain et al. führten ein Mutationsscreening bei betroffenen Individuen durch und fanden verschiedene SNPs (several nucleotide polymorphisms) im GluR6-Transkript. Einer der Polymorphismen zeigte einen Aminosäureaustausch (M867I) in einer hoch konservierten Domäne der zytoplasmatischen C-terminalen Region von GluR6.

Ob die Mutation M867I zu funktionellen Veränderungen von GluR6 führt, wurde von der Arbeitsgruppe nicht untersucht. Ebenfalls wurde nicht geklärt, ob die Mutation eventuell einen Effekt auf die Regulation von GluR6 hat.

1.6 Serum- und Glukokortikoid- induzierte Kinase (SGK)

Die Serum- und Glukokortikoid- induzierte Kinase (SGK) ist eine Proteinkinase, die zur Familie der Serin-/Threonin-Proteinkinasen gehört (Webster et al., 1993). Es sind drei Isoformen der SGK bekannt: SGK1, SGK2 und SGK3 (Webster et al., 1993; Kobayashi et al., 1999).

Das SGK1-Gen wurde 1993 von Webster und Mitarbeitern entdeckt und aus einer Rattenbrusttumorzelllinie geklont. Webster und Mitarbeiter fanden heraus, dass Exposition der Rattenbrusttumorzellen gegenüber Serum oder Glukokortikoiden zu einem starken Anstieg der SGK1-mRNA innerhalb von 30 min führt. Sie zeigten, dass die gesteigerte SGK1-Gen-Transkription mit einem Anstieg des SGK1-Protein-Levels in der Zelle verbunden ist (Webster et al., 1993). Neben Serum und Glukokortikoiden sind mittlerweile viele andere Agonisten bekannt, die die SGK1-Gen-Transkription in Zellen und Geweben induzieren (Lang und Cohen, 2001) und durch Beeinflussung der Gen-Transkription den SGK1-Protein-Level in der Zelle regulieren (Pearce, 2003).

Im Gegensatz zu SGK1 stehen SGK2 und SGK3 nicht unter transkriptioneller Kontrolle durch Glukokortikoide (Lang und Cohen, 2001). SGK1, SGK2 und SGK3 werden in einer PI3-Kinase-abhängigen Signalkaskade durch die Kinase PDK1 phosphoryliert und aktiviert (Kobayashi und Cohen, 1999; Kobayashi et al., 1999; Park et al., 1999). Die Kaskade wird getriggert durch oxidativen Stress, Insulin und Wachstumsfaktoren wie IGF-1 oder TGF- β (Lang und Cohen, 2001). Für alle drei SGK-Isoformen wurde gezeigt, dass sie verschiedene Ionenkanäle regulieren wie die Na⁺-Kanäle ENaC und SCN5A oder die K⁺-Kanäle Kv1.3 und KCNE1/KCNQ1 (Lang et al., 2003). Die K⁺-Kanäle KCNQ4 und Kv4.3 werden ebenfalls durch SGK reguliert (Seebohm et al., 2005; Baltaev et al., 2005). Alle drei SGK-Isoformen werden im Gehirn exprimiert (Waldegger et al., 1997; Kobayashi et al., 1999; Wärntges et al., 2002) und stellen potentielle Kandidaten für die Regulation neuronaler Ionenkanäle dar. SGK1 steht darüber hinaus in Zusammenhang mit dem räumlichen Lernvermögen bei Ratten (Tsai et al., 2002). Tsai et al. fanden, dass SGK1-mRNA-Level im Hippocampus von Ratten mit deren räumlichen Lernvermögen korreliert. Bei schnell lernenden Ratten ist der SGK1-mRNA-Level im Hippocampus fast vierfach höher als bei langsam lernenden Ratten. Besonders hoch ist die Expression von SGK1 in der CA1-, CA3-Region und im Gyrus dentatus des Hippocampus von schnell lernenden Ratten (Tsai et al., 2002).

1.6.1 Glukokortikoide und SGK-Isoformen als Regulatoren von GluR6

Glukokortikoide werden in psychischen und physischen Stresssituationen vermehrt ausgeschüttet und verbessern die Gedächtnisleistung unter Stress durch Stimulation neuronalen Lernens. Sie induzieren die Gen-Transkription der SGK1, die mit einem gesteigerten Lernvermögen bei Ratten in Zusammenhang steht. Wie SGK1 oder Glukokortikoide neuronale Funktion beeinflussen ist unklar.

Strutz-Seebohm et al. fanden, dass GluR6 durch Glukokortikoidhormone und Isoformen der SGK reguliert wird (Strutz-Seebohm et al., 2005a).

In einem ersten Teil ihrer Untersuchungen zeigten Strutz-Seebohm et al., dass GluR6 im Hippocampus von Mäusen in allen Regionen exprimiert wird, vorwiegend jedoch in der CA3-Region und dem Gyrus dentatus des Hippocampus, und dass Behandlung von Mäusen mit dem Glukokortikoid Dexamethason zu einer signifikanten Steigerung der GluR6-Expression in Neuronen der CA3-Region und des Gyrus dentatus im Hippocampus führt. Astrozyten, die GluR6 ebenfalls exprimieren, zeigten keine Steigerung der GluR6-Expression. Immunhistochemische Färbungen und Patch-clamp-Messungen von hippocampalen Neuronen in Primärkulturen ergaben eine vermehrte GluR6-Proteinexpression und vergrößerte kainatinduzierte Ströme nach Zugabe von Dexamethason und TGF- β zum Kulturmedium (Strutz-Seebohm et al., 2005a).

In einem zweiten Teil ihrer Arbeit untersuchten Strutz-Seebohm et al. die mögliche Wirkung von SGK-Isoformen auf GluR6. Sie fanden, dass Koexpression von GluR6 mit den SGK-Isoformen in *Xenopus laevis*-Oozyten zu einer signifikanten Steigerung der GluR6-Proteinexpression in der Plasmamembran führt. SGK1 hat dabei den stärksten Effekt. Voltage-clamp-Messungen an *Xenopus*-Oozyten, die GluR6 mit den SGK-Isoformen koexprimierten, ergaben signifikant gesteigerte Ströme. Koexpression mit SGK1 steigerte den GluR6-Strom am stärksten. Strutz-Seebohm et al. zeigten außerdem, dass SGK1-RNA im Hippocampus von Mäusen exprimiert wird (Strutz-Seebohm et al., 2005a).

Die Ergebnisse deuten auf einen neuen Mechanismus in der Regulation von GluR6 hin. Strutz-Seebohm et al. zeigten, dass sowohl das Glukokortikoid Dexamethason (\pm TGF- β) als auch SGK1 einen stimulierenden Einfluss auf GluR6 haben. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass SGK1, eine Kinase, die durch Glukokortikoide reguliert wird und mit einem gesteigerten Lernvermögen bei Ratten in Verbindung steht, eine Vermittlerrolle spielt zwischen Glukokortikoiden und neuronaler Funktion – nicht zuletzt dadurch, dass sie die GluR6-Proteinexpression in der Zellmembran und die GluR6-Ströme in Oozyten

steigert. Die fehlende Steigerung der GluR6-Expression in Astrozyten, von denen bekannt ist, dass sie keine SGK1 exprimieren (Wärntges et al., 2002), und die Tatsache, dass im Hippocampus von Mäusen SGK1-RNA exprimiert wird (Strutz-Seebohm et al., 2005a), unterstützen diese Vermutung.

1.6.2 SGK-Isoformen als Regulatoren von GluR1

Strutz-Seebohm et al. zeigten für die zu den AMPA-Rezeptoren gehörende Glutamaterezeptoruntereinheit GluR1, dass diese ebenfalls durch SGK-Isoformen reguliert wird (Strutz-Seebohm et al., 2005b; Strutz-Seebohm et al., 2006a). SGK3 und in geringerem Maße SGK2, jedoch nicht SGK1, steigern die glutamatinduzierten Ströme und die GluR1-Proteinexpression in der Plasmamembran von *Xenopus*-Oozyten. Bei Experimenten mit SGK3-Knockout-Mäusen ($Sgk3^{-/-}$) war die hippocampale GluR1-Proteinexpression bei Mäusen, die SGK3 nicht exprimieren ($Sgk3^{-/-}$), signifikant geringer als bei Wildtyp-Mäusen ($Sgk3^{+/+}$), die SGK3 im Hippocampus exprimieren (Strutz-Seebohm et al., 2005b).

1.7 Potentielle Modulatorproteine von GluR6

Strutz-Seebohm et al. fanden, dass GluR6 durch Glukokortikoide und SGK-Isoformen reguliert wird, wobei die Kinase SGK1 im Mittelpunkt der Studie steht (Strutz-Seebohm et al., 2005a). Außerdem liegen Hinweise vor, dass die Aktivität von GluR6 durch Proteinphosphorylierung moduliert wird (Wang et al., 1993). Es wird vermutet, dass SGK GluR6 nicht direkt phosphoryliert, da GluR6 keine putative SGK-Phosphorylierungsstelle besitzt (Strutz-Seebohm, 2006b). Es muss also einen oder mehrere Zwischenschritt(e) geben, über den/die die Wirkung der SGK auf GluR6 vermittelt wird. Diese(r) Zwischenschritt(e) wurde(n) bis jetzt nicht aufgedeckt. Des Weiteren ist über andere regulatorische Mechanismen von GluR6 wenig bekannt. Es ist daher von Interesse weitere Modulatoren der GluR6-Aktivität zu identifizieren.

Potentielle Kandidaten für die Modulation von GluR6 stellen die Proteine NDRG1 (*N-myc downstream-regulated gene 1*), NDRG2 (*N-myc downstream-regulated gene 2*), mTOR (*mammalian target of rapamycin*), RIL (*reversion-induced LIM protein*), Yotiao (*A-kinase anchoring protein (AKAP)*), CKAP (*cytoskeleton associated protein*) und Grb2 (*growth factor receptor-bound 2*) dar. NDRG1 und NDRG2 sind Proteine, für die gezeigt wurde, dass sie durch SGK1 phosphoryliert werden (Murray et al., 2004). Die Proteinkinase mTOR wird vermutlich ebenfalls durch SGK1 phosphoryliert (Shojaiefard et al., 2006a). NDRG1, NDRG2 und mTOR sind damit Kandidaten, die eine potentielle Rolle bei der Vermittlung der SGK1-Wirkung auf GluR6 spielen. RIL ist ein regulatorisches Protein der AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR1 (Schulz et al., 2004). Die Arbeitsgruppe Schulz hat gezeigt, dass RIL direkt mit GluR1 interagiert und einen stimulierenden Einfluss auf AMPA-Rezeptoren besitzt, die GluR1 enthalten. Ob RIL einen regulatorischen Einfluss auf GluR6 als Vertreter der Kainatrezeptoren hat, wurde noch nicht untersucht. Yotiao ist ein weiteres interessantes Protein, welches als möglicher Kandidat für die Regulation von GluR6 in Frage kommt. Für Yotiao wurde gezeigt, dass es mit der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR1 und der Kaliumkanaluntereinheit KCNQ1 interagiert (Lin et al., 1998; Marx et al., 2002). Yotiao reguliert NMDA-Rezeptorkanäle und den I(Ks)-Kaliumkanal, indem es die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) oder die Protein-Phosphatase 1 (PP1) in die Nähe der Kanäle bringt („Targeting“) (Westphal et al., 1999; Feliciello et al., 1999; Marx et al., 2002). Des weiteren fungiert Yotiao in der Regulation des I(Ks)-Kaliumkanals nicht nur als passives Adapterprotein, sondern ist aktiv an der Regulation des Kanals beteiligt (Kurokawa et al., 2004; Chen und Kass, 2006). CKAP und Grb2 sind typische Adapterproteine, die Kinasen in die Umgebung ihrer Substrate bringen („Targeting“). CKAP und Grb2 sind daher ebenfalls interessante Proteine, die als potentielle Modulatoren der GluR6-Aktivität in Frage kommen.

1.8 NMDA-Rezeptoren

NMDA-Rezeptoren sind ionotrope Glutamatrezeptoren, die eine besondere Spezifität für NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) besitzen (Watkins und Evans, 1981). Es handelt sich um Kationenkanäle, die sowohl für Na^+ und K^+ als auch für Ca^{2+} permeabel sind und Glycin als Koagonist benötigen. Die Kanäle besitzen eine höhere Leitfähigkeit als die Nicht-NMDA-Rezeptorkanäle und zeichnen sich durch einen spannungsabhängigen Mg^{2+} -Block aus. Bei negativen Membranpotentialen öffnen die Rezeptorkanäle nicht, weil ihre Poren durch extrazelluläres Mg^{2+} blockiert werden. Bei starker Depolarisation der Membran wird Mg^{2+} durch elektrostatische Abstoßung aus der Pore getrieben und die Kanäle öffnen. Im Bereich des Ruhemembranpotentials trägt der Strom durch einen NMDA-Rezeptor-Kanal deshalb nicht wesentlich zum normalen postsynaptischen Potential bei. Öffnen die Kanäle in Anwesenheit von Glutamat und Glycin und bei ausreichender Depolarisation, so trägt der Strom zur späten Phase des EPSP bei, da die Kanäle sehr langsam öffnen und schließen. Der Ca^{2+} -Einstrom durch NMDA-Rezeptorkanäle bewirkt in der postsynaptischen Zelle eine Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Enzyme und die Auslösung von second-messenger-Kaskaden. Die Glutamatexzitotoxizität beruht vermutlich auf schädlichen zellulären Vorgängen, die durch einen übermäßigen Ca^{2+} -Einstrom durch NMDA-Rezeptorkanäle getriggert werden.

NMDA-Rezeptoren spielen eine grundlegende Rolle bei der Induktion von Langzeitpotenzierung (long-term potentiation, LTP) im Hippocampus (Collingridge et al., 1983), der für die Gedächtnisfunktion wichtig ist. Das Phänomen der LTP (Bliss und Lomo, 1970) beobachtet man an synaptischen Eingängen, die durch eine hochfrequente Salve von Aktionspotentialen stark aktiviert werden. Postsynaptische Potentiale werden dann über eine längere Zeit deutlich potenziert gefunden. Langzeitpotenzierung und die damit verbundene Änderung der synaptischen Stärke sind höchstwahrscheinlich an Speicherungsprozessen von Gedächtnisinhalten im Hippocampus beteiligt und stellen vermutlich zelluläre Grundlagen von Lernvorgängen dar. In der CA1-Region des Hippocampus wird LTP durch die Aktivierung von NMDA-

Rezeptoren bei starker Depolarisation der Membran ausgelöst. Durch die Aktivierung kommt es zu einem Ca^{2+} -Einstrom durch die NMDA-Rezeptorkanäle in die Zelle. Das Ca^{2+} löst intrazellulär eine second messenger-Kaskade aus, die letztlich zu einer anhaltenden Verstärkung der synaptischen Übertragung führt. Blockiert man die NMDA-Rezeptoren im Hippocampus durch intraventrikuläre Gabe eines Antagonisten, so kann gezeigt werden, dass bei Ratten das räumliche Lernvermögen vermindert ist und die Ausbildung von LTP supprimiert wird. Das visuelle Lernen ist dabei nicht beeinträchtigt (Morris et al., 1986). Andere Experimente zeigen, dass der Ca^{2+} -Einstrom durch NMDA-Rezeptorkanäle und die damit verbundene Auslösung einer spezifischen Signalkaskade essentiell sind für die Induktion von LTP im Hippocampus und dass NMDA-Rezeptoren an hippocampalen Gedächtnisfunktionen, wie dem räumlichen Lernen, beteiligt sind (Silva et al., 1992a; Silva et al., 1992b; Sakimura et al., 1995; Tsien et al., 1996; Lee und Kesner, 2002).

1.9 Ziele dieser Arbeit

Jamain et al. zeigten in ihrer Studie, dass ein Polymorphismus von GluR6 signifikant mit Autismus assoziiert ist. Sie fanden bei ihrem Mutationsscreening bei betroffenen Individuen einen Aminosäureaustausch (M867I) in einer hochkonservierten Domäne der zytoplasmatischen C-terminalen Region von GluR6 (Jamain et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit soll geklärt werden, ob die Mutation M867I zu einer funktionellen Veränderung von GluR6 führt. Mittels Oozyten-Expressionssystem und Voltage-clamp-Technik sollen die Stromamplituden von GluR6wt (Wildtyp) und GluR6(M867I) miteinander verglichen werden. Des Weiteren sollen molekulare Mechanismen der Plasmamembranexpression von GluR6wt und GluR6(M867I) im Vergleich untersucht werden. Dies kann Aufschluss geben über regulatorische Mechanismen von GluR6.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollen weitere Modulatoren der GluR6-Aktivität identifiziert werden. Als potentielle Kandidaten kommen die Proteine NDRG1,

NDRG2, mTOR, RIL, Yotiao, CKAP und Grb2 in Frage. Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden: Besitzen diese Proteine einen Effekt auf den GluR6-Strom?

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, zu klären, ob GluR7 als weiterer Vertreter der Kainat-Rezeptoren ebenfalls durch SGK-Isoformen reguliert wird. Dies soll mittels Oozyten-Expressionssystem und Voltage-clamp-Technik untersucht werden. Da GluR7wt-Ströme in *Xenopus*-Oozyten nicht messbar sind, wird mit der Punktmutante GluR7(K758N) gearbeitet, die nach Applikation eines Agonisten in mikromolarer Konzentration messbare Ströme in *Xenopus*-Oozyten liefert (Strutz et al., 2001).

Des Weiteren soll untersucht werden, ob SGK-Isoformen auch einen Effekt auf NMDA-Rezeptoren haben. Im Rahmen dieser Arbeit soll deshalb geklärt werden: Hat SGK einen Effekt auf den NMDA-Rezeptorkomplex NR1-1a/NR2B als Vertreter der NMDA-Rezeptoren?

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Lösungen und Substanzen

1.) ND-96-Lösung

ND-96-Lösung wurde zunächst als Stammlösung in 10-facher Konzentration hergestellt. Eine Grobeinstellung des pH-Wertes erfolgte mit 10 M NaOH. Für die Feineinstellung wurde 1 M NaOH tropfenweise hinzugegeben. Die 10-fach konzentrierte Stammlösung wurde bei +4°C aufbewahrt. Ihr pH-Wert wurde regelmäßig kontrolliert und Abweichungen wurden korrigiert.

Für Experimente und die Herstellung antibiotikahaltiger ND-96-Lösung wurden entsprechende Mengen der höher konzentrierten Stammlösung mit destilliertem Wasser auf die einfache Konzentration verdünnt (Tab. 2.1, 2.2).

Tab. 2.1: Zusammensetzung der ND-96-Lösung (Badlösung)

Substanz	Firma	Molarität
NaCl	Merck	96 mM
KCl	Merck	2 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Roth	1,8 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Merck	1 mM
HEPES	Roth	5 mM

pH-Wert: 7,4

Tab. 2.2: Zusammensetzung der antibiotikahaltigen ND-96-Lösung (Oozytenaufbewahrungslösung)

Substanz	Firma	Molarität
NaCl	Merck	96 mM
KCl	Merck	2 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Roth	1,8 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Merck	1 mM
HEPES	Roth	5 mM
Theophyllin	Sigma	0,5 mM
Natriumpyruvat	Sigma	2,5 mM
Gentamycin	Sigma	Massenkonzentration: 50 µg/ml

pH-Wert: 7,4

HEPES ist N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) und hat Pufferfunktion. Bakterienwachstum wurde mit einem Antibiotikum (Gentamycin) vorgebeugt. ND-96-Badlösung und antibiotikahaltige ND-96-Aufbewahrungslösung wurden bei +4°C gelagert.

2.) Normal frog ringer

Normal frog ringer (NFR) wurde als Badlösung für die Messung von NMDA-Rezeptorströmen verwendet. Die Lösung war magnesiumfrei, da Magnesium die NMDA-Rezeptorkanäle blockiert und dadurch die Ausbildung eines NMDA-Rezeptorstroms durch die Oozytenmembran verhindert. NFR wurde zunächst als Stammlösung in 10-facher Konzentration hergestellt. Eine Grobeinstellung des pH-Wertes erfolgte mit 10 M NaOH. Die Feineinstellung des pH-Wertes erfolgte durch tropfenweise Zugabe von 1 M NaOH. Die 10-fach konzentrierte Stammlösung wurde bei +4°C aufbewahrt. Der pH-Wert wurde regelmäßig kontrolliert und Abweichungen wurden korrigiert. Für die Experimente wurde

eine entsprechende Menge der 10-fach konzentrierten Stammlösung mit destilliertem Wasser auf die einfache Konzentration verdünnt (Tab. 2.3).

Tab. 2.3: Zusammensetzung von Normal frog ringer

Substanz	Firma	Molarität
HEPES	Roth	10 mM
NaCl	Merck	115 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Roth	1,8 mM
KCl	Merck	2,5 mM

pH-Wert: 7,4

3.) Agonistenlösungen

Agonistenlösungen wurden aus 100 mM Glutamat- bzw. 10 mM Glycin-Lösung durch Verdünnen mit der entsprechenden Badlösung hergestellt (Tab. 2.4, 2.5).

Tab. 2.4: Glutamat-Lösung (Messung von Kainatrezeptorströmen)

Substanz	Firma	Molarität
Glutamat	Tocris	300 µM

Verwendete Badlösung: ND-96-Lösung

Tab. 2.5: Glutamat-Glycin-Lösung (Messung von NMDA-Rezeptorströmen)

Substanz	Firma	Molarität
Glutamat	Tocris	100 μ M
Glycin	Tocris	10 μ M

Verwendete Badlösung: NFR

4.) Concanavalin A-Lösung

Concanavalin A (Con A) wurde in ND-96-Lösung angesetzt. Die Con A-Lösung war 100 mM konzentriert und wurde bei -20°C aufbewahrt (Tab. 2.6). Vor Experimenten mit Con A wurde die Lösung aufgetaut und zimmertempertiert für die Versuche verwendet.

Tab. 2.6: Con A-Lösung

Substanz	Firma	Molarität
Concanavalin A	Sigma	100 mM

5.) cRNA-Lösung

cRNA-Lösung wurde molekularbiologisch hergestellt und hochkonzentriert bei -70°C gelagert. Für Injektionsarbeiten wurden die benötigten cRNA-Lösungen vorsichtig aufgetaut und ständig auf Eis gekühlt. Niedrigere Konzentrationen wurden durch Verdünnen der cRNA-Lösung mit DEPC-Wasser hergestellt.

6.) OR-2-Lösung

Frisch entnommene Oozyten aus *Xenopus laevis*-Fröschen wurden in OR-2-Lösung zwischengelagert (Tab. 2.7).

Tab. 2.7: Zusammensetzung der OR-2-Lösung

Substanz	Firma	Molarität
NaCl	Merck	82,5 mM
KCl	Merck	2 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Merck	1 mM
HEPES	Roth	5 mM

pH-Wert: 7,4

7.) Kollagenase-Lösung

Zur Vereinzelung und Defollikulierung wurden frisch entnommene Oozyten nach Zwischenlagerung in OR-2-Lösung in 20 ml Kollagenaselösung geschwenkt. Die Kollagenaselösung wurde durch Mischen von 20 ml OR-2-Lösung mit 40 mg Kollagenase (Worthington, Typ II, USA) hergestellt. OR-2-Lösung war calciumfrei, da Calcium die Wirkung der Kollagenase hemmt.

8.) Tricain-Lösung

Für die Betäubung von *Xenopus laevis*-Fröschen zur operativen Entnahme von Oozyten wurde eine ca. 0,1%ige Tricain-Lösung (3-Aminobenzoessäureethylester-Lösung) verwendet. Dafür wurden 975 mg Tricain (Sigma, Deutschland) mit 1l H₂O (Leitungswasser) gemischt.

2.2 *Xenopus laevis*-Oozyten als Expressionssystem

Für alle Experimente dienten Froschoozyten als Modellsystem für die Expression von Proteinen. Die Oozyten stammen von Weibchen des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* und stellen ein sehr häufig gebrauchtes Expressionssystem für elektrophysiologische Untersuchungen dar. *Xenopus laevis*-Oozyten sind in der Lage exogene, Oozyten-fremde mRNA effizient in Proteine zu translatieren. Die gebildeten Proteine werden in der Zelle posttranslational modifiziert und in der Oozyte korrekt an ihren Bestimmungsort geleitet. Dadurch ist es möglich verschiedene Proteine wie z.B. Ionenkanäle, Membranrezeptoren oder Transportproteine in einer *Xenopus*-Oozyte funktionell zu exprimieren und dadurch ihre Funktion in einem lebenden System, also *in vivo* und nicht *in vitro* zu untersuchen. Die Oozyten von *Xenopus laevis* besitzen den Vorteil, dass sie durch ihre Größe (Stadium V, Zelldurchmesser ca. 1-1,3 mm) relativ einfach in ihrer Präparation, Lagerung und Handhabung sind. Im Gegensatz zu Zellkulturen erfordern sie keine strikt sterilen Bedingungen. Ein Nachteil ist, dass man relativ lange warten muss bis die injizierte mRNA translatiert und die Proteine in die Plasmamembran eingebaut worden sind. Außerdem können jahreszeitliche Einflüsse sowie individuelle Unterschiede zwischen den Froschweibchen nicht sicher ausgeschlossen werden.

2.2.1 Operative Entnahme der Oozyten aus *Xenopus laevis*

Die operative Entnahme von Oozyten aus weiblichen *Xenopus laevis*-Fröschen erforderte zunächst die Betäubung eines erwachsenen, weiblichen Krallenfrosches. Hierfür wurde das Tier für ca. 15-20 min in 1 Liter einer ca. 0,1%igen Tricain-Lösung gesetzt. Der vollständig narkotisierte Frosch wurde anschließend in einer Operationsschale mit dem Rücken auf Eis gelegt und sein Körper weitgehend mit Eis bedeckt. Die Kühlung diente der Aufrechterhaltung der Betäubung und der Minimierung möglicher Blutungen während der Operation. Es folgten die Reinigung und Desinfektion der

Froschhaut im Bereich des späteren Schnittes mit 70%igem Ethanol. Die Bauchhaut wurde mit einer Pinzette angehoben und mit einem sterilen Skalpell in der Leistengegend eine ca. 1cm lange Öffnung in die Bauchhaut geschnitten. Die darunter liegende Muskelfaszie und Bauchdeckenmuskulatur sowie Peritoneum wurden ebenfalls durch einen ca. 1cm langen Schnitt durchtrennt. Durch diesen operativ angelegten Zugang zum Bauchraum wurde mit einer Pinzette das Ovar zwischen den Bauchorganen aufgesucht und durch die Öffnung nach außen gezogen. Die Ovarialsäcke wurden mit einer feinen Schere abgetrennt und in OR-2-Lösung gelegt. Reste des Ovars wurden wieder zurück in den Bauchraum geschoben. Peritoneum, Muskelschicht, Faszie und Bauchhaut wurden anschließend mit resorbierbarer Operationsnähseide zugenäht. Nach dem Wundverschluss wurde das Froschweibchen mit Leitungswasser abgespült, um Restbestände des Narkosemittels zu entfernen. Bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose wurde das Tier in einen Behälter mit wenig Leitungswasser gesetzt. Es war darauf zu achten, dass der Kopf des Frosches nicht unter Wasser tauchte, da sonst Erstickung drohte. Um das Tier in dieser Zeit vor Austrocknung zu schützen, wurde der Rücken des Frosches mit einem wassergetränkten Zelltuch bedeckt. Nach vollständigem Erwachen aus der Narkose konnte der Frosch wieder zurück in sein ursprüngliches Wasserbecken gesetzt werden.

2.2.2 Präparation der Oozyten

Die entnommenen Ovarialsäcke wurden in der OR-2-Lösung mit Pinzette und Schere mechanisch zerteilt. Die so entstandenen Ovarfragmente sollten nicht mehr als 5-10 Oozyten enthalten. Die mechanische Zerteilung der Ovarialsäcke diente der Erleichterung des anschließenden Kollagenaseverdaus. Nach mehrmaligem Waschen mit OR-2-Lösung wurden die Ovarfragmente zur Vereinzelung und Defollikulierung der Oozyten für 2-3h in 20ml Kollagenase-Lösung geschwenkt. Die Kollagenasebehandlung erfolgte bei Zimmertemperatur und auf einem Schüttler, der auf 20 Umdrehungen pro

Minute eingestellt war. Nach Beendigung des Kollagenaseverdaus wurden die Oozyten mehrfach mit ND-96-Lösung gewaschen, um die Zellen vollständig von Kollagenase zu befreien. Das erhaltene Gemisch aus Oozyten enthielt Zellen unterschiedlichster Wachstums- und Reifestadien. Unter einem Stereomikroskop wurden solche Oozyten aussortiert, die sich in einem Entwicklungsstadium V oder VI befanden und unbeschädigt aussahen. Die selektierten Oozyten wurden in antibiotikahaltiger ND-96-Lösung bei 18°C aufbewahrt.

2.2.3 Mikroinjektion von cRNA in Oozyten

Unter einem Stereomikroskop erfolgte die Mikroinjektion von cRNA in Oozyten am ersten Tag nach Entnahme aus dem Frosch. Um einen Abbau der cRNA durch RNasen zu verhindern wurde mit Latex-Handschuhen gearbeitet. Außerdem wurden RNase-freie Injektionskapillaren, Kulturschälchen und Pipettenspitzen verwendet. Die Herstellung der Injektionskapillaren erfolgte mit Hilfe eines Mikroelektrodenpullers (DMZ, Deutschland). Glaskapillaren (Glass replacement 3,5 nl, WPI, USA) wurden hier zu Injektionskapillaren mit sehr feinen langen Spitzen ausgezogen. Unter dem Stereomikroskop wurden die Spitzen anschließend mit einer Pinzette zurückgebrochen, um den Öffnungsdurchmesser der Kapillarspitzen auf ca. 10-15µm zu erweitern. Die Öffnungen der Spitzen waren somit groß genug für ein problemloses Aufziehen und Abgeben der cRNA-Lösung bei der Injektion. Gleichzeitig waren die Kapillarspitzen noch so fein, dass eine übermäßige Verletzung der Oozytenmembran beim Injizieren weitgehend verhindert werden konnte. Die Injektion der Oozyten erfolgte mit einem vollautomatischen Nanoliter-2000-Injektor (WPI inc., Florida, USA). Eine Injektionskapillare wurde zunächst luftblasenfrei mit Paraffinöl (Sigma, Deutschland) gefüllt und auf den Kolben des Nanoliterinjektors gesteckt. Ca. 3µl der entsprechenden cRNA-Lösung wurden auf ein Kulturschälchen pipettiert und von dort aus mit Hilfe des Nanoliterinjektors in die Injektionskapillare luftblasenfrei aufgezogen. Die zu

injizierenden Oozyten wurden zur Fixierung auf ein Gitternetz gelegt und waren ständig von antibiotikahaltiger ND-96-Lösung umgeben. In einem Winkel von ca. 45° wurde die Spitze der mit cRNA gefüllten Injektionspipette an die jeweilige zu injizierende Oozyte herangeführt. Durch leichten Druck wurde die Membran mit der Kapillarspitze vorsichtig durchstoßen und die Oozyte mit 60nl cRNA-Lösung injiziert. Dies entsprach je nach Versuch folgenden Mengen an injizierter cRNA/Oozyte: 4-8ng GluR6-cRNA, 10ng GluR7-cRNA, 4ng NR1-1a/NR2B-cRNA, 10ng Rab-cRNA, 6ng CKAP-cRNA, 6ng Yotiao-cRNA, 6ng Grb2-cRNA, 6ng mTOR-cRNA, 6ng RIL-cRNA, 6ng NDRG1-cRNA, 6ng NDRG2-cRNA, 6ng SGK-cRNA oder 6ng PKB-cRNA. Eine erfolgreiche Injektion konnte anhand des Anschwellens des Zellkörpers beobachtet werden. Bei der Injektion war darauf zu achten, dass die cRNA-Lösung stets in die vegetative Hemisphäre (helle Hemisphäre) der Oozyte injiziert wurde. In der animalen Hemisphäre befindet sich der Zellkern, der durch die Injektion nicht verletzt werden sollte. Nach der Injektion wurden die Oozyten auf Kulturschälchen verteilt und dort in antibiotikahaltiger ND-96-Lösung bei 18°C aufbewahrt. Nach 5-7 Tagen waren genügend Proteine der jeweiligen cRNA exprimiert, so dass die Oozyten für elektrophysiologische Messungen verwendet werden konnten.

2.3 Elektrophysiologische Messungen mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Alle elektrophysiologische Messungen wurden mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode (Two-Electrode-Voltage-Clamp-Method, TEVC-Method) durchgeführt. Mittels dieser Methode kann der Gesamtstrom einer Oozyte unter unveränderten intrazellulären Bedingungen gemessen werden. Die Zelle wird dabei auf ein Potential E_c geklemmt, das vom Experimentator vorher festgelegt wurde. Es werden zwei intrazelluläre Mikroelektroden benötigt. Eine der beiden Mikroelektroden ist die Spannungselektrode E' . Sie misst das Membranpotential E der Oozyte gegen eine geerdete

Referenzelektrode im Bad. Die zweite Mikroelektrode ist die Stromelektrode I' , über die ein Strom I in die Zelle injiziert werden kann. In einem Rückkopplungsverstärker (FBA= feedback amplifier) wird das gemessene Membranpotential E mit dem vom Experimentator festgelegten Potential E_c verglichen. Bei Potentialdifferenzen wird über die Mikroelektrode I' der Strom I in die Oozyte injiziert, so dass das gewünschte Potential E_c zunächst erreicht und dann gehalten werden kann. Der applizierte Strom I , der die Zelle auf das Potential E_c klemmt, wird gemessen (Abb. 2.1).

Werden Ionenkanäle in der Zellmembran einer Oozyte aktiviert, so kommt es zu einem Ionenstrom in die Zelle bzw. aus der Zelle. Dies führt zu intrazellulären Spannungsänderungen. Kompensatorisch wird die von der Elektrode I' in die Zelle injizierte Strommenge geändert, um die Oozyte auf dem vorgegebenen Potential E_c zu halten. Der zur Kompensation zusätzlich benötigte Strom verhält sich dabei „spiegelbildlich“ zum durch die Membran fließenden Ionenstrom. Ein Kationeneinstrom und/oder ein Anionenausstrom (größere positive Ladungsdichte im Oozyteninneren) werden durch die Erhöhung eines negativen Kompensationsstroms (Strom negativer Ladung in die Zelle) ausgeglichen. Die zur Kompensation zusätzlich benötigte Strommenge stellt hierbei eine indirekte Messgröße für den Ionenstrom durch die Zellmembran dar.

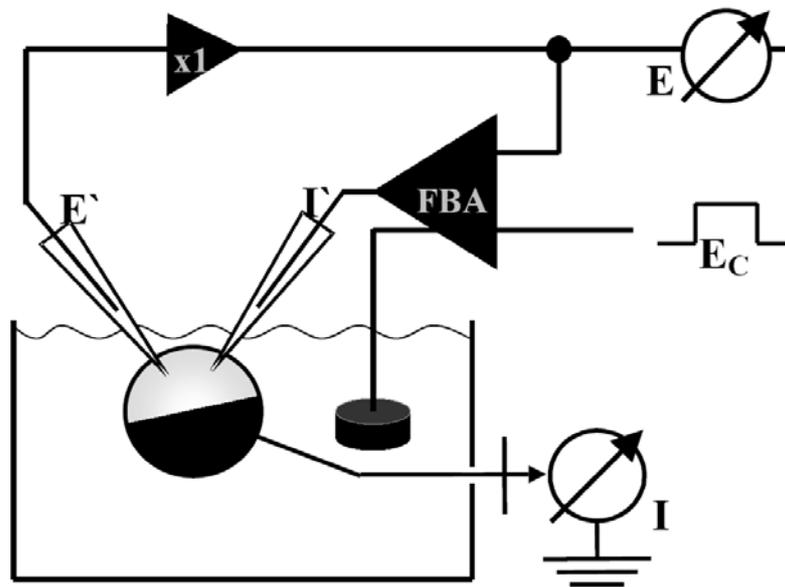


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Messanordnung bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme. E_C ist das vom Experimentator festgelegte Potential, auf das die Oozyte geklemmt wird. Die Spannungselektrode E' misst das Membranpotential E der Oozyte gegen eine geerdete Referenzelektrode im Bad. Über die Mikroelektrode I' wird der Strom I injiziert, um die Zelle auf das gewünschte Potential zu klemmen. Der Strom I wird gemessen. FBA steht für feedback amplifier. Der Verstärker misst gleichzeitig Spannung und Strom und appliziert den Haltestrom.

Elektrophysiologische Messungen wurden bei Raumtemperatur an einem speziell angefertigten Messstand durchgeführt. In der Mitte eines Experimentiertisches befand sich eine Messkammer aus Plexiglas, in die die Oozyte für die Messungen gelegt wurde. In der Messkammer befand sich Badlösung, die die Oozyte ständig umspülte. Über einen Silikonschlauch war die Oozytenmesskammer mit Vorratsbehältern für die entsprechenden Badlösungen verbunden. Zwischen diesen konnte über Drei-Wege-Hähne umgeschaltet werden. Mit Hilfe hydrostatischen Drucks erfolgte die Zuleitung der entsprechenden Badlösung aus den Vorratsbehältern in die Messkammer. Die Flussgeschwindigkeit betrug dabei 10-14 ml/min. Mittels einer elektrischen

Pumpe wurde die Badlösung über einen weiteren Silikonschlauch aus der Messkammer in eine Waschflasche abgesaugt.

Auf beiden Seiten der Messkammer befand sich jeweils ein manueller Mikromanipulator. Beide Mikromanipulatoren waren mittels Magnetstativen auf der Tischplatte fixiert und jeweils mit einem Vorverstärker verbunden. An jedem der Vorverstärker wurde ein Elektrodenhalter mit Ag/AgCl-Elektrodendraht befestigt. Spannungs- und Stromelektrode wurden mit Hilfe eines Mikroelektrodenpullers (DMZ, Deutschland) aus Glaskapillaren (GC150TF-7,5; Harvard apparatus, England) hergestellt. Die Mikroelektroden wurden anschließend luftblasenfrei mit 3 M KCl-Lösung (Sigma, Deutschland) gefüllt und auf die Elektrodenhalter gesteckt und dort befestigt. Der Ag/AgCl-Elektrodendraht tauchte dabei vollständig in die KCl-Lösung ein. Der Widerstandswert der Mikroelektroden lag bei allen Messungen zwischen 0,3 und 1,5 M Ω . Zwei Ag/AgCl-Pellets klemmten das Potential der Badlösung.

Der Versuchsaufbau enthielt zusätzlich ein Stereomikroskop, welches das Einstechen in die Oozyte erleichterte. Die Messkammer wurde von einer gleichstrombetriebenen Halogenlampe beleuchtet.

Sämtliche Daten wurden über einen Rückkopplungsverstärker (TurboTec 03, NPI, Tamm, Deutschland) und über ein Interface DIGIDATA 1322A (Axon Instruments, USA) mit der Software ClampEx (Axon Instruments, USA) aufgenommen. Die Messung erfolgte bei einem Haltepotential von -70mV . Als Badlösungen dienten ND-96-Lösung für die Messung von Kainatrezeptorströmen und NFR für die Messung von NMDA-Rezeptorströmen. Die Aktivierung der Rezeptorkanäle erfolgte durch Applikation der entsprechenden Agonistenlösung. Für die Messung von Kainatrezeptorströmen war eine Inkubation der Oozyte mit dem Lektin Concanavalin A (Con A) vor Agonistapplikation notwendig, um die Desensibilisierung zu minimieren. Hierfür wurden 50 μl Con A-Lösung (100mM) auf die in der Messkammer befindliche Oozyte gegeben. Die Inkubation erfolgte für 4min. Während dieser Zeit war der Zufluss von ND-96-Lösung in die Messkammer gestoppt. Nach Beendigung der Inkubation wurde 1min lang mit ND-96-Lösung nachgespült, um nicht gebundenes Lektin zu entfernen.

2.4 Auswertung und Statistik

Die Analyse der Daten erfolgte mittels ClampFit (Axon Instruments, USA)- und Origin 6.0 (Additive/Microcal, Deutschland)-Software. Alle Versuchsergebnisse wurden als arithmetisches Mittel (Mean) \pm dem Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.= standard error of the mean) angegeben. Die Anzahl der gemessenen Oozyten ist mit n angegeben. Die Analyse auf signifikante Unterschiede wurde mit dem Zwei-Populationen-Student-t-Test in Origin 6.0 bei zwei unabhängigen Datensätzen durchgeführt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikanter Unterschied gedeutet. Signifikante Unterschiede sind mit * , ** oder *** gekennzeichnet, wobei * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ bedeutet.

3. Versuche und Ergebnisse

3.1 Vergleich von GluR6(M836I)-Strom mit GluR6wt-Strom

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob die Mutation M867I in GluR6 einen funktionellen Effekt hat. Jamain et al. bezogen sich in ihrer Arbeit auf GluR6(M867I). Für die Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurde die Punktmutante GluR6(M836I) verwendet. GluR6(M867I) und GluR6(M836I) weisen an gleicher Stelle dieselbe Punktmutation auf. Die unterschiedliche Benennung der Mutanten beruht auf Unterschieden in der Durchnummerierung der Aminosäuren. Bei GluR6(M836I) beginnt die Durchnummerierung mit der ersten Aminosäure des „reifen“ Proteins und schließt somit die 31 Aminosäuren des Signalpeptids nicht mit ein (Abb. 3.1).

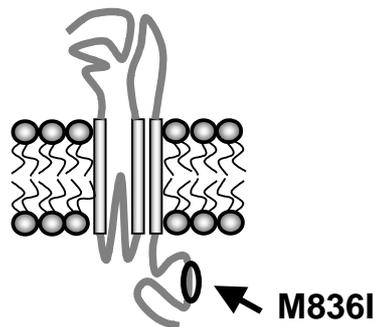


Abb. 3.1: M836I-Mutation in GluR6. Die Mutation (M836I) liegt in der intrazellulären C-terminalen Region des Rezeptors.

Um herauszufinden, ob die Mutation M836I in GluR6 einen funktionellen Effekt hat, wurden *Xenopus laevis*-Oozyten mit GluR6wt-cRNA oder GluR6(M836I)-cRNA injiziert. Mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode wurden an injizierten Oozyten elektrophysiologische Messungen durchgeführt und die glutamatinduzierten Stromamplituden miteinander verglichen.

Oozyten, die mit GluR6(M836I)-cRNA injiziert wurden, zeigten im Vergleich zu Oozyten, die mit GluR6wt-cRNA injiziert wurden, signifikant erhöhte Stromamplituden ($p=0,008$; Abb. 3.2 A). Die relative Stromamplitude war für

GluR6(M836I) verglichen mit GluR6wt fast doppelt so groß. Mittlere absolute Ströme lagen für GluR6(M836I) bei $33,4 \pm 3,6 \mu\text{A}$ und für GluR6wt bei $18,8 \pm 3,6 \mu\text{A}$ (Abb. 3.2 A,B).

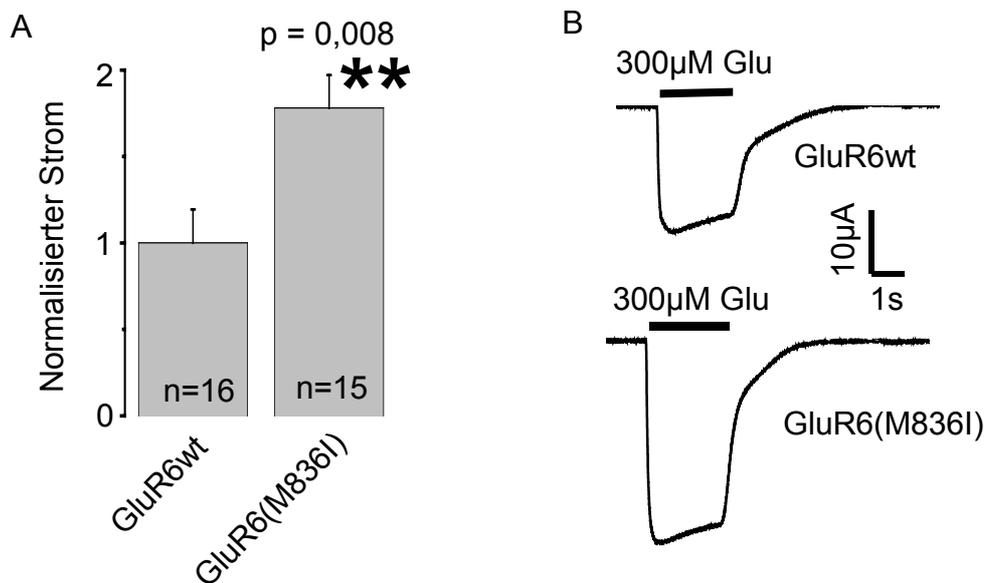


Abb. 3.2: Signifikant gesteigerte Ströme bei GluR6(M836I) im Vergleich zu GluR6wt. A, *Xenopus laevis*-Oozyten wurden mit GluR6wt- oder GluR6(M836I)-cRNA injiziert. Agonisteninduzierte Stromantworten wurden auf GluR6wt-Ströme normalisiert. GluR6(M836I)-Ströme waren signifikant größer, wobei ** $p < 0,01$ bedeutet; n ist die Anzahl der gemessenen Oozyten. B, typischer Verlauf der Stromspuren für GluR6wt und GluR6(M836I). Alle Messungen wurden bei -70mV und nach Präinkubation der Oozyte mit ConA durchgeführt. Als Agonist wurde $300\mu\text{M}$ Glutamat verwendet.

Die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Western Blots von *Xenopus*-Oozyten, die mit GluR6wt- oder GluR6(M836I)-cRNA injiziert waren, ergaben eine erhöhte Plasmamembranexpression von GluR6(M836I) im Vergleich mit GluR6wt. Transfektion von EGFP-markierter GluR6wt- oder GluR6(M836I)-cDNA in COS-7 Zellen zeigte, dass GluR6(M836I) vorzugsweise in der Plasmamembran der Zellen exprimiert wird. Für die GluR6wt-Expression konnte eine solche Präferenz für die Plasmamembran nicht nachgewiesen werden.

3.2 Unterschiedliche Wirkung von Rab11 auf GluR6wt- und GluR6(M836I)-Stromamplituden

Um zu testen, ob ein vermehrter Transport von GluR6(M836I) von Recycling-Endosomen zur Plasmamembran über das kleine G-Protein (GTPase) Rab11 für den gesteigerten Einbau von GluR6(M836I) in die Plasmamembran verantwortlich sein könnte, wurden *Xenopus*-Oozyten mit cRNA für GluR6wt bzw. GluR6(M836I) alleine (plus DEPC-Wasser) oder zusammen mit Rab11-cRNA injiziert. Zusätzlich erfolgten Injektionen von GluR6wt- bzw. GluR6(M836I)-cRNA zusammen mit Rab11(S25N)-cRNA. Bei Rab11(S25N) handelt es sich um eine Rab11-Mutante, die in der GDP-gebundenen Form vorliegt und konstitutiv, d.h. immer, inaktiv ist. Rab11(S25N) hemmt selektiv den Rab11-vermittelten Transport von Recycling-Endosomen zur Plasmamembran. Mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode wurden an den verschieden injizierten Oozyten glutamatinduzierte Ströme gemessen und miteinander verglichen.

Oozyten, die mit GluR6wt- und Rab11wt-cRNA injiziert wurden, zeigten hinsichtlich der Größe ihrer Stromamplituden keine signifikanten Veränderungen verglichen mit Oozyten, in die GluR6wt-cRNA alleine bzw. zusammen mit Rab11(S25N)-cRNA injiziert wurde. Koinjektion von Rab11wt-cRNA zusammen mit GluR6(M836I)-cRNA führte zu einer signifikanten Steigerung der Stromamplitude ($p=0,04$) im Vergleich zu Oozyten, in die GluR6(M836I)-cRNA alleine injiziert wurde. Oozyten, die GluR6(M836I) und Rab11(S25N) exprimierten, zeigten verglichen mit Oozyten, die GluR6(M836I) alleine exprimierten, keine signifikanten Veränderungen der Stromamplituden (Abb. 3.3).

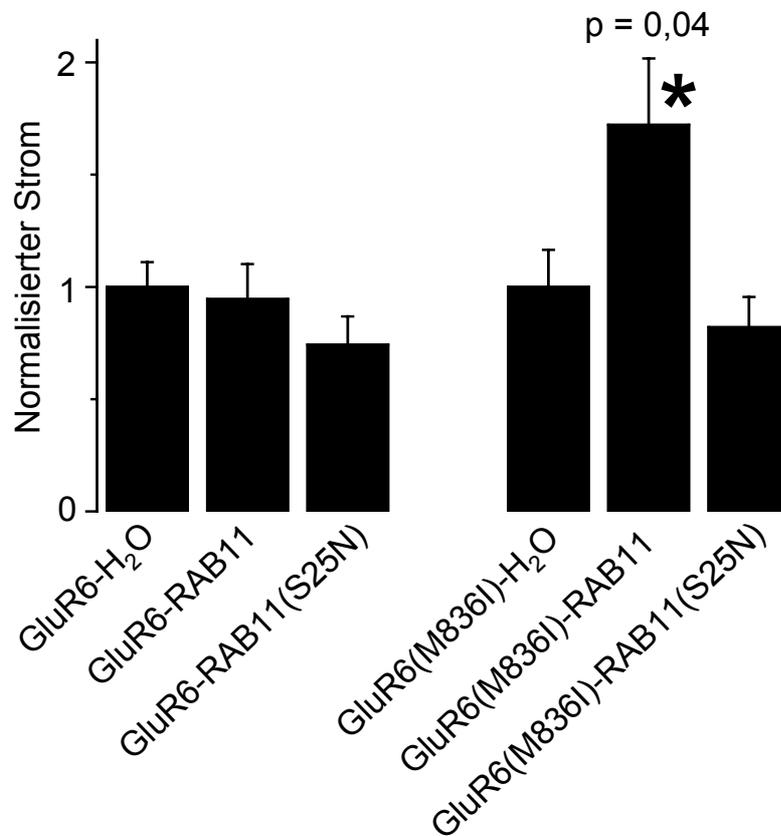


Abb. 3.3: Rab11 steigert die GluR6(M836I)-Ströme, nicht aber die GluR6wt-Ströme. Stromamplituden von Oozyten, die GluR6wt bzw. GluR6(M836I) alleine oder zusammen mit Rab11wt oder Rab11(S25N) exprimieren, wurden bei -70mV gemessen und auf GluR6wt+DEPC-H₂O- bzw. GluR6(M836I)+DEPC-H₂O-Ströme normalisiert. GluR6(M836I)-Rab11wt-Ströme waren verglichen mit GluR6(M836I)-H₂O-Strömen signifikant gesteigert, wobei * $p < 0,05$ entspricht; $n=10-18$.

In Western Blot-Experimenten wurde gezeigt, dass der Einbau von GluR6(M836I) in die Plasmamembran von *Xenopus laevis*-Oozyten bei Koinjektion von GluR6(M836I)- mit Rab11wt-cRNA in die Zellen gesteigert ist. Zum Vergleich standen Oozyten, die mit GluR6(M836I)-cRNA alleine oder mit GluR6(M836I)-cRNA plus Rab11(S25N)-cRNA injiziert wurden. Diese Oozyten zeigten eine geringere GluR6(M836I)-Plasmamembranexpression.

Um die Rolle von Rab11 im Recycling-Prozess von GluR6 besser zu verstehen, wurde die Wirkungsweise von Rab11 in einem weiteren Experiment unserer

Arbeitsgruppe genauer untersucht. GTP und Rab11A-Protein wurden in Oozyten koinjiziert, die entweder GluR6wt oder GluR6(M836I) exprimierten. Über einen Zeitraum von 18 Minuten wurde alle 60-90 Sekunden Glutamat appliziert und der agonisteninduzierte Strom gemessen. Die Stromamplituden dieser Oozyten wurden mit Stromamplituden von Kontrolloozyten verglichen, in die nur GTP oder GTP-freies Rab11A-Protein injiziert wurde. Die gemessenen Ströme wurden normalisiert auf Ströme, die vor den Injektionen gemessen wurden. Injektion von GTP und Rab11A-Protein führte in Oozyten, die GluR6wt exprimierten, zu keiner Steigerung der Stromamplitude innerhalb der 18 Minuten. Vielmehr konnte sogar eine Abnahme der Stromamplitude gegen Ende der 18 Minuten beobachtet werden. Bei Oozyten, die GluR6(M836I) exprimierten, führte Koinjektion von GTP und Rab11A-Protein zu einer Steigerung der glutamatinduzierten Ströme innerhalb der 18 Minuten. Injektionen von GTP allein oder GTP-freiem Rab11A-Protein hatten bei beiden Oozytengruppen keinen aktivierenden Effekt auf den Strom.

3.3 Unterschiedliche Wirkung von Rab5 auf GluR6wt- und GluR6(M836I)-Stromamplituden

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, welchen Mechanismen der Recycling-Prozess von GluR6wt unterworfen ist. Hierfür wurde Rab5 auf seinen möglichen Effekt auf den GluR6wt- bzw. GluR6(M836I)-Strom getestet. Rab5 ist ein kleines G-Protein (GTPase), welches bei der Internalisierung von Membranproteinen in frühe Endosomen eine Rolle spielt und damit potentiell am GluR6wt-Recycling-Prozess beteiligt sein könnte.

Um zu testen, ob Rab5 einen Effekt auf den GluR6wt- bzw. GluR6(M836I)-Strom besitzt, wurden Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Messungen an *Xenopus laevis*-Oozyten durchgeführt.

Hierfür wurden Oozyten mit GluR6wt-cRNA bzw. GluR6(M836I)-cRNA alleine (plus DEPC-Wasser) oder mit GluR6wt- bzw. GluR6(M836I)- plus Rab5-cRNA injiziert. Zusätzlich erfolgten Koinjektionen von GluR6wt- bzw. GluR6(M836I)-

cRNA zusammen mit Rab5(N133I)-cRNA. Bei Rab5(N133I) handelt es sich um eine dominant negative Mutante von Rab5.

Koexpression von GluR6wt und Rab5 führte zu einer signifikanten Verminderung der Stromamplitude ($p=0,007$) verglichen mit Stromamplituden von Oozyten, die GluR6wt alleine bzw. GluR6wt plus Rab5(N133I) exprimierten. Oozyten, die mit GluR6(M836I)- und Rab5-cRNA injiziert wurden, zeigten keine signifikanten Veränderungen bezüglich ihrer Ströme im Vergleich zu Oozyten, in die GluR6(M836I)-cRNA alleine oder GluR6(M836I)- plus Rab5(N133I)-cRNA injiziert wurde (Abb. 3.4).

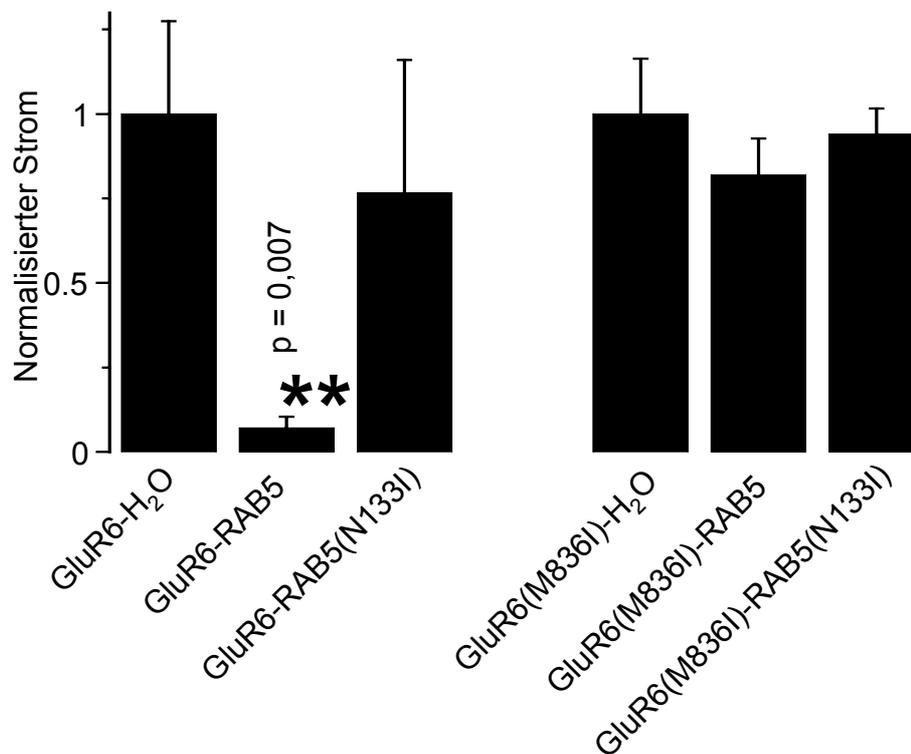


Abb. 3.4: Rab5 vermindert GluR6wt-Ströme signifikant. Ströme von Oozyten, die GluR6wt bzw. GluR6(M836I) alleine oder zusammen mit Rab5wt oder Rab5(N133I) exprimieren, wurden bei -70mV gemessen und auf GluR6wt-H₂O- bzw. GluR6(M836I)-H₂O-Ströme normalisiert. Signifikante Unterschiede zu Strömen von Oozyten, die GluR6wt alleine exprimieren, sind mit ** gekennzeichnet, wobei ** $p < 0,01$ entspricht; $n=5-18$.

Western Blot-Experimente zeigten eine Verminderung der Plasmamembran-expression von GluR6wt in *Xenopus*-Oozyten bei Koexpression mit Rab5.

3.4 Untersuchung der Proteine Grb2, CKAP, Yotiao, RIL, mTOR, NDRG1 und NDRG2 auf ihre mögliche Funktion als Modulatoren der GluR6-Aktivität

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob die Proteine Grb2, CKAP, Yotiao, RIL, mTOR, NDRG1 und NDRG2 einen Effekt auf den GluR6-Strom haben. Dies wurde mittels *Xenopus*-Oozyten-Expressionssystem und der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode untersucht.

Hierfür wurde GluR6-cRNA alleine (plus DEPC-Wasser) oder in Kombination mit cRNA für Grb2, CKAP, Yotiao, RIL, mTOR, NDRG1 oder NDRG2 in *Xenopus*-Oozyten injiziert. Zusätzlich erfolgten Koinjektionen von GluR6-cRNA zusammen mit cRNA für SGK1 oder zusammen mit NDRG1- bzw. NDRG2-plus SGK1-cRNA.

Die Proteine Grb2 und Yotiao steigerten den Strom signifikant (Grb2: $p=0,00474$; Yotiao: $p=0,0256$; Abb. 3.5, 3.8). Koinjektionen von GluR6-cRNA zusammen mit RIL- oder mTOR-cRNA führten zu einer signifikanten Verminderung der glutamatinduzierten Stromamplitude (RIL: $p=0,000084$; mTOR: $p=0,01994$; Abb. 3.6, 3.8). Koinjektionen mit NDRG1-, NDRG2- oder CKAP-cRNA blieben ohne signifikanten Effekt auf die Größe des GluR6-Stroms (Abb. 3.5, 3.7-3.9). Während Koinjektion von GluR6-cRNA zusammen mit SGK1-cRNA zu einer signifikanten Vergrößerung der Stromamplitude führte ($p=0,03295$), war der Strom signifikant vermindert bei Oozyten, in die cRNA für GluR6 in Kombination mit NDRG2- und SGK1-cRNA injiziert wurde ($p=0,0000168$; Abb. 3.7, 3.9). Bei Oozyten, in die GluR6-cRNA und cRNA für NDRG1 und SGK1 injiziert wurden, konnte keine signifikante Veränderung des GluR6-Stroms festgestellt werden (Abb. 3.7, 3.9).

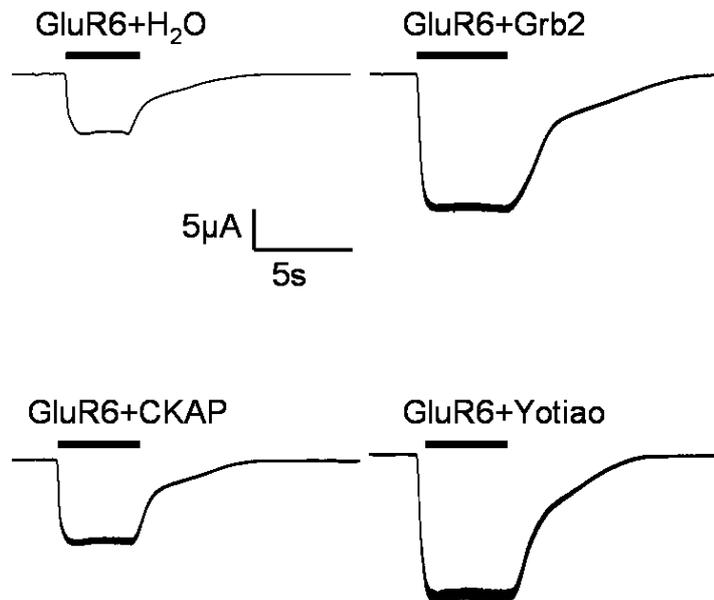


Abb. 3.5: Typischer Verlauf der Stromspuren für GluR6 (1). Alle Messungen wurden bei -70mV und nach Präinkubation der Oozyte mit ConA durchgeführt. Als Agonist wurde $300\mu\text{M}$ Glutamat verwendet. Der querverlaufende Balken symbolisiert die Zeitdauer, in der Glutamat appliziert wurde.

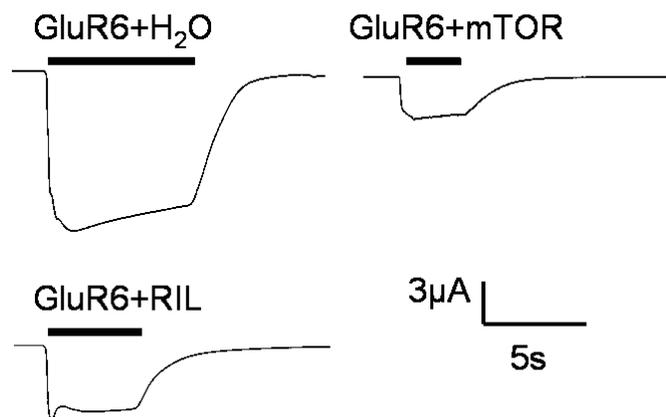


Abb. 3.6: Typischer Verlauf der Stromspuren für GluR6 (2). Alle Messungen wurden bei -70mV und nach Präinkubation der Oozyte mit ConA durchgeführt. Als Agonist wurde $300\mu\text{M}$ Glutamat verwendet. Der querverlaufende Balken symbolisiert die Zeitdauer, in der Glutamat appliziert wurde.

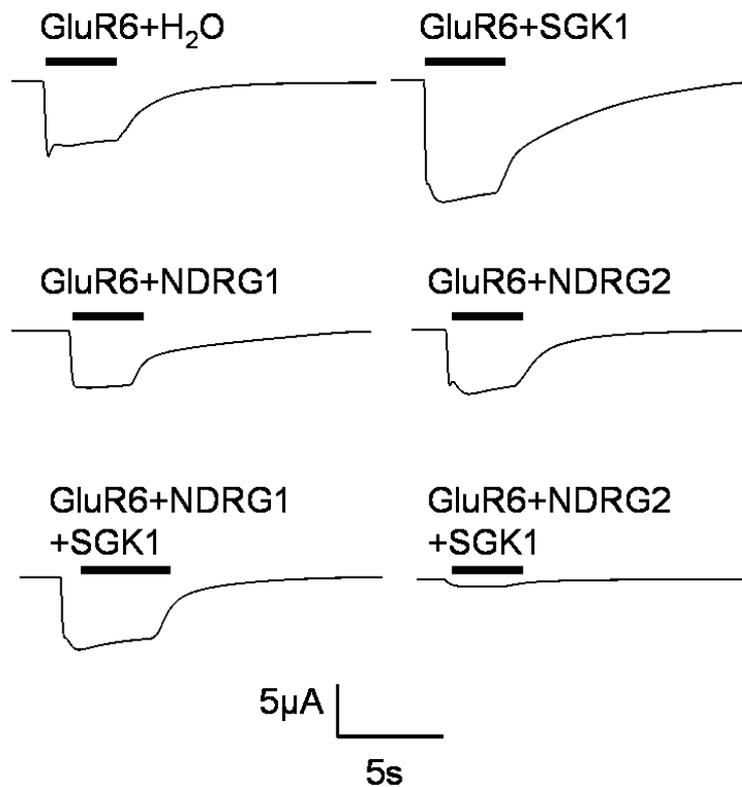


Abb. 3.7: Typischer Verlauf der Stromspuren für GluR6 (3). Alle Messungen wurden bei -70mV und nach Präinkubation der Oozyte mit ConA durchgeführt. Als Agonist wurde $300\mu\text{M}$ Glutamat verwendet. Der querverlaufende Balken symbolisiert die Zeitdauer, in der Glutamat appliziert wurde.

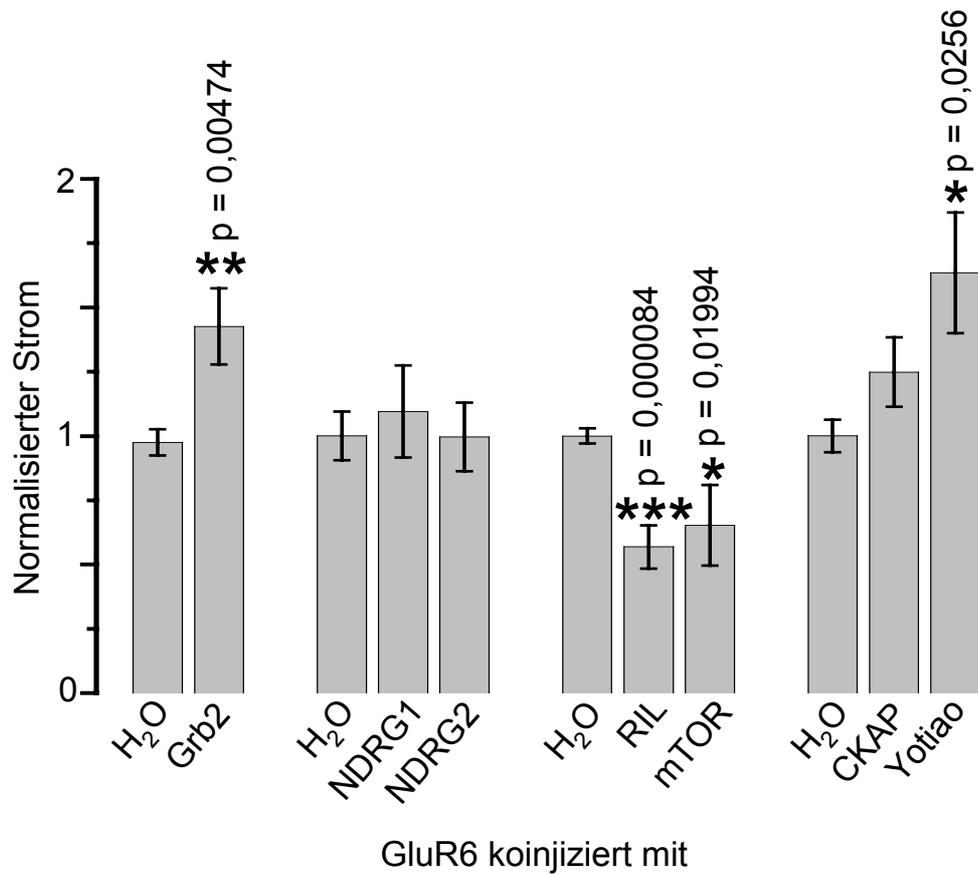


Abb. 3.8: Modulierende Wirkung von Grb2, RIL, mTOR und Yotiao auf den GluR6-Strom. *Xenopus laevis*-Oozyten wurden mit GluR6-cRNA und DEPC-H₂O, NDRG1-, NDRG2-, RIL-, mTOR-, CKAP- oder Yotiao-cRNA koinjiziert. Die gemessenen Ströme wurden jeweils auf die GluR6+DEPC-H₂O-Ströme normalisiert. Signifikante Unterschiede sind durch * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$) gekennzeichnet; $n=6-33$.

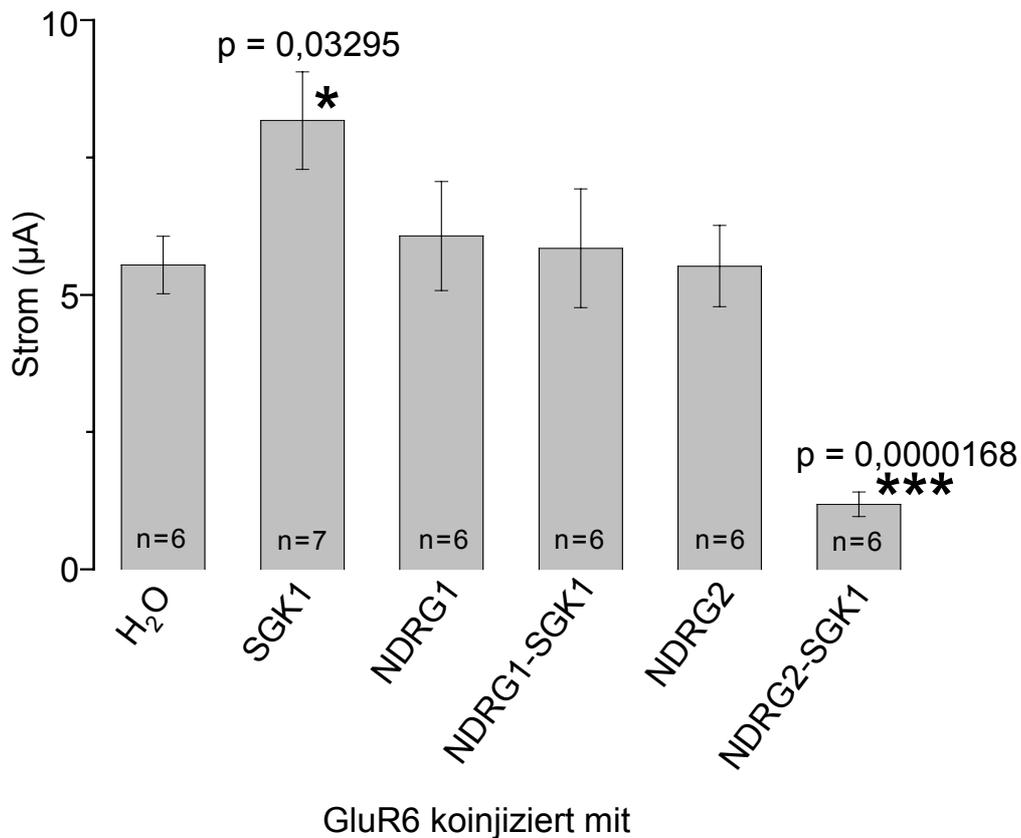


Abb. 3.9: Signifikante Steigerung des GluR6-Stroms durch SGK1. Koinjektion von SGK1 zusammen mit NDRG2 vermindert den Strom. *Xenopus laevis*-Oozyten wurden mit GluR6-cRNA und SGK1-, NDRG1-, NDRG2-, NDRG1-/SGK1- oder NDRG2-/SGK1-cRNA koinjiziert. Die Ströme (in µA) wurden bei -70mV gemessen und miteinander verglichen. Signifikante Unterschiede zu Strömen von Oozyten, die GluR6 alleine exprimieren, sind mit * ($p < 0,05$) oder *** ($p < 0,001$) angegeben; n ist die Anzahl der gemessenen Oozyten.

3.5 Effekt von SGK1, SGK2 und SGK3 auf den Strom von GluR7(K758N)

Im Rahmen dieser Arbeit sollte auch untersucht werden, ob SGK-Isoformen die Kainatrezeptoruntereinheit GluR7 regulieren.

Hierfür wurde GluR7(K758N)-cRNA alleine (plus DEPC-Wasser) oder zusammen mit SGK1-, SGK2- oder SGK3-cRNA in *Xenopus laevis*-Oozyten injiziert. Als Kontrollgruppe dienten Oozyten, die mit Proteinkinase B (PKB)-cRNA injiziert wurden. Die in den Experimenten verwendete PKB war immer eine konstitutiv aktive Mutante (T308D/S473D). PKB wurde in den Versuchen mit SGK als Kontrolle für die SGK-Spezifität des regulatorischen Mechanismus eingesetzt. Die in den Versuchen verwendeten SGK-Isoformen waren humane SGK1, SGK2 und SGK3. Bei den verschiedenen injizierten Oozyten wurden die glutamatinduzierten Stromantworten gemessen und miteinander verglichen.

Koinjektion von GluR7(K758N) zusammen mit SGK3 führte zu einer signifikanten Steigerung des Stroms ($p=0,00154$). SGK2 verminderte die agonisteninduzierte Stromamplitude signifikant ($p=0,01537$). SGK1 hatte keinen signifikanten Effekt auf den GluR7(K758N)-Strom. Oozyten, die mit GluR7(K758N)- und PKB-cRNA injiziert wurden, zeigten bei den Messungen signifikant verminderte Stromamplituden ($p=0,02769$; Abb. 3.10, 3.11).

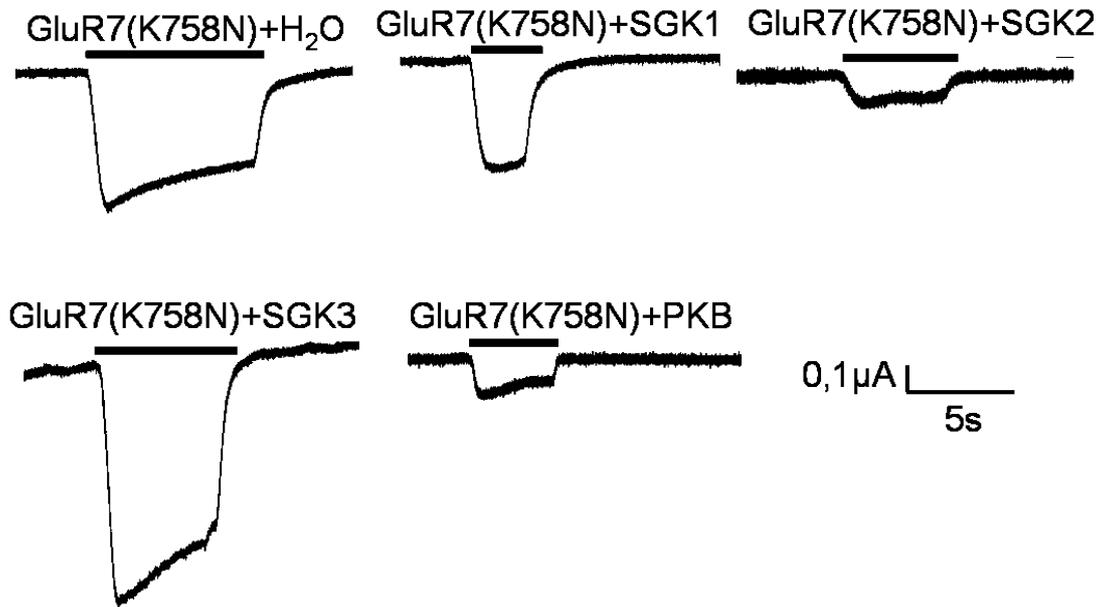


Abb. 3.10: Typischer Verlauf der Stromspuren für GluR7(K758N). Alle Messungen wurden bei -70mV und nach Präinkubation der Oozyte mit ConA durchgeführt. Als Agonist wurde $300\mu\text{M}$ Glutamat verwendet. Der querverlaufende Balken symbolisiert die Zeitdauer, in der Glutamat appliziert wurde.

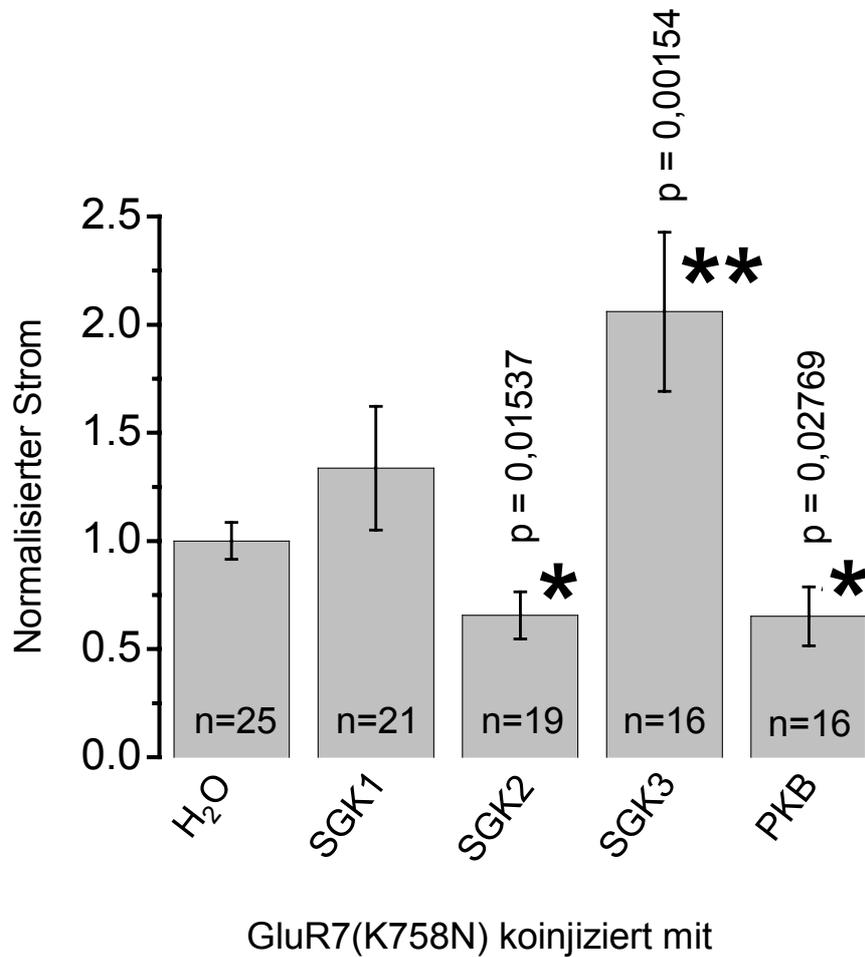


Abb. 3.11: Signifikante Steigerung des GluR7(K758N)-Stroms durch SGK3. SGK2 und PKB vermindern den Strom signifikant. *Xenopus laevis*-Oozyten wurden mit GluR7(K758N)- und DEPC-H₂O, SGK1-, SGK2-, SGK3- oder PKB-cRNA koinjiziert. Die gemessenen Stromamplituden wurden auf die GluR7(K758N)+DEPC-H₂O-Ströme normalisiert; n ist die Anzahl der gemessenen Oozyten. Signifikante Unterschiede zu Strömen von Oozyten, die GluR7(K758N) alleine exprimieren, sind mit * bzw. ** gekennzeichnet, wobei $p < 0,05$ * und $p < 0,01$ ** ist.

3.6 Effekt von SGK1, SGK2 und SGK3 auf den Strom des NMDA-Rezeptors NR1-1a/NR2B

Es sollte auch untersucht werden, ob der NMDA-Rezeptorkomplex NR1-1a/NR2B als Vertreter der NMDA-Rezeptoren ebenfalls durch SGK-Isoformen reguliert wird.

Dazu wurde NR1-1a/NR2B-cRNA alleine (plus DEPC-Wasser) oder zusammen mit SGK1-, SGK2- oder SGK3-cRNA in *Xenopus*-Oozyten injiziert. Als Kontrollgruppe dienten wieder Oozyten, die mit PKB-cRNA injiziert wurden.

Mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode wurden agonisteninduzierte Stromantworten bei den verschiedenen injizierten Oozyten gemessen und miteinander verglichen.

Koinjektion von NR1-1a/NR2B-cRNA zusammen mit SGK1-cRNA führte zu einer signifikanten Erhöhung des Stroms ($p=0,0037$). SGK3 steigerte den Strom ebenfalls signifikant ($p=0,0015$). SGK2 und PKB hatten keinen signifikanten Effekt (Abb. 3.12, 3.13).

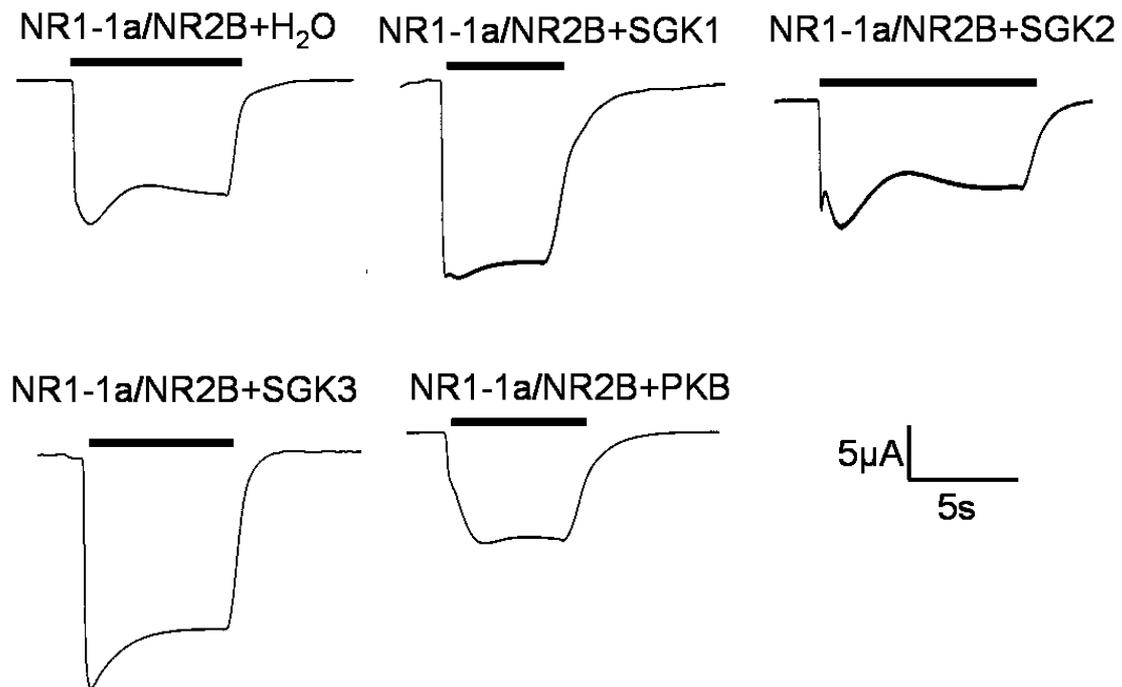


Abb. 3.12: Typischer Verlauf der Stromspuren für NMDAR1-1a/NR2B. Alle Messungen wurden bei -70mV durchgeführt. Als Agonist wurden $100\mu\text{M}$ Glutamat und $10\mu\text{M}$ Glycin verwendet. Der querverlaufende Balken symbolisiert die Zeitdauer, in der Glutamat und Glycin appliziert wurden.

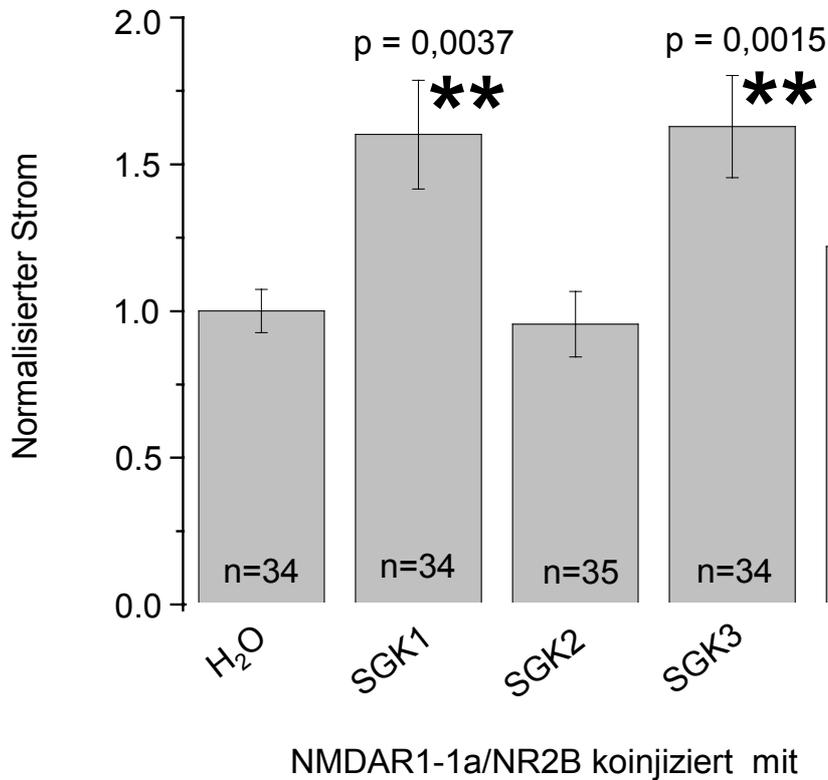


Abb. 3.13: Signifikante Steigerung des NMDAR1-1a/NR2B-Stroms durch SGK1 und SGK3. *Xenopus laevis*-Oozyten wurden mit NMDAR1-1a/NR2B-cRNA und DEPC-H₂O, SGK1-, SGK2-, SGK3- oder PKB-cRNA koinjiziert. Die gemessenen Ströme wurden auf die NMDAR1-1a/NR2B+DEPC-H₂O-Ströme normalisiert; n ist die Anzahl der gemessenen Oozyten. Signifikante Unterschiede zu Strömen von Oozyten, die NMDAR1-1a/NR2B alleine exprimieren, sind mit ** gekennzeichnet, wobei $p < 0,01$ ** ist.

4. Diskussion

4.1 Funktionelle Bedeutung der Mutation M836I in GluR6 und Regulation der GluR6-Aktivität durch Rab5 und Rab11

Jamain et al. zeigten in ihrer Studie, dass ein Polymorphismus der Rezeptoruntereinheit GluR6 signifikant mit Autismus assoziiert ist (Jamain et al., 2002). Jamain et al. führten ein Mutationsscreening bei betroffenen Individuen durch und identifizierten verschiedene SNPs im menschlichen GluR6-Gen. Einer der Polymorphismen lag in einem Exon mit dem Aminosäureaustausch M836I in einer hoch konservierten Domäne von GluR6. Drei weitere waren ebenfalls in Exons lokalisiert und zeigten konservative Aminosäureaustausche. Drei Polymorphismen lagen in Introns (Jamain et al., 2002).

Die Mutation M836I in GluR6 ist eine Punktmutation, bei der die Aminosäure Methionin gegen Isoleucin an der Stelle 836 in GluR6 ausgetauscht ist. Methionin 836 ist eine hoch konservierte Aminosäure, die im zytoplasmatischen C-terminalen Teil von GluR6 lokalisiert ist. Sie liegt dort in der Nähe einer putativen Protein-Phosphorylierungsstelle des Rezeptors. Der C-Terminus von GluR6 spielt eine wichtige Rolle für die Organisation und die elektrophysiologischen Eigenschaften des Rezeptors. GluR6 interagiert über seinen C-Terminus mit der PDZ1-Domäne des Proteins SAP90/PSD-95, welches zur Familie der SAPs (synapse-associated proteins) gehört (Garcia et al., 1998). Veränderungen in der C-terminalen Region von GluR6 können dazu führen, dass das Protein nicht mehr mit SAP90/PSD-95 assoziiert, was den Transport („Targeting“) des Rezeptors an der Synapse ändern kann. Des Weiteren bewirkt die Interaktion des C-Terminus von GluR6 mit SAP90/PSD-95 eine Veränderung der Rezeptorfunktion von GluR6, indem dadurch die Desensibilisierung des Rezeptors vermindert wird (Garcia et al., 1998; Mehta et al., 2001).

Martin und Henley zeigten kürzlich, dass die Oberflächenexpression von GluR6 in Kulturen hippocampaler Neurone dynamisch reguliert wird (Martin und

Henley, 2004). Abhängig vom endozytotischen Stimulus werden internalisierte GluR6-Proteine entweder Lysosomen oder aber Recycling-Endosomen zugeführt. Im Falle eines Recycling-Prozesses wird GluR6 in die Plasmamembran reinseriert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mutation M836I in GluR6 einen funktionellen Effekt hat (*gain-of-function-mutation*). GluR6(M836I)-Ströme waren im Vergleich zu GluR6wt-Strömen signifikant gesteigert, wobei die relative Stromamplitude von GluR6(M836I) verglichen mit GluR6wt fast doppelt so groß war. Die gesteigerten Ströme von GluR6(M836I) beruhen dabei zumindest teilweise auf einer vermehrten Expression des Kanalproteins in der Plasmamembran der Oozyte. Die Arbeit zeigt, dass Rab11 das endosomale Recycling von GluR6(M836I) stimuliert. Für das endosomale Recycling von GluR6wt scheint Rab11 keine wichtige Rolle zu spielen. Die verstärkte Plasmamembranexpression von GluR6(M836I) verglichen mit GluR6wt könnte deshalb auf einem gesteigerten endosomalen Recycling durch Rab11 beruhen, einem Mechanismus, der für GluR6wt nicht zutreffend zu sein scheint. Weitere Untersuchungen zeigten, dass Rab5 einen hemmenden Effekt auf GluR6wt hat. Rab5 ist ein kleines G-Protein, welches die Internalisierung von Membranproteinen in frühe Endosomen reguliert (Kawasaki et al., 2005). Rab5 scheint an der Internalisierung von GluR6wt, jedoch nicht von GluR6(M836I), beteiligt zu sein. Dies könnte ebenfalls zu einer verstärkten Plasmamembranexpression von GluR6(M836I) beitragen. Es verbleibt die Möglichkeit, dass andere Moleküle als Rab5 die Internalisierung von GluR6(M836I) regulieren.

Die Experimente zeigen, dass Rab5 und Rab11 offensichtlich an der Regulation der Membranexpression von GluR6wt und GluR6(M836I) beteiligt sind. Sie regulieren jeweils spezifische Schritte im Recycling-Prozess von GluR6. Dabei scheint Rab5 eine besondere Rolle bei der Internalisierung von GluR6wt zu spielen, während Rab11 vor allem die Membranreinsertion von GluR6(M836I) reguliert (Abb. 4.1).

Die Familie der Rab-Proteine ist groß. Rab-Proteine existieren in allen eukaryotischen Zellen und bilden die größte Klasse innerhalb der kleinen G-Proteine (Takai et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Rab-Proteine Rab5 und Rab11 auf ihre mögliche regulatorische Funktion untersucht und als Regulatoren der GluR6-Aktivität identifiziert. Es gibt noch sehr viele andere Rab-Proteine, die ebenfalls einen Einfluss auf GluR6wt oder GluR6(M836I) haben könnten. In wie weit andere Rab-Proteine GluR6 regulieren, ist bis jetzt noch nicht untersucht worden. Um dies herauszufinden sind weitere Untersuchungen nötig.

4.2 Identifikation weiterer Modulatoren der GluR6-Aktivität

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden die Proteine NDRG1, NDRG2, mTOR, RIL, Yotiao, CKAP und Grb2 auf ihren möglichen Effekt auf den GluR6-Strom getestet. Die Daten zeigen, dass auch Grb2, Yotiao, RIL, mTOR und NDRG2 (in Kombination mit SGK1) die GluR6-Aktivität modulieren.

Von den getesteten Proteinen waren Grb2 und Yotiao die einzigen, die einen aktivierenden Effekt auf GluR6 haben. Grb2 und Yotiao könnten daher eine Rolle spielen bei der Vermittlung der steigernden Wirkung von SGK1 auf GluR6 (Strutz-Seebohm et al., 2005a). Grb2 ist ein typisches Adapterprotein, das Membranrezeptoren, wie z.B. EGFRs (epidermal growth factor receptors), mit intrazellulären Signalwegen verbindet. Grb2 ist involviert in das Trafficking von EGFRs (Yamazaki et al., 2002; Jiang et al., 2003). Yotiao ist ein Protein, das mit der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR1 (Lin et al., 1998) und der I(Ks)-Kaliumkanaluntereinheit KCNQ1 (Marx et al., 2002) interagiert. Yotiao reguliert NMDA-Rezeptoren und den I(Ks)-Kaliumkanal, in dem es die cAMP-abhängige PKA und PP1 bindet und in die Nähe der Kanäle bringt („Targeting“) (Felicciello et al., 1999; Westphal et al., 1999; Marx et al., 2002).

Über welche Mechanismen Grb2 und Yotiao GluR6 beeinflussen ist unklar.

Für Yotiao wurde gezeigt, dass es in der Regulation des I(Ks)-Kaliumkanals nicht nur als passives Adapterprotein fungiert, sondern auch aktiv an der

Regulation des Kanalkomplexes beteiligt ist (Kurokawa et al., 2004; Chen et al., 2005). Chen et al. zeigten, dass Yotiao selbst Substrat für die PKA ist und durch PKA phosphoryliert wird (Chen et al., 2005). Die Phosphorylierung von Yotiao trägt unabhängig von der modulierenden Wirkung von PKA auf den I(Ks)-Kaliumkanal zu einer Veränderung der Kanalfunktion bei. Chen und Kass identifizierten Yotiao als aktiven Regulator, der direkt die I(Ks)-Kaliumkanalfunktion beeinflusst (Chen und Kass, 2006). Möglicherweise wird Yotiao durch SGK1 phosphoryliert, um dann mit GluR6 direkt zu interagieren, wodurch zumindest ein Teil der aktivierenden Wirkung von SGK1 auf GluR6 vermittelt werden könnte.

Die Ergebnisse zeigen, dass auch RIL die GluR6-Aktivität moduliert. RIL ist ein PDZ- und LIM-Domäne-tragendes Protein, das die AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR1 reguliert (Schulz et al., 2004). Die Arbeitsgruppe Schulz hat gezeigt, dass RIL über seine LIM-Domäne direkt mit GluR1 interagiert. Über seine PDZ-Domäne bindet RIL an α -Aktinin und stellt so vermutlich eine Verbindung zwischen GluR1-enthaltenden AMPA-Rezeptoren und dem α -Aktinin/Aktin-Zytoskelett her. Schulz et al. zeigten, dass RIL einen stimulierenden Einfluss auf GluR1-enthaltende AMPA-Rezeptoren hat. Sie vermuteten, dass RIL in einer α -Aktinin/Aktin-abhängigen Weise den Transport von GluR1-enthaltenden AMPA-Rezeptoren innerhalb dendritischer Dornen reguliert und die Insertion der Rezeptoren in die postsynaptische Membran fördert.

Die vorliegenden Daten identifizieren RIL als regulatorisches Protein von GluR6 und zeigen, dass RIL auch einen Effekt auf Kainatrezeptoren hat. Allerdings führt RIL nicht zu einer Steigerung (Schulz et al., 2004), sondern zu einer Hemmung der GluR6-Aktivität. Wie diese Hemmung zustande kommt, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Ebenfalls zu einer Hemmung der GluR6-Aktivität führte das Protein mTOR. mTOR ist eine Proteinkinase, die vermutlich durch SGK1 phosphoryliert wird (Shojaiefard et al., 2006a). Die Kinase reguliert den Kreatintransporter SLC6A8 (Shojaiefard et al., 2006a) sowie den intestinalen Phosphattransporter SLC34A2 (Shojaiefard und Lang, 2006b). In beiden Fällen hat mTOR einen stimulierenden Effekt. Wang et al. berichteten, dass der mTOR-Signalweg

vermutlich eine Rolle für die Oberflächenexpression von AMPA-Rezeptoren in kortikalen Neuronen spielt und die synaptische Expression der AMPA-Rezeptoruntereinheiten GluR2/GluR3 steigert (Wang et al., 2006).

Von einem hemmenden Effekt von mTOR berichteten Raab-Graham et al. (Raab-Graham et al., 2006). Sie fanden, dass mTOR die mRNA-Translation von dendritischen Kv1.1-Kaliumkanälen hemmt. Mittels Hemmung von mTOR durch Rapamycin zeigten Raab-Graham et al., dass dadurch die Proteinexpression von Kv1.1 in hippocampalen Neuronen und die Oberflächenexpression der Kanäle in den Dendriten verbessert wird. Möglicherweise hemmt mTOR die mRNA-Translation von GluR6, was zu einer verminderten Expression von GluR6 führen würde und damit eventuell zu einem verminderten Einbau von GluR6 in die Plasmamembran. Dadurch würden die GluR6-Ströme möglicherweise vermindert werden.

Es ist unwahrscheinlich, dass mTOR oder RIL die steigernde Wirkung von SGK1 auf GluR6 vermitteln, da beide Proteine die GluR6-Aktivität hemmen. Überraschenderweise führte die Injektion von NDRG2 zusammen mit SGK1 zu einer starken Verminderung der glutamatinduzierten Stromamplituden von GluR6. NDRG2 alleine hatte keinen Effekt auf den GluR6-Strom. Das Protein NDRG1 schien die aktivierende Wirkung von SGK1 aufzuheben. NDRG1 und NDRG2 sind Proteine, die durch SGK1 phosphoryliert werden (Murray et al., 2004). Es ist nicht bekannt, welche genaue(n) physiologische(n) Funktion(en) NDRG1 und NDRG2 haben. Ebenfalls ist unklar, welche genaue(n) Wirkung(en) die Phosphorylierung von NDRG1 und NDRG2 durch SGK1 hat. NDRG2 wird durch Mineralokortikoide wie Aldosteron induziert (Boukroun et al., 2002), die ebenfalls die Expression von SGK1 induzieren (Lang und Cohen, 2001). NDRG2 führte nur in Kombination mit SGK1 zu einer Hemmung der GluR6-Funktion. Es scheint, als ob NDRG2 nur dann seine negativ modulierende Wirkung auf GluR6 ausüben kann, wenn es vorher durch SGK1 phosphoryliert wurde. Möglicherweise hat SGK1 neben der aktivierenden Funktion auch eine hemmende Funktion in der Regulation der GluR6-Aktivität. Die hemmende Funktion würde möglicherweise durch Proteine, wie NDRG2, vermittelt werden.

Für die Vermittlung der aktivierenden Wirkung von SGK1 auf GluR6 spielen NDRG1 und NDRG2 vermutlich keine wichtige Rolle.

4.3 SGK-Isoformen als Regulatoren von GluR7

Für die zu den Kainat-Rezeptoren gehörende Glutamatrezeptoruntereinheit GluR6 war bereits bekannt, dass sie durch SGK-Isoformen reguliert wird, wobei die Kinase SGK1 im Mittelpunkt steht (Strutz-Seebohm et al., 2005a). Strutz-Seebohm et al. zeigten auch, dass die zu den AMPA-Rezeptoren zählende Untereinheit GluR1 ebenfalls durch SGK-Isoformen reguliert wird (Strutz-Seebohm et al., 2005b, Strutz-Seebohm et al., 2006a). Ob GluR7 als weiterer Vertreter der Kainat-Rezeptoren auch durch SGK-Isoformen reguliert wird, war nicht bekannt.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass SGK-Isoformen auch an der Regulation von GluR7 beteiligt sind. SGK2 und SGK3 modulieren den Strom von GluR7. SGK1 hatte keinen Effekt.

Die Daten der vorliegenden Arbeit beruhen auf Messungen von GluR7(K758N). Die Punktmutante GluR7(K758N) wird im gleichen Maße wie GluR7wt exprimiert und in die Oozytenplasmamembran inkorporiert. Sie liefert Ströme, die nach Applikation eines Agonisten in physiologischer Konzentration messbar sind (Strutz et al., 2001). Für GluR7wt lassen sich keine Ströme in *Xenopus*-Oozyten messen (Bettler et al., 1992; Lomeli et al., 1992). Für die Aktivierung werden extrem hohe, millimolare Agonistenkonzentrationen benötigt (Schiffer et al., 1997), die in *Xenopus*-Oozyten nicht verwendet werden können, da sie Artefakte auslösen.

GluR7 ist ein Rezeptor, über dessen Funktion und Regulation sehr wenig bekannt ist. Die Rezeptoruntereinheit galt lange Zeit als nicht-funktionell bezüglich der Ionenkanalfunktion. Strutz et al. zeigten, dass GluR7 nicht nicht-funktionell ist, sondern vielmehr einen Rezeptor mit extrem geringer Porenöffnungseffizienz darstellt (Strutz et al., 2001). Experimente, in denen GluR7 mit GluR6 koexprimiert wurde, zeigten, dass GluR7 die Stromamplitude

von GluR6 reduziert und eine negativ modulierende Funktion in heteromeren Kainatrezeptoren hat (Cui und Mayer, 1999; Strutz et al., 2001). Neueste Daten ordnen GluR7 eine essentielle Rolle in der synaptischen Übertragung im Hippocampus zu (Pinheiro et al., 2007). Jaskolski et al. fanden, dass alternatives Spleißen die Oberflächenexpression von GluR7 reguliert (Jaskolski et al., 2005).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken einen neuen Mechanismus in der Regulation von GluR7 auf. Offensichtlich wird GluR7 durch SGK2 und SGK3 reguliert. Der fehlende Effekt von SGK1 auf GluR7 beruht vermutlich nicht auf einer Inaktivität der Kinase im Oozytensystem. SGK1wt ist aktiv bei Injektion in *Xenopus*-Oozyten (Strutz-Seebohm et al., 2005a,b).

Für andere Kanäle, wie z.B. ENaC, HERG, CFTR, GluR1 und GluR6, die durch SGK reguliert werden, wurde gezeigt, dass SGK die Expression des Kanalproteins in der Plasmamembran steigert (Alvarez de la Rosa et al., 1999; Wagner et al., 2001; Strutz-Seebohm et al., 2005a,b; Maier et al., 2006; Sato et al., 2007). Höchstwahrscheinlich beruhen die gesteigerten Ströme von GluR7 bei Koexpression mit SGK3 zumindest zum Teil auf einer gesteigerten Expression des Kanalproteins von GluR7 in der Plasmamembran der Oozyte. Vermutlich vermindert SGK2 die Plasmamembranexpression von GluR7.

Alle drei SGK-Isoformen phosphorylieren Serin- und Threoninreste, die in der Aminosäuresequenz RXRXXS/T liegen, wobei X eine variable Aminosäure darstellt (Kobayashi und Cohen, 1999; Kobayashi et al., 1999). SGK2 und SGK3 phosphorylieren GluR7 vermutlich nicht direkt, da GluR7 keine putative SGK-Phosphorylierungsstelle besitzt (Strutz-Seebohm, 2006b). Es gibt höchstwahrscheinlich ein oder mehrere zwischengeschaltete Moleküle, die die regulierende Wirkung von SGK auf GluR7 vermitteln.

In den Experimenten verminderte SGK2 den Strom von GluR7. Strutz et al. zeigten, dass die zu den AMPA-Rezeptoren gehörenden Untereinheiten GluR2 und GluR3 durch die Isoform SGK3 gehemmt werden (Strutz-Seebohm et al., 2005b). Möglicherweise aktiviert SGK2 Proteinphosphatasen, die eine verstärkte Dephosphorylierung von GluR7 bewirken und dadurch die GluR7-Funktion hemmen könnten. Chergui et al. berichteten, dass die Serin-/Threonin-

Proteinkinase Caseinkinase 1 (CK1) die Aktivität von NMDA-Rezeptoren hemmt. Dies geschieht über einen Mechanismus, der die Aktivierung der Proteinphosphatase 1 und/oder 2A durch diese Kinase beinhaltet und in einer vermehrten Dephosphorylierung von NMDARs resultiert. Durch Hemmung der CK1 zeigten Chergui et al., dass dadurch NMDA-vermittelte EPSCs gesteigert werden. Die Unterklasse mGluR1 der metabotropen Glutamatrezeptoren nutzt die CK1, um NMDA-vermittelte synaptische Ströme zu hemmen (Chergui et al., 2005). Möglicherweise nutzen andere Rezeptoruntereinheiten, wie z.B. GluR6, der durch GluR7 gehemmt wird (Cui und Mayer, 1999; Strutz et al., 2001), die Kinase SGK2, um GluR7 zu hemmen. Dadurch würde möglicherweise die Aktivität von GluR6 gesteigert werden.

In den Versuchen mit GluR7 hatte auch die Proteinkinase B (PKB) eine hemmende Wirkung auf GluR7. PKB wurde in den Versuchen mit SGK als Kontrolle für die SGK-Spezifität des regulatorischen Mechanismus eingesetzt. PKB ist eine Proteinkinase, die ubiquitär verbreitet ist und viele Targetproteine hat. Sie hat Ähnlichkeit zu SGK (Kobayashi und Cohen, 1999; Kobayashi et al., 1999). Anhand der vorliegenden Daten kann nicht ausgeschlossen werden, dass PKB und SGK2, die beide die Ströme von GluR7 vermindern, dieselbe Funktion erfüllen und über denselben Mechanismus ihre hemmende Wirkung auf GluR7 ausüben.

4.4 SGK-Isoformen als Regulatoren des NMDA-Rezeptorkomplexes NR1-1a/NR2B

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob NMDA-Rezeptoren ebenfalls durch SGK reguliert werden. Als Vertreter für die NMDA-Rezeptoren diente der NMDA-Rezeptorkomplex NR1-1a/NR2B.

Die Daten zeigen, dass SGK-Isoformen auch NR1-1a/NR2B regulieren. SGK1 und SGK3 steigern den NMDA-Rezeptorstrom signifikant. Die Kinase SGK2 hatte keinen Effekt auf den Strom.

NMDA-Rezeptoren spielen eine grundlegende Rolle für die synaptische Plastizität im Hippocampus (Morris, 1989; Sakimura et al., 1995; Murphy et al., 1997; Collingridge, 2003). Die Modulierbarkeit der Effektivität chemischer Synapsen ist höchstwahrscheinlich Grundvoraussetzung für Lernvorgänge und die Abspeicherung von Gedächtnisinhalten jeglicher Art. Molekulare Mechanismen, die der Regulation und Funktion von NMDA-Rezeptoren zugrunde liegen, wurden und werden intensiv untersucht.

Ein fundamentaler Mechanismus in der Regulation von NMDA-Rezeptoren stellt die Phosphorylierung von NMDA-Rezeptoren und die Regulation durch Kinasen dar (Lau und Huganir, 1995; Lan et al., 2001; Chen et al., 2006). Dadurch werden sowohl das Trafficking und die Oberflächenexpression der Rezeptoren als auch die Ionenkanaleigenschaften reguliert (Lan et al., 2001; Chen et al., 2006). Zu den regulatorischen Mechanismen von NMDA-Rezeptoren gehört auch die Interaktion der Rezeptoren mit Phosphatasen (Braithwaite et al., 2006) und mit PDZ-Domäne-tragenden Proteinen (O'Brien et al., 1998; Iwamoto et al., 2004).

Der Effekt von SGK-Isoformen auf NMDA-Rezeptoren wurde bis jetzt von keiner Arbeitsgruppe untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse decken neue molekulare Determinanten in der Regulation der NMDA-Rezeptoren auf. Die Kinasen SGK1 und SGK3 steigern die NR1-1a/NR2B-Aktivität - vermutlich zum Teil dadurch bedingt, dass sie die Plasmamembranexpression von NR1-1a/NR2B in der Oozyte steigern.

Der Rezeptorkomplex NR1-1a/NR2B wird höchstwahrscheinlich ebenfalls nicht direkt durch SGK1 und SGK3 phosphoryliert. NR2B hat keine putative SGK-Erkennungssequenz (Strutz-Seeböhm, 2006b). NR1-1a hat eine SGK-Erkennungssequenz, aber extrazellulär gelegen und daher nicht interessant für eine mögliche Interaktion mit SGK. SGK1 und SGK3 vermitteln ihre Wirkung deshalb sehr wahrscheinlich über ein oder mehrere zwischengeschaltete Moleküle. Ein Protein, welches als zwischengeschaltetes Molekül in Frage kommt, ist Yotiao (Lin et al., 1998). Yotiao interagiert mit NR1 und stellt so vermutlich eine funktionelle Verbindung von NR1 zum Zytoskelett her (Lin et al., 1998). Yotiao reguliert NMDA-Rezeptorkanäle, indem es bestimmte

regulierende Proteine mit NMDAR verbindet („Targeting“) (Feliciello et al., 1999; Westphal et al., 1999). In weiteren Experimenten müsste geklärt werden, ob Yotiao an der SGK-abhängigen Regulation von NR1-1a/NR2B beteiligt ist.

NMDA-Rezeptoren sind an hippocampalen Gedächtnisfunktionen, wie dem räumlichen Lernen, beteiligt (Morris, 1989; Sakimura et al., 1995; Tsien et al., 1996; Lee und Kesner, 2002). Interessanterweise führte gerade SGK1 zu einer Steigerung der NR1-1a/NR2B-Ströme. Wie die vorliegenden Experimente zeigen hat die Kinase keinen Effekt auf GluR7. Auf die zu den AMPA-Rezeptoren gehörende Untereinheit GluR1 hat SGK1 ebenfalls keinen Effekt (Strutz-Seebohm et al., 2005b). SGK1 wird mit dem räumlichen Lernvermögen von Ratten in Verbindung gebracht (Tsai et al., 2002). Tsai et al. fanden, dass SGK1-mRNA-Level im Hippocampus von Ratten mit deren räumlichen Lernvermögen korrelieren. Transfektion von mutierter SGK1-DNA in die CA1-Region des Hippocampus verschlechterte das räumliche Lernvermögen, während Transfektion von SGK1-Wildtyp-DNA dasselbige verbesserte (Tsai et al., 2002). Die Ergebnisse geben direkten Hinweis, dass eine gesteigerte SGK1-Expression im Hippocampus die Gedächtniskonsolidierung von räumlichen Lernvorgängen bei Ratten verbessert.

Webster et al. zeigten, dass SGK1 genomisch durch Glukokortikoide reguliert wird (Webster et al., 1993). Glukokortikoide erleichtern die Gedächtniskonsolidierung bei verschiedenen Lernaufgaben von Mäusen und Ratten (Tsai et al., 2002).

Möglicherweise findet bei räumlichen Lernvorgängen unter anderem eine vermehrte Expression von SGK1 durch Glukokortikoide statt, was über zwischengeschaltete Moleküle, wie z.B. Yotiao, zu einem vermehrten Targeting von NMDA-Rezeptoren zur Synapse führt, wodurch die NMDAR-Expression in der (postsynaptischen) Membran gesteigert wird. Der Ca^{2+} -Einstrom durch aktivierte NMDAR trägt dann zu einer anhaltenden Verstärkung der synaptischen Übertragung im Hippocampus bei, wodurch räumliche Lerninhalte gefestigt werden. Möglicherweise spielt auch die vermehrte Expression der Untereinheit GluR6 durch Glukokortikoide und SGK1 (Strutz-Seebohm et al., 2005a) eine Rolle bei räumlichen Lernvorgängen.

4.5 Schlussfolgerung aus der Arbeit

Jamain et al. fanden, dass GluR6 signifikant mit Autismus assoziiert ist. Sie identifizierten die Punktmutation M836I in einer hochkonservierten Domäne der intrazellulären C-terminalen Region von GluR6 (Jamain et al., 2002). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Mutation zu veränderten funktionellen Eigenschaften von GluR6 führt. Die Ergebnisse schaffen damit eine funktionelle Basis für die postulierte Verbindung zwischen GluR6 und Autismus. Außerdem deckt die Arbeit einen neuen Mechanismus in der Regulation von GluR6^{wt} und GluR6(M836I) auf und ordnet den kleinen G-Proteinen Rab5 und Rab11 neue Funktionen als Regulatoren der GluR6-Aktivität zu. Des Weiteren identifiziert die Arbeit neue molekulare Determinanten der Regulation von GluR6. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch Grb2, Yotiao, RIL, mTOR und NDRG2 (in Kombination mit SGK1) die GluR6-Aktivität modulieren. Es bedarf weiterer Experimente, um herauszufinden, über welche Mechanismen diese Proteine GluR6 beeinflussen. Die Daten zeigen außerdem, dass die SGK-Isoformen auch GluR7 und NMDAR1-1a/NR2B regulieren. Für die Kainatrezeptoruntereinheit GluR6 war bereits bekannt, dass diese durch SGK-Isoformen reguliert wird (Strutz-Seebohm et al., 2005a). In weiteren Experimenten könnte untersucht werden, ob auch die zu den Kainatrezeptoren gehörende Untereinheit GluR5 durch SGK reguliert wird. Insgesamt zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit sowie früherer Arbeiten (Strutz-Seebohm et al., 2005a,b), dass die SGK-Isoformen keine einheitliche Gruppe in der Regulation der Glutamatrezeptoren bilden und neben ihrer aktivierenden Funktion auch hemmende Funktion haben. Keine der bisher untersuchten Rezeptoruntereinheiten wird vermutlich direkt durch SGK moduliert. Möglicherweise vermittelt eines der getesteten Modulatorproteine die regulierende Wirkung der SGK. Es sind weitere Untersuchungen nötig, um die SGK-abhängige Regulation von Glutamatrezeptoren weiter aufzudecken. Alle Experimente wurden mittels des Modellsystems „*Xenopus laevis*-Oozyte“ durchgeführt. Man kann nicht ausschließen, dass der Effekt kleiner G-Proteine, Kinasen sowie anderer modulierender Proteine in neuronalen Zellen

möglicherweise anders ist als in Oozyten. Des weiteren handelt es sich um keine mammale Zelllinie. Möglicherweise exprimieren die Oozyten bestimmte Proteine nicht, was ebenfalls einen Einfluss auf die Ströme haben könnte. Bei Ergebnissen, die für die Medizin relevant sind, müssten die Versuche deshalb auch noch in einem anderen Expressionssystem durchgeführt werden. Nichtsdestotrotz deckt die Arbeit neue molekulare Determinanten in der Regulation von Kainat- und NMDA-Rezeptoren auf und weist den getesteten Proteinen neue Funktionen als Regulatoren von GluR6, GluR7 bzw. NMDAR1-1a/NR2B zu.

5. Zusammenfassung

Ionotrope Glutamatrezeptoren sind die vorherrschenden exzitatorischen Neurotransmitterrezeptoren im Zentralnervensystem der Wirbeltiere. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Regulation von Kainat- und NMDA-Rezeptoren.

Kürzlich wurde gezeigt, dass ein Polymorphismus der zu den Kainat-Rezeptoren gehörenden Glutamatrezeptoruntereinheit GluR6 signifikant mit Autismus assoziiert ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Autismus-assoziierte Mutation M836I in GluR6 einen funktionellen Effekt (*gain-of-function-mutation*) im heterologen Oozyten-Expressionssystem hat. Koexpression von GluR6(M836I) mit Rab11 führte zu einer signifikanten Steigerung der Stromamplituden von GluR6(M836I). Auf GluR6wt-Ströme hatte Rab11 keinen Effekt. Koexpressionsexperimente von Rab5 mit GluR6wt ergaben eine signifikante Verminderung der Stromamplituden von GluR6wt. Auf GluR6(M836I) hatte Rab5 keinen Effekt. Das kleine G-Protein Rab11 scheint für die Membranreinsertion von GluR6(M836I) wichtig zu sein, während Rab5 eine besondere Rolle bei der Internalisierung von GluR6wt spielt, was den *gain-of-function*-Effekt erklärt. Somit schaffen diese eine funktionelle Basis für die postulierte Verbindung zwischen GluR6 und Autismus.

Vor kurzem wurde gezeigt, dass GluR6 durch *Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinase* (SGK)-Isoformen stimuliert wird. Die genaue Wirkweise der SGKinasen auf die Rezeptoren ist aber unbekannt. Deshalb wurden die potentiellen Modulatorproteine Grb2 (*growth factor receptor-bound 2*), Yotiao (*A-kinase anchoring protein*), RIL (*reversion-induced LIM protein*), mTOR (*mammalian target of rapamycin*) und NDRG2 (*N-myc downstream-regulated gene 2*) auf ihren möglichen regulatorischen Effekt auf die GluR6-Aktivität getestet. Grb2 und Yotiao steigerten die GluR6-Aktivität, während RIL, mTOR und NDRG2 (in Kombination mit SGK1) einen hemmenden Effekt hatten.

Da SGKinasen und die verwandte PKB eine Reihe von Ionenkanälen regulieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung auf den Kainat-

Rezeptor GluR7 und NMDA-Rezeptoren getestet. Während SGK2 und PKB die GluR7-Funktion inhibieren, stimuliert SGK3 GluR7 im heterologen Expressionssystem. Die Koexpression von NMDAR1-1a/NR2B mit SGK-Isoformen ergab eine steigernde Wirkung von SGK1 und SGK3 auf die NMDAR-Ströme.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue Ansatzpunkte für das molekulare Verständnis von Autismus gewonnen werden. Zudem wurden neue Modulatoren der Kainat-Rezeptoren GluR6 und GluR7 und der NMDA-Rezeptoren identifiziert, welche durchaus physiologische Bedeutung haben könnten.

6. Literaturverzeichnis

- Advokat C, Pellegrin AI (1992). Excitatory amino acids and memory: evidence from research on Alzheimer's disease and behavioral pharmacology. *Neurosci Biobehav Rev* **16**, 13-24.
- Alvarez de la Rosa D, Zhang P, Náray-Fejes-Tóth A, Fejes-Tóth G, Canessa CM (1999). The serum and glucocorticoid kinase SGK increases the abundance of epithelial sodium channels in the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **274**, 37834-37839.
- Appel SH (1993). Excitotoxic neuronal cell death in amyotrophic lateral Sclerosis. *Trends Neurosci* **16**, 3-5.
- Baltaev R, Strutz-Seebohm N, Korniyuchuk G, Myssina S, Lang F, Seebohm G (2005). Regulation of cardiac shal-related potassium channel Kv 4.3 by serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms in *Xenopus* oocytes. *Pflügers Arch* **450**, 26-33.
- Bettler B, Egebjerg J, Sharma G, Pecht G, Hermans-Borgmeyer I, Moll C, Stevens CF, Heinemann S (1992). Cloning of a putative glutamate receptor: a low affinity kainate-binding subunit. *Neuron* **8**, 257-265.
- Blandini F, Porter RH, Greenamyre JT (1996). Glutamate and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol* **12**, 73-94.
- Bliss TV, Lomo T (1970). Plasticity in a monosynaptic cortical pathway. *J Physiol* **207**, 61P.
- Boukroun S, Fay M, Zennaro MC, Escoubet B, Jaisser F, Blot-Chabaud M, Farman N, Courtois-Coutry N (2002). Characterization of rat NDRG2 (N-Myc downstream regulated gene 2), a novel early mineralocorticoid-specific induced gene. *J Biol Chem* **277**, 31506-31515.
- Braithwaite SP, Adkisson M, Leung J, Nava A, Masterson B, Urfer R, Oksenberg D, Nikolic K (2006). Regulation of NMDA receptor trafficking and function by striatal-enriched tyrosine phosphatase (STEP). *Eur J Neurosci* **23**, 2847-2856.
- Bureau I, Bischoff S, Heinemann SF, Mülle C (1999). Kainate receptor-mediated responses in the CA1 field of wild-type and GluR6-deficient mice. *J Neurosci* **19**, 653-663.
- Chen BS, Braud S, Badger JD 2nd, Isaac JT, Roche KW (2006). Regulation of NR1/NR2C N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors by phosphorylation. *J Biol Chem* **281**, 16583-16590.

- Chen L, Kurokawa J, Kass RS (2005). Phosphorylation of the A-kinase-anchoring protein Yotiao contributes to protein kinase A regulation of a heart potassium channel. *J Biol Chem* **280**, 31347-31352.
- Chen L, Kass RS (2006). Dual roles of the A kinase-anchoring protein Yotiao in the modulation of a cardiac potassium channel: a passive adaptor versus an active regulator. *Eur J Cell Biol* **85**, 623-626.
- Chergui K, Svenningsson P, Greengard P (2005). Physiological role for casein kinase 1 in glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci* **25**, 6601-6609.
- Chittajallu R, Braithwaite SP, Clarke VR, Henley JM (1999). Kainate receptors: subunits, synaptic localization and function. *Trends Pharmacol Sci* **20**, 26-35.
- Choi DW, Rothman SM (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* **13**, 171-182.
- Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol* **334**, 33-46.
- Collingridge GL (2003). The induction of N-methyl-D-aspartate receptor-dependent long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 635-641.
- Contractor A, Swanson GT, Sailer A, O`Gorman S, Heinemann SF (2000). Identification of the kainate receptor subunits underlying modulation of excitatory synaptic transmission in the CA3 region of the hippocampus. *J Neurosci* **20**, 8269-8278.
- Contractor A, Swanson G, Heinemann SF (2001). Kainate receptors are involved in short- and long-term plasticity at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* **29**, 209-216.
- Cui C, Mayer ML (1999). Heteromeric kainate receptors formed by the coassembly of GluR5, GluR6, and GluR7. *J Neurosci* **19**, 8281-8291.
- Dingledine R, McBain CJ, McNamara JO (1990). Excitatory amino acid receptors in epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* **11**, 334-338.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* **51**, 7-61.

- Feliciello A, Cardone L, Garbi C, Ginsberg MD, Varrone S, Rubin CS, Avvedimento EV, Gottesman ME (1999). Yotiao protein, a ligand for the NMDA receptor, binds and targets cAMP-dependent protein kinase II(1). *FEBS Lett* **464**, 174-178.
- Francis PT (2005). The interplay of neurotransmitters in Alzheimer`s disease. *CNS Spectr* **10**, 6-9.
- Frerking M, Nicoll RA (2000). Synaptic kainate receptors. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 342-351.
- Garcia EP, Mehta S, Blair LA, Wells DG, Shang J, Fukushima T, Fallon JR, Garner CC, Marshall J (1998). SAP90 binds and clusters kainate receptors causing incomplete desensitization. *Neuron* **21**, 727-739.
- Herb A, Burnashev N, Werner P, Sakmann B, Wisden W, Seeburg PH (1992). The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron* **8**, 775-785.
- Huettner JE (2001). Kainate receptors: knocking out plasticity. *Trends Neurosci* **24**, 365-366.
- Iwamoto T, Yamada Y, Hori K, Watanabe Y, Sobue K, Inui M (2004). Differential modulation of NR1-NR2A and NR1-NR2B subtypes of NMDA receptor by PDZ domain-containing proteins. *J Neurochem* **89**, 100-108.
- Jamain S, Betancur C, Quach H, Philippe A, Fellous M, Giros B, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T (2002). Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. *Mol Psychiatry* **7**, 302-310.
- Jaskolski F, Normand E, Mulle C, Coussen F (2005). Differential trafficking of GluR7 kainate receptor subunit splice variants. *J Biol Chem* **280**, 22968-22976.
- Jiang X, Huang F, Marusyk A, Sorkin A (2003). Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits. *Mol Biol Cell* **14**, 858-870.
- Kamiya H (2002). Kainate receptor-dependent presynaptic modulation and plasticity. *Neurosci Res* **42**, 1-6.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (1996). Neurowissenschaften: eine Einführung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Kawasaki M, Nakayama K, Wakatsuki S (2005). Membrane recruitment of effector proteins by Arf and Rab GTPases. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 681-689.

- Kidd FL, Isaac JT (1999). Developmental and activity-dependent regulation of kainate receptors at thalamocortical synapses. *Nature* **400**, 569-573.
- Kobayashi T, Deak M, Morrice N, Cohen P (1999). Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochem J* **344**, 189-197.
- Kobayashi T, Cohen P (1999). Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositol 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem J* **339**, 319-328.
- Kurokawa J, Motoike HK, Rao J, Kass RS (2004). Regulatory actions of the A-kinase anchoring protein Yotiao on a heart potassium channel downstream of PKA phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16374-16378.
- Lan JY, Skeberdis VA, Jover T, Grooms SY, Lin Y, Araneda RC, Zheng X, Bennett MV, Zukin RS (2001). Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. *Nat Neurosci* **4**, 382-390.
- Lang F, Cohen P (2001). Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci STKE* **2001**, RE17.
- Lang F, Henke G, Embark HM, Waldegger S, Palmada M, Bohmer C, Vallon V (2003). Regulation of channels by the serum and glucocorticoid-inducible kinase-implications for transport, excitability and cell proliferation. *Cell Physiol Biochem* **13**, 41-50.
- Lau LF, Huganir RL (1995). Differential tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem* **270**, 20036-20041.
- Lee I, Kesner RP (2002). Differential contribution of NMDA receptors in hippocampal subregions to spatial working memory. *Nat Neurosci* **5**, 162-168.
- Lerma J, Paternain AV, Rodriguez-Moreno A, Lopez-Garcia JC (2001). Molecular physiology of kainate receptors. *Physiol Rev* **81**, 971-998.
- Lin JW, Wyszynski M, Madhavan R, Sealock R, Kim JU, Sheng M (1998). Yotiao, a novel protein of neuromuscular junction and brain that interacts with specific splice variants of NMDA receptor subunit NR1. *J Neurosci* **18**, 2017-2027.
- Lomeli H, Wisden W, Köhler M, Keinänen K, Sommer B, Seeburg PH (1992). High-affinity kainate and domoate receptors in rat brain. *FEBS Lett* **307**, 139-143.

- Maier G, Palmada M, Rajamanickam J, Shumilina E, Böhmer C, Lang F (2006). Upregulation of HERG channels by the serum and glucocorticoid inducible kinase isoform SGK3. *Cell Physiol Biochem* **18**, 177-186.
- Martin S, Henley JM (2004). Activity-dependent endocytic sorting of kainate receptors to recycling or degradation pathways. *EMBO J* **23**, 4749-4759.
- Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR, Kass RS (2002). Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science* **295**, 496-499.
- Mehta S, Wu H, Garner CC, Marshall J (2001). Molecular mechanisms regulating the differential association of kainate receptor subunits with SAP90/PSD-95 and SAP97. *J Biol Chem* **276**, 16092-16099.
- Meldrum B, Garthwaite J (1990). Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci* **11**, 379-387.
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* **319**, 774-776.
- Morris RG (1989). Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci* **9**, 3040-3057.
- Mulle C, Sailer A, Perez-Otano I, Dickinson-Anson H, Castillo PE, Bureau I, Maron C, Gage FH, Mann JR, Bettler B, Heinemann SF (1998). Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature* **392**, 601-605.
- Mulle C, Sailer A, Swanson GT, Brana C, O'Gorman S, Bettler B, Heinemann SF (2000). Subunit composition of kainate receptors in hippocampal interneurons. *Neuron* **28**, 475-484.
- Murphy KP, Reid GP, Trentham DR, Bliss TV (1997). Activation of NMDA receptors is necessary for the induction of associative long-term potentiation in area CA1 of the rat hippocampal slice. *J Physiol* **504**, 379-385.
- Murray JT, Campbell DG, Morrice N, Auld GC, Shpiro N, Marquez R, Pegg M, Bain J, Bloomberg GB, Grahammer F, Lang F, Wulff P, Kuhl D, Cohen P (2004). Exploitation of KESTREL to identify NDRG family members as physiological substrates for SGK1 and GSK3. *Biochem J* **384**, 477-488.

- O'Brien RJ, Lau LF, Huganir RL (1998). Molecular mechanisms of glutamate receptor clustering at excitatory synapses. *Curr Opin Neurobiol* **8**, 364-369.
- Park J, Leong ML, Buse P, Maiyar AC, Firestone GL, Hemmings BA (1999). Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J* **18**, 3024-3033.
- Pearce D (2003). SGK1 regulation of epithelial sodium transport. *Cell Physiol Biochem* **13**, 13-20.
- Pinheiro PS, Perrais D, Coussen F, Barhanin J, Bettler B, Mann JR, Malva JO, Heinemann SF, Mulle C (2007). GluR7 is an essential subunit of presynaptic kainate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12181-12186.
- Raab-Graham KF, Haddick PC, Jan YN, Jan LY (2006). Activity- and mTOR-dependent suppression of Kv1.1 channel mRNA translation in dendrites. *Science* **314**, 144-148.
- Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, Yagi T, Aizawa S, Inoue Y, Sugiyama H et al. (1995). Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature* **373**, 151-155.
- Sato JD, Chapline MC, Thibodeau R, Frizzell RA, Stanton BA (2007). Regulation of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) by serum- and glucocorticoid- inducible kinase (SGK1). *Cell Physiol Biochem* **20**, 91-98.
- Schiffer HH, Swanson GT, Heinemann SF (1997). Rat GluR7 and a carboxy-terminal splice variant, GluR7b, are functional kainate receptor subunits with a low sensitivity to glutamate. *Neuron* **19**, 1141-1146.
- Schulz TW, Nakagawa T, Licznanski P, Pawlak V, Kolleker A, Rozov A, Kim J, Dittgen T, Köhr G, Sheng M, Seeburg PH, Osten P (2004). Actin/ α -actinin-dependent transport of AMPA receptors in dendritic spines: role of the PDZ-LIM protein RIL. *J Neurosci* **24**, 8584-8594.
- Seeböhm G, Strutz-Seeböhm N, Baltaev R, Korniychuk G, Knirsch M, Engel J, Lang F (2005). Regulation of KCNQ4 potassium channel prepulse dependence and current amplitude by SGK1 in *Xenopus* oocytes. *Cell Physiol Biochem* **16**, 255-262.
- Sheng M, Kim MJ (2002). Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* **298**, 776-780.

- Sheng M, Nakagawa T (2002). Neurobiology: glutamate receptors on the move. *Nature* **417**, 601-602.
- Shimizu E, Tang YP, Rampon C, Tsien JZ (2000). NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science* **290**, 1170-1174.
- Shojaiefard M, Christie DL, Lang F (2006a). Stimulation of the creatine transporter SLC6A8 by the protein kinase mTOR. *Biochem Biophys Res Commun* **341**, 945-949.
- Shojaiefard M, Lang F (2006b). Stimulation of the intestinal phosphate transporter SLC34A2 by the protein kinase mTOR. *Biochem Biophys Res Commun* **345**, 1611-1614.
- Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y (1992a). Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* **257**, 201-206.
- Silva AJ, Paylor R, Wehner JM, Tonegawa S (1992b). Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* **257**, 206-211.
- Sommer B, Burnashev N, Verdoorn TA, Keinänen K, Sakmann B, Seeburg PH (1992). A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. *EMBO J* **11**, 1651-1656.
- Storey E, Kowall NW, Finn SF, Mazurek MF, Beal MF (1992). The cortical lesion of Huntington's disease: further neurochemical characterization, and reproduction of some of the histological and neurochemical features by N-methyl-D-aspartate lesions of rat cortex. *Ann Neurol* **32**, 526-534.
- Strutz N, Villmann C, Thalhammer A, Kizelsztejn P, Eisenstein M, Teichberg VI, Hollmann M (2001). Identification of domains and amino acids involved in GluR7 ion channel function. *J Neurosci* **21**, 401-411.
- Strutz-Seebohm N, Seebohm G, Shumilina E, Mack AF, Wagner HJ, Lampert A, Grahammer F, Henke G, Just L, Skutella T, Hollmann M, Lang F (2005a). Glucocorticoid adrenal steroids and glucocorticoid-inducible kinase isoforms in the regulation of GluR6 expression. *J Physiol* **565**, 391-401.
- Strutz-Seebohm N, Seebohm G, Mack AF, Wagner HJ, Just L, Skutella T, Lang UE, Henke G, Striegel M, Hollmann M, Rouach N, Nicoll RA, McCormick JA, Wang J, Pearce D, Lang F (2005b). Regulation of GluR1 abundance in murine hippocampal neurones by serum- and glucocorticoid-inducible kinase 3. *J Physiol* **565**, 381-390.

- Strutz-Seebohm N, Seebohm G, Korniychuk G, Baltaev R, Ureche O, Striegel M, Lang F (2006a). Additive regulation of GluR1 by stargazin and serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoform SGK3. *Pflügers Arch* **452**, 276-282.
- Strutz-Seebohm N (2006b). Persönliche Mitteilung.
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153-208.
- Trepel M (1999). Neuroanatomie: Struktur und Funktion. 2., überarbeitete Auflage, Urban und Fischer Verlag, München, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm.
- Tsai KJ, Chen SK, Ma YL, Hsu WL, Lee EH (2002). Sgk, a primary glucocorticoid-induced gene, facilitates memory consolidation of spatial learning in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3990-3995.
- Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* **87**, 1327-1338.
- Turley KR, Toledo-Pereyra LH, Kothari RU (2005). Molecular mechanisms in the pathogenesis and treatment of acute ischemic stroke. *J Invest Surg* **18**, 207-218.
- Wagner CA, Ott M, Klingel K, Beck S, Melzig J, Friedrich B, Wild KN, Bröer S, Moschen I, Albers A, Waldegger S, Tümmler B, Egan ME, Geibel JP, Kandolf R, 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**, 209-218.
- Waldegger S, Barth P, Raber G, Lang F (1997). Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4440-4445.
- Wang LY, Taverna FA, Huang XP, MacDonald JF, Hampson DR (1993). Phosphorylation and modulation of a kainate receptor (GluR6) by cAMP-dependent protein kinase. *Science* **259**, 1173-1175.
- Wang Y, Barbaro MF, Baraban SC (2006). A role for the mTOR pathway in surface expression of AMPA receptors. *Neurosci Lett* **401**, 35-39.

- Wärntges S, Friedrich B, Henke G, Durantou C, Lang PA, Waldegger S, Meyermann R, Kuhl D, Speckmann EJ, Obermüller N, Witzgall R, Mack AF, Wagner HJ, Wagner A, Broer S, Lang F (2002). Cerebral localization and regulation of the cell volume-sensitive serum- and glucocorticoid-dependent kinase SGK1. *Pflügers Arch* **443**, 617-624.
- Watkins JC, Evans RH (1981). Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **21**, 165-204.
- Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC, Firestone GL (1993). Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol Cell Biol* **13**, 2031-2040.
- Werner P, Voigt M, Keinänen K, Wisden W, Seeburg PH (1991). Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *Nature* **351**, 742-744.
- Westphal RS, Tavalin SJ, Lin JW, Alto NM, Fraser ID, Langeberg LK, Sheng M, Scott JD (1999). Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex. *Science* **285**, 93-96.
- Yamazaki T, Zaal K, Hailey D, Presley J, Lippincott-Schwartz J, Samelson LE (2002). Role of Grb2 in EGF-stimulated EGFR internalization. *J Cell Sci* **115**, 1791-1802.

Danksagung

Für die freundliche Aufnahme und seine Begeisterung für die experimentelle Grundlagenforschung im Bereich der Membranphysiologie danke ich *Prof. Dr. Florian Lang*, dem Leiter des Instituts für Physiologie der Universität Tübingen, Abteilung Physiologie I.

Mein besonderer Dank gilt meinen „Doktoreltern“ *PD Dr. Guiscard Seeböhm* und *Dr. Nathalie Strutz-Seeböhm* für die Überlassung des Themas, die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit und die hervorragende Betreuung in allen Phasen der Doktorarbeit. Sie hatten stets ein offenes Ohr für meine Fragen und gaben mir wertvolle Anregungen bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente. Darüber hinaus waren sie jederzeit für ein persönliches Gespräch erreichbar und schufen eine freundschaftliche und motivierende Arbeitsatmosphäre im Labor.

Herzlich bedanke ich mich bei *Ravshan Baltaev* für die freundliche Einführung in die elektrophysiologischen Arbeitsmethoden und seine technische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Seine Hilfsbereitschaft und optimistische Haltung gaben mir Mut und motivierten mich bei der Durchführung der Versuche.

Ferner gilt mein Dank *Dr. Svetlana Myssina* und *Dr. Ganna Korniychuk* aus dem molekularbiologischen Labor, die die cRNA für die Versuche herstellten.

Allen weiteren Mitarbeitern des Physiologischen Instituts danke ich für die freundliche Aufnahme und die positive Atmosphäre.

Meiner Freundin *Birgit Schwarz* danke ich für ihr wissenschaftliches Interesse an meiner Arbeit und ihre PC-technischen Hilfestellungen bei der Abfassung des Manuskripts.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Schwarz
Vorname	Regina
Geboren	05.04.1982 / München
Eltern	Dr.rer.nat. Gerd Schwarz, Dipl.-Biologe Dr.med. Monika Schwarz, geb. Frey, Frauenärztin
Geschwister	vier Schwestern, zwei Brüder

Bildungsweg

1988-1992	Grundschule: Schillerschule Spaichingen
1992-2001	Gymnasium Spaichingen, abgeschlossen mit der allgemeinen Hochschulreife
Juli-Sept. 2001	Krankenpflegepraktikum an der Kreisklinik Spaichingen
seit Okt. 2001	Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Sept. 2003	Ärztliche Vorprüfung (alte ÄAppO)
seit März 2004	Promotionsarbeit am Physiologischen Institut I der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Prof. Dr. F. Lang), Arbeitsgruppe Glutamatrezeptoren (Dr. N. Strutz-Seebohm) und Arbeitsgruppe Ionenkanäle (PD Dr. G. Seebohm, Betreuer der Arbeit)
Aug. 2006 -Juli 2007	Praktisches Jahr am Zollernalbkrankenhaus Balingen mit den Fächern Innere Medizin, Chirurgie und Anästhesiologie (Wahlfach)
30. Mai 2008	Zweite ärztliche Prüfung (neue ÄAppO)

Publikationsverzeichnis

Originalpublikation:

Strutz-Seebohm N, Korniychuk G, Schwarz R, Baltaev R, Ureche ON, Mack AF, Ma ZL, Hollmann M, Lang F, Seebohm G (2006). Functional significance of the kainate receptor GluR6(M836I) mutation that is linked to autism. *Cell Physiol Biochem* **18**, 287-294.