

**Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen,
Abteilung Physiologie I
Leiter: Professor Dr. Florian Lang**

**Regulation der ionotropen AMPA-Rezeptoren GluR1,
GluR2, GluR3 und GluR4 durch die Serum- und
Glukokortikoid-abhängige Kinase SGK und die
Proteinkinase PKB**

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

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

vorgelegt von

**Marion Bettina Striegel
aus
Ludwigsburg**

2009

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. F. Lang

2. Berichterstatter:

Frau Professor Dr. M. Knipper

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

1.	Einleitung	1
1.1	Die physiologische Rolle des Glutamats.....	2
1.1.1	<i>Funktion des Glutamats</i>	2
1.1.2	<i>Aufbau und Struktur des Glutamats</i>	2
1.1.3	<i>Synthese, Stoffwechsel und Abbau des Glutamats</i>	3
1.2	Die Rolle der Glutamatrezeptoren	4
1.2.1	<i>Die Glutamatrezeptoren</i>	6
1.2.2	<i>Struktur von Glutamatrezeptoren</i>	7
1.2.3	<i>AMPA-Rezeptoren (GluR1-4)</i>	9
1.2.4	<i>Agonisten und Antagonisten der AMPA-Rezeptoren</i>	10
1.2.5	<i>Mechanismus der Ligandenbindung, Kanalaktivierung und Desensitisierung von AMPA-Rezeptoren</i>	11
1.2.6	<i>Oligomerisierung der AMPA-Rezeptoren</i>	13
1.2.7	<i>Oberflächenexpression von AMPA-Rezeptoren</i>	14
1.3	Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinase.....	16
1.3.1	<i>Eingruppierung der hSGK innerhalb der Proteinkinasen</i>	16
1.3.2	<i>Isoformen und Gewebeverteilung</i>	17
1.3.3	<i>Regulation der SGK</i>	17
1.3.4	<i>Interaktion der SGK mit anderen Proteinen</i>	20
1.3.5	<i>Die physiologische Funktion der SGK</i>	21
1.4	Fragestellung der Arbeit	23
2.	Material und Methoden.....	25
2.1	Verwendete Lösungen und Substanzen.....	25
2.2	Oozyten des <i>Xenopus laevis</i> als Expressionssystem.....	29
2.2.1	<i>Frosch-OP und Präparation der Oozyten</i>	30
2.2.2	<i>cRNA-Synthese und -Injektion</i>	32
2.3	Elektrophysiologische Methoden.....	35
2.3.1	<i>Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (two electrode voltage clamp [TEVC])</i>	35
2.3.2	<i>Aufbau des Messplatzes für die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme</i>	36
2.3.4	<i>Durchführung der Experimente</i>	37
2.4	Auswertung und Statistik	38
2.5	Proteinbiochemische Methoden.....	40

2.5.1	<i>Proteinisolierung aus Xenopus-Oozyten und spezifische Markierung von Proteinen in der Plasmamembran</i>	40
2.5.2	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)</i>	40
2.5.3	<i>Western Blot</i>	40
2.5.4	<i>RT-PCR</i>	41
3.	Versuche und Ergebnisse	42
3.1	Regulation des GluR1	42
3.1.1	<i>GluR1 und SGK</i>	42
3.1.2	<i>Regulation von GluR1(L479Y) durch SGK3 und Stargazin</i>	49
3.1.3	<i>Untersuchung von heteromeren AMPA-Rezeptorkomplexen</i>	61
3.1.4	<i>Bestimmung der Agonistensensitivität von GluR1(L479Y) in Abhängigkeit von SGK</i>	66
3.1.5	<i>Analyse der Ionenselektivität von GluR1(L479Y) in Abhängigkeit von SGK</i>	66
3.2	Regulation des GluR2(R)	68
3.2.1	<i>GluR2(R) und SGK</i>	68
3.2.2	<i>Bestimmung der Agonistenselektivität von GluR2(LY) in Abhängigkeit von SGK</i>	70
3.2.3	<i>Analyse der Ionenselektivität von GluR2(LY) in Abhängigkeit von SGK</i>	72
3.3	Regulation des GluR3	74
3.3.1	<i>GluR3 und SGK</i>	74
3.3.2	<i>Bestimmung der Agonistensensitivität von GluR3 in Abhängigkeit von SGK</i>	76
3.3.3	<i>Analyse der Ionenselektivität von GluR3 in Abhängigkeit von SGK</i>	78
3.4	Regulation des GluR4	79
3.4.1	<i>GluR4 und SGK</i>	79
3.4.2	<i>Bestimmung der Agonistensensitivität von GluR4c-flop in Abhängigkeit von SGK</i>	81
3.4.3	<i>Analyse der Ionenselektivität von GluR4c-flop in Abhängigkeit von SGK</i>	83
4.	Diskussion und Interpretation	85
4.1	Fehlerdiskussion	85
4.1.1	<i>Oozyten als Expressionssystem</i>	85
4.1.2	<i>Oozyten und cRNA</i>	86

4.1.3	Lösungen	87
4.1.4	Geräte	88
4.2	Regulation des GluR1(L479Y).....	88
4.3	Regulation des GluR2(LY)	93
4.4	Regulation des GluR3	95
4.5	Regulation des GluR4c-flop.....	96
4.6	Integrierende Diskussion der Regulation aller AMPA- Rezeptoren	96
5.	Zusammenfassung	98
6.	Literatur	100
6.1	Publikationsverzeichnis.....	100
6.2	Literaturverzeichnis.....	100
7.	Anhang	121
7.1	Danksagung	121
7.2	Lebenslauf.....	123

1. Einleitung

Das Nervensystem des Menschen unterteilt sich in ein peripheres und ein zentrales Nervensystem, wobei das Zentralnervensystem sowohl das Gehirn als auch das Rückenmark umfasst.

Das menschliche Gehirn besteht aus ungefähr 100 Milliarden Neuronen, die für die Signalübertragung zuständig sind. Sie bestehen aus einem Zellkörper und vielen Dendriten, die der Signalaufnahme von anderen Zellen dienen. Außerdem besitzen sie einen bis zu 1 Meter langen Fortsatz, das Axon. Es ist zuständig für die Übertragung des Aktionspotentials innerhalb einer Nervenzelle und leitet dieses zu den Synapsen und damit an andere Nervenzellen weiter. Die Synapse stellt somit eine Schnittstelle dar, in der eine Information chemisch auf eine andere Zelle übertragen werden kann. Synapsen von Nervenzellen verschalten sich auf diese Weise untereinander zu einem neuronalen Netzwerk. Ein Neuron hat bis zu 10000 Synapsen, das menschliche Gehirn insgesamt etwa 1 Billiarde.

Für die Signalübertragung gibt es zwei Möglichkeiten. Man unterscheidet elektrische und chemische Synapsen. Die elektrischen Synapsen geben die Information über so genannte Gap junctions von Zelle zu Zelle weiter. Gap junctions sind Poren in der Zellmembran, die durch bestimmte Proteine, die Connexine, gebildet werden. Durch elektrische Synapsen erfolgt eine direkte Ausbreitung von Änderungen des Membranpotentials über einen relativ geringen ohmschen Widerstand, aber auch die Diffusion von Molekülen, wie z.B. sekundärer Botenstoffe. Die meisten Synapsen sind chemische Synapsen. Sie sind über den so genannten synaptischen Spalt voneinander getrennt, welcher ca. 20-40 nm breit ist. Durch das Ankommen eines elektrischen Signals an der präsynaptischen Membran ändert sich deren elektrisches Potential und das Neuron gibt einen chemischen Botenstoff, der in Vesikeln gespeichert ist, durch Exozytose in den synaptischen Spalt ab. Der Neurotransmitter diffundiert durch den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran und lagert sich an die

dort lokalisierten Rezeptoren an. Ionotrope Rezeptoren wandeln das chemische Signal wieder in ein elektrisches Signal um. Für diese Umwandlung gibt es zwei Rezeptorklassen, ionotrope und nicht ionotrope Rezeptoren. Bei den Ionenkanalgebundenen Rezeptoren beeinflusst der Ligand die Konformität und damit die Offenwahrscheinlichkeit des Rezeptors. Bei den nicht ionotropen Rezeptoren wird durch die Bindung des Liganden ein intrazellulärer Botenstoff freigesetzt, der eine Second-Messenger-Kaskade in Gang setzt.

1.1 Die physiologische Rolle des Glutamats

1.1.1 Funktion des Glutamats

Glutamat ist der wichtigste erregende Neurotransmitter im zentralen Nervensystem des Menschen^{207,63}. Er wird in den synaptischen Spalt abgegeben und bindet an spezifische Glutamatrezeptoren. Somit ist er an zahlreichen Abläufen im Gehirn beteiligt, z. B. bei der Gedächtnisfunktion. Glutamat ist unverzichtbar bei praktisch allen motorischen, mnestischen und kognitiven Funktionen^{121,49}.

Außerdem spielt Glutamat eine wichtige Rolle im Zellstoffwechsel, da es über den Zitratzyklus in Verbindung zum Kohlenhydratstoffwechsel steht.

1.1.2 Aufbau und Struktur des Glutamats

Als Glutamat bezeichnet man die ionisierte Form der Glutaminsäure, wie sie nach Dissoziation der Glutaminsäure oder eines ihrer Salze in Wasser vorliegt. Sie ist eine nicht essentielle proteinogene Aminosäure. Glutamat trägt eine saure Seitenkette, die bei physiologischen pH-Werten fast stets negativ geladen ist. Der pK-Wert der sauren Seitenkette beträgt 4,4

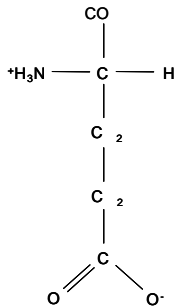


Abbildung 1: Struktur der Aminosäure Glutamat

1.1.3 Synthese, Stoffwechsel und Abbau des Glutamats

Da Glutamat eine nicht essentielle Aminosäure ist, kann es im Körper aus anderen Molekülen synthetisiert werden. Allerdings kann Glutamat auch direkt aus dem Darm aufgenommen werden.

Für die Bildung von Glutamat sind vor allem Glutamin und α -Ketoglutarat wichtig. α -Ketoglutarat ist ein Zwischenprodukt des Zitratzyklus. Mit Hilfe des Enzyms Glutamat-Dehydrogenase wird es zu Glutamat umgesetzt, um die Zelle mit Glutamat zu versorgen. Durch die Glutamin-Synthetase wird aus Glutamat Glutamin gebildet. Beide Enzyme kommen vor allem in Gliazellen des ZNS vor. Bei beiden Reaktionen erfolgt die Bindung des Zellgiftes Ammoniak, welches beim Abbau von Aminosäuren entsteht.

Glutamin hat keine exzitatorische Wirkung. Es wird von der Gliazelle in den synaptischen Spalt abgegeben und von den Neuronen aufgenommen. Dort wird das Glutamin durch die Glutaminase zu Glutamat umgewandelt und als Transmitter genutzt. Wenn der Transmitter in den synaptischen Spalt abgegeben wird, wird er von den plasmamembrangebundenen Glutamattransportern der Gliazellen wieder aus dem synaptischen Spalt entfernt. Dadurch entsteht ein Glutamat-Glutamin-Zyklus, der im menschlichen Gehirn eine Schlüsselrolle im Rückgewinn des Transmitters Glutamat darstellt⁶⁴.

Glutamat ist ebenfalls wichtig für die Biosynthese von γ -Aminobutyrat (GABA). Durch Decarboxylierung von Glutamat durch die Glutamat-Decarboxylase entsteht GABA.

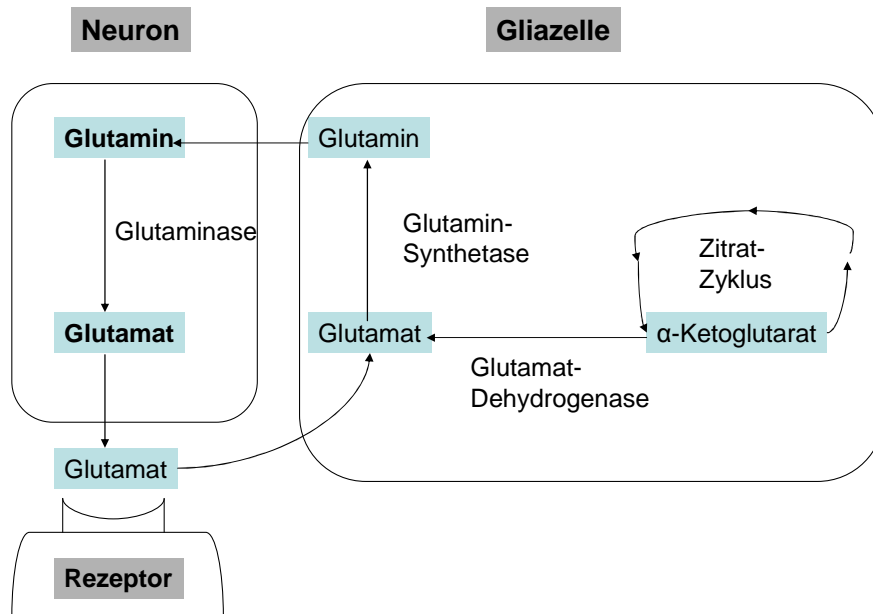


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Glutamat/Glutamin-Zyklus des Gehirns

Bei der Aminosäuresynthese ist Glutamat der Donor für die α -Aminogruppe in einer Transaminierungsreaktion. Diese überführt α -Ketosäure in die homologen α -Aminosäuren. Beispiele sind die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT). Coenzym ist Pyridoxalphosphat.

1.2 Die Rolle der Glutamatrezeptoren

Glutamatrezeptoren sind die wichtigsten Mediatoren des exzitatorischen Neurotransmittersystems im zentralen Nervensystem, allerdings kommen sie auch im Pankreas, im Knochengewebe und in Herzmuskelzellen vor^{208,89,34,68}. Die ligandengesteuerten Ionenkanäle werden durch die Aminosäure Glutamat aktiviert^{133,142}. Eine wichtige Rolle spielen die Glutamatrezeptoren bei der Pathogenese von neurodegenerativen Krankheiten, wie z.B. Ischämie, Alzheimer Krankheit, Parkinson's Krankheit, Huntington's Krankheit, Rasmussen's Encephalitis und Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)^{36,56,136,1,184,5}. Bei der Ischämie und der

Rasmussen's Encephalitis ist der Grund für die Toxizität die Übererregung eines Neurons. Der neuronale Zelltod, der durch eine Ischämie ausgelöst wird, entsteht durch einen Anstieg an Glutamat während der ischämischen Periode. Zu diesem Anstieg kommt es durch die gesteigerte Freisetzung und die reduzierte Aufnahme des Glutamats. Dadurch werden Glutamatrezeptoren exzessiv aktiviert, wodurch es zum Zelltod des Neurons kommt. Bei der Rasmussen's Encephalitis handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, wobei Antikörper gegen einen Glutamatrezeptor (GluR3) gebildet werden. Durch die Bindung des Antikörpers an den Rezeptor kommt es zu einer dauerhaften Stimulation des Rezeptors, was den exzitatorischen Zelltod einleitet.

Außerdem vermitteln Glutamatrezeptoren synaptische Transmission, synaptische Plastizität und Lernvorgänge^{40,21,183}. Die synaptische Plastizität beschreibt die Veränderung der synaptischen Stärke, die auf eine Phase der Aktivität folgt, wodurch sie einen starken Einfluss auf Lernvorgänge hat. Die so genannte Langzeitpotenzierung (LTP) gilt als mutmaßlicher Hauptmechanismus für das Speichern von Erlerntem im Gehirn. Die zu den Glutamatrezeptoren gehörenden NMDA-Rezeptoren spielen nachweislich eine wichtige Rolle bei diesem Prozess.

In der Nahrungsmittelindustrie ist Glutamat als Nahrungsmittelzusatz weit verbreitet. Es wird vor allem als Geschmacksverstärker verwendet. Überempfindlichkeiten gegenüber Glutamat oder dessen exzessive Aufnahme können zu dem so genannten China-Restaurant-Syndrom führen. Die Symptome sind Hitze- und Engegefühl, Missempfindungen im Halsbereich, sowie Kopfschmerzen, Übelkeit und Schwindel. Ebenfalls findet Glutamat als Mastmittel Einsatz. Es soll das physiologische Sättigungsgefühl unterdrücken, so dass Menschen wie Versuchstiere weiteressen, obwohl der Körper eigentlich genug hat.

1.2.1 Die Glutamatrezeptoren

In Abhängigkeit von ihrer Struktur und Funktionsweise werden ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren unterschieden⁸². Die metabotropen Rezeptoren besitzen keine intrinsische Ionenpore und sind intrazellulär mit G-Proteinen gekoppelt. Durch die Bindung des Liganden mit dem Rezeptor werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert. Die ionotropen Glutamatrezeptoren besitzen eine kationenspezifische Ionenpore, die sich durch die Bindung mit dem Agonisten öffnet, wodurch ein transmembraner Ionenstrom vermittelt wird. Allerdings sind die ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren nicht sequenzverwandt. Aufgrund von Sequenzhomologien, pharmakologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften sowie der gekoppelten sekundären Signalkaskaden, werden innerhalb dieser Hauptklasse die Glutamatrezeptoruntereinheiten in Familien eingeteilt.

Die ionotropen Glutamatrezeptoren werden in drei Unterfamilien eingeteilt, die nach dem jeweils spezifischen Agonisten benannt sind. Diese Agonisten sind: AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat)⁸⁴, Kainat (KA)^{17,59} und NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)¹⁴⁵, Kainatbindeproteine (KBP)^{72,197,77,91}, sowie die so genannten Waisenrezeptoren, die ihren Namen aufgrund ihrer bislang völlig unbekanntem Liganden erhalten haben^{219,6,124}. Den Kainatbindeproteinen und den Waisenrezeptoren konnten bisher keine direkte Ionenkanalfunktion nachgewiesen werden. Sie wurden aufgrund von Homologien den ionotropen Rezeptoren zugeordnet.

1989 wurde der AMPA-Rezeptor GluR1 als erster Glutamatrezeptor kloniert⁸⁴. In den folgenden Jahren wurde mit Hilfe der Homologiedurchmusterung von cDNA-Bibliotheken weitere Vertreter der Glutamatrezeptoruntereinheiten isoliert⁸⁴. Bis heute kennt man vier Untereinheiten von AMPA-Rezeptoren (GluR1-4), drei Kainatrezeptoruntereinheiten mit hoher Affinität (GluR5-7) und zwei Kainatrezeptoruntereinheiten mit niedriger Affinität (KA1 und KA2). Bei

den NMDA-Rezeptoren unterscheidet man zwischen den NR1-, NR2- und NR3-Untereinheiten. Glutamaterezeptoruntereinheiten einer Unterfamilie können sich zu homomeren oder heteromeren Rezeptorkomplexen zusammenlagern, wobei vier Untereinheiten einen Rezeptor bilden^{114,128,164,167}. Somit gibt es eine Vielzahl von Glutamaterezeptorkomplexen, die Unterschiede bezüglich ihrer elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften aufweisen. Alternatives Spleißen der prä-mRNA sowie posttranskriptionelles RNA-Editing erhöht zusätzlich die molekulare Vielfalt.

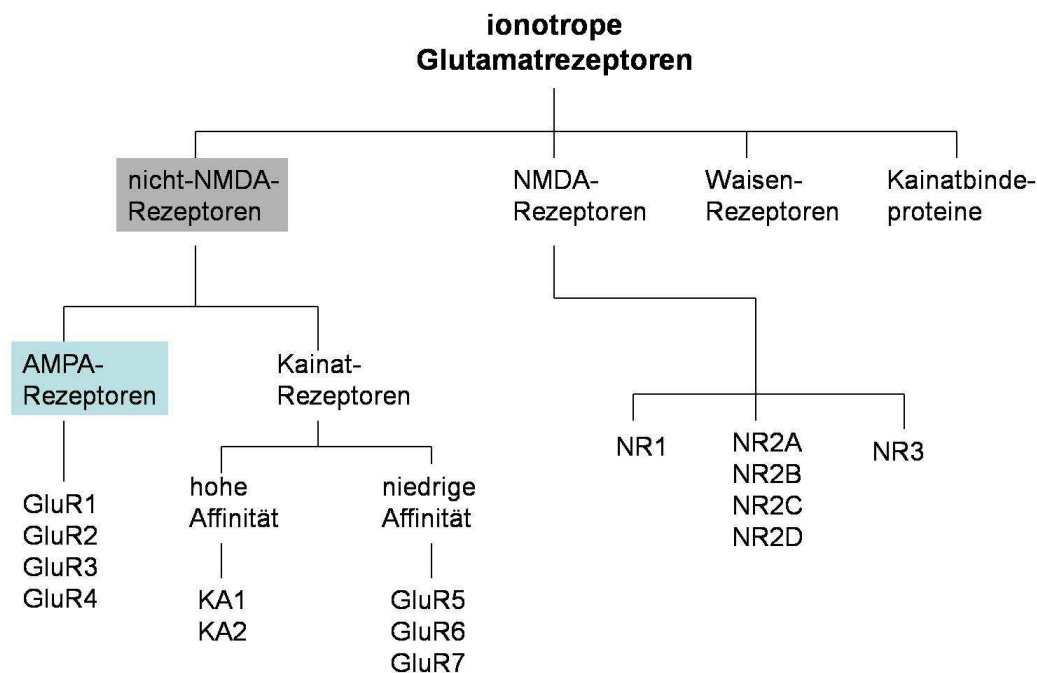


Abbildung 3: Schematischer Stammbaum der ionotropen Glutamaterezeptoren

1.2.2 Struktur von Glutamaterezeptoren

Zuerst nahm man an, dass die ionotropen Glutamaterezeptoren in die Gruppe der ligandenabhängigen Ionenkanäle gehören, wie z. B. der nikotinische Acetylcholinrezeptor, der GABA-, der 5-HT₃- und der Glyzinrezeptor. Diese Gruppe besitzt 4 Transmembrandomänen und der C-Terminus und der N-Terminus liegen extrazellulär. Durch biochemische,

elektrophysiologische und kristallographische Untersuchungen wurde allerdings festgestellt, dass die ionotropen Glutamatrezeptoren nicht zu den ligandenabhängigen Ionenkanälen zählen²¹⁴. Versuche mit Antikörpern, die gegen den C-Terminus gerichtet sind, haben gezeigt, dass der C-Terminus intrazellulär liegen muss, da der Antikörper erst nach Permeabilisierung der Zelle bindet^{159,46,131,140,141}. Mit der gleichen Methode konnte auch die extrazelluläre Lage des N-Terminus gezeigt werden. Außerdem besitzen die ionotropen Glutamatrezeptoren im Vergleich zu den ligandenabhängigen Ionenkanälen nur drei Transmembrandomänen^{83,212,216}. Die Transmembrandomänen werden mit TMD A, TMD B und TMD C bezeichnet.

Die Ligandenbindedomäne wird von zwei nicht miteinander verbundenen Domänen, die als S1 und S2 bezeichnet werden, gebildet. Die S1-Domäne befindet sich im C-terminalen Bereich des extrazellulären N-Terminus, während die S2-Domäne vom N-terminalen Bereich der großen extrazellulären Schleife zwischen TMD B und TMD C gebildet wird^{181,107,9}. Einige Versuche zeigten, dass zwischen den S1- und S2-Domänen der Glutamatrezeptoren eine signifikante Sequenz- und Strukturhomologie zu bakteriellen periplasmatischen Aminosäureproteinen besteht^{146,181}.

Die Ionenpore der ionotropen Glutamatrezeptoren wird von einer Haarnadelschleife gebildet, die die Membran nicht vollständig durchquert. Diese zu Anfang als Transmembrandomäne 2 angenommene Domäne, ragt von innen in die Zellmembran hinein und verlässt diese auf der selben Seite wieder^{83,213,212}. Solch eine Struktur ist von den membranspannungsabhängigen Kaliumkanälen her bekannt. Bei beiden wird der N-terminale Teil der Pore von einem α -helikalem Segment (Porenhelix), gefolgt von einer Schleifenstruktur, (Porenschleife) gebildet^{104,105,154,57}. Die Porenschleife enthält sowohl in ionotropen Glutamatrezeptoren als auch in Kaliumkanälen an homologen Positionen Aminosäurereste, welche für die Selektivität der Kanäle entscheidend sind^{86,192,30,215,105,75}. Kaliumkanäle und Glutamatrezeptoren unterscheiden sich aber im Hinblick auf die Orientierung der Porendomäne, da bei

Kaliumkanälen die Porenschleife von der extrazellulären Seite in die Membran eintaucht⁵⁷.

Es gibt drei Schleifen, welche die drei Transmembrandomänen mit der Porendomäne verbinden (L1, L2 und L3). L1 und L2 sind intrazellulär lokalisiert, wohingegen L3 eine große Schleife bildet und extrazellulär liegt.

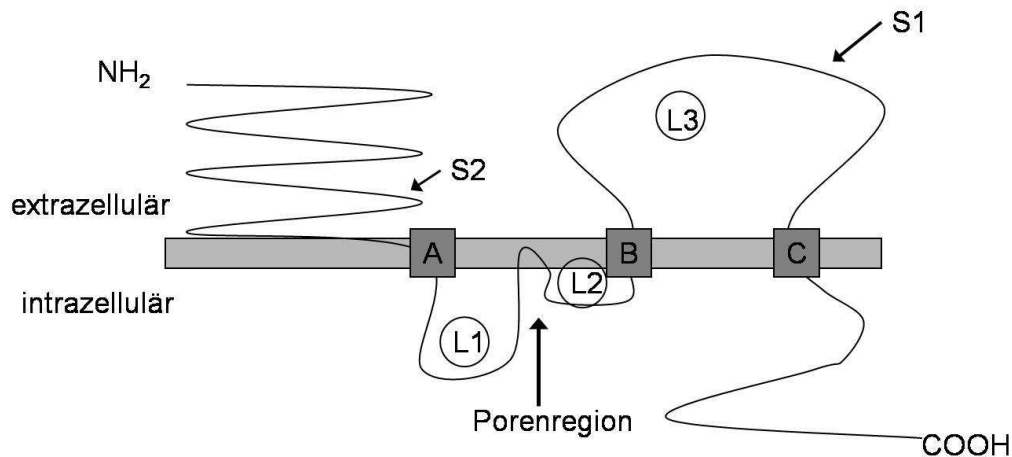


Abbildung 4: Topologie eines ionotropen Glutamatrezeptors

1.2.3 AMPA-Rezeptoren (GluR1-4)

AMPA-Rezeptoren vermitteln den Hauptteil der schnellen, exzitatorischen Neurotransmission im Zentralnervensystem von Vertebraten. AMPA-Rezeptoren findet man in den Gehirnregionen Cortex, Cerebellum und im Hirnstamm²³. Die vier Untereinheiten sind mit ungefähr 900 Aminosäuren etwa gleich groß und besitzen 68-73% Aminosäuresequenzhomologie. Die Proteine haben ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa. Die Topologie ist für alle AMPA-Rezeptoren gleich: ein extrazellulärer N-Terminus, ein intrazellulärer C-Terminus, drei Transmembrandomänen und die porenformende Domäne, die von innen in die Zellmembran hineinragt. Die Proteine bilden tetramere Rezeptoren, die sowohl als heteromere wie auch als homotetramere Rezeptoren vorliegen können. Die heteromeren Komplexe bestehen meist aus GluR1/2 bzw. GluR2/3^{211,82}. Die Zusammensetzung der Komplexe hat entscheidenden Einfluss auf die elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften der

Rezeptoren. Durch zwei zusätzliche Mechanismen kann die Variabilität der Rezeptoreigenschaften noch erhöht werden: alternatives Spleißen und RNA-Edierung.

Durch alternatives Spleißen existiert jeder AMPA-Rezeptor in zwei verschiedenen Formen: sie werden als flip- und flop-Varianten bezeichnet. Sie entstehen durch alternatives Spleißen in einer 150 bp großen Region der extrazellulären Schleife vor der TMD C¹⁷⁷. Flip- und flop-Varianten unterscheiden sich in der Wirksamkeit, mit der Glutamat in der Lage, ist den Rezeptor zu aktivieren. Flip-Varianten sind aktiver als flop-Varianten. Außerdem werden die Glutamatstromantworten von flip-Varianten durch den Desensitisierungsinhibitor Cyclothiazid bis zu 100-fach potenziert¹⁵⁶. Flip- und flop-Varianten wurden in verschiedenen Zellen des Hippocampus und in den Granulazellen des Hirnstamms gefunden, flip-Varianten in CA3 pyramidalen Zellen. Die Expression dieser Varianten wird in der Entwicklung differentiell reguliert^{177,143}.

Durch posttranskriptionelle RNA-Edierung an der Q/R-Position, die sich in der Porendomäne befindet, werden weitere AMPA-Rezeptor Varianten gebildet. Die Q/R-Editierposition ist wichtig für die Funktion des Rezeptors und für seine elektrophysiologischen Eigenschaften, wie z. B. die Strom-Spannungskurve und die Kalzium-Permeabilität^{192,81}. Durch den Austausch einer Base der Nukleotidsequenz (CAG zu CGC) kommt es zum Austausch der Aminosäure Glutamin mit Arginin¹⁷⁸. Diese Veränderung tritt bei den verschiedenen AMPA- und Kainatrezeptoren mit unterschiedlicher Häufigkeit auf. Während GluR2 zu 100% in der R-Variante, also ediert, vorliegt, liegen GluR1, GluR3 und GluR4 zu 100% in der genomisch kodierten Q-Variante vor.

1.2.4 Agonisten und Antagonisten der AMPA-Rezeptoren

AMPA-Rezeptoren bilden sowohl homomere als auch heteromere funktionelle Ionenkanäle aus. Sie lassen sich durch die Agonisten AMPA, L-Glutamat, Kainat, Domoat und Quisqualat, nicht aber durch NMDA aktivieren^{94,23,55}. Wobei Kainat die höchsten Stromantworten liefert, AMPA

aber der potenteste spezifische Agonist ist, weshalb diese Rezeptoren als AMPA-Rezeptoren bezeichnet werden. Als kompetitive Antagonisten werden u. a. 6-cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion (CNQX), 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxalin (NBQX) und 6,7-dinitroquinoxalin-2,3-dion (DNQX) eingesetzt, wobei diese nicht selektiv für bestimmte AMPA-Rezeptoren sind. Die Inhibitoren hemmen auch Ströme, die von niederaffinen Kainatrezeptoren (GluR5-6) vermittelt werden. Polyamin-Gifte, wie z. B. das Philanthotoxin aus der Grabwespe *Philanthus triangulus* oder das Toxin der Spinne *Nephila clavata* (Joro-Spinne) können AMPA-Rezeptoren spezifisch blockieren, indem sie als Offenkanalblocker der AMPA-Rezeptoren wirken^{87,206}. Allerdings hängt es vom Edierungszustand der Rezeptoren ab, wie wirksam die Polyamine auf die Rezeptoren wirken. Während R-Varianten nahezu resistent gegenüber dem Polyaminblock sind, werden die Q-Varianten fast vollständig inhibiert^{78,20,25,206}. Die Bindung intrazellulärer Polyamine entscheiden außerdem über die Form der Strom-Spannungskurve. Da intrazelluläre Polyamine, wie z. B. Spermine nicht in der Porenregion binden können, wenn im Rezeptorkomplex eine R-Variante vorhanden ist, liegen dort lineare Strom-Spannungslinien vor. Bei Q-Varianten können Spermine, bei positiven Membranpotentialen in der Porenregion binden und so den Ionenfluss sterisch behindern, so dass sich eine einwärts gleichrichtende (-rektifizierende) Strom-Spannungskurve ergibt^{24,95,90}.

1.2.5 Mechanismus der Ligandenbindung, Kanalaktivierung und Desensitisierung von AMPA-Rezeptoren

Von der Struktur der Ligandenbindedomäne hängen der Mechanismus der Ligandenbindung und die dadurch induzierte Kanalaktivierung sowie die Desensitisierung ab. Die S1-Domäne und der C-terminale Bereich der S2-Domäne bilden den oberen Teil der Bindedomäne (D1). Der untere Teil der Bindedomäne (D2) besteht aus dem N-terminalen Bereich der S2-Domäne^{7,187,126}. Im ungebundenen Zustand (apo-Zustand) sind die beiden Domänen (D1 und D2) entspannt und die Bindetasche geöffnet. Zuerst

interagieren die Agonisten mit den Aminosäureresten in der Domäne D1. Dadurch kommt es zu einer Rotationsbewegung von D2 in Richtung D1, wodurch die Bindetasche geschlossen wird. Die Porenöffnung wird dadurch erzielt, dass die Bewegung der Bindedomänen auf flexible *linker* übertragen wird, die sich während der Aktivierung wahrscheinlich voneinander entfernen. Von der Art des Liganden hängt das Ausmaß der Schließbewegung ab: Die Bindung von Vollagonisten wie z.B. Glutamat führt zu einer Domänenschließung von ca. 20°, während die Bindung eines partiellen Agonisten, wie z.B. Kainat beim AMPA-Rezeptor GluR2 nur zu einer unvollständigen Schließung von ca. 12° führt. Glutamat induziert eine stärkere Aktivierung des Ionenkanals, da die aus der Domänenschließung resultierende Bewegung für Glutamat größer ist als für Kainat^{8,93}. Durch Inhibitoren wie DNQX wird die Ligandenbindedomäne in der offenen Konformation stabilisiert^{7,187}.

Bei Rotationsbewegungen der D2-Domäne bei Agonistenbindung wird ein Widerlager dargeboten, indem die der Bindetasche abgewandten Seiten der D1-Domäne benachbarter Untereinheiten dimerisiert vorliegen. Bei geschlossener Bindetasche kann der Zug auf die flexiblen *linker* die Ionenpore offen halten, solange diese Dimerrenzfläche stabil ist. Wenn die Dimere getrennt oder destabilisiert werden, verliert die Kanalöffnung ihr Widerlager und die Ionenpore wird trotz geschlossener Bindetasche geschlossen: der Rezeptor ist desensitisiert. Es gibt Mutationen und Pharmaka, die die Dimerrenzflächen stabilisieren. Diese wirken dementsprechend hemmend auf die Desensitisierung. Mutationen, die die Grenzfläche destabilisieren, beschleunigen dementsprechend die Desensitisierung¹⁸⁷.

1.2.6 Oligomerisierung der AMPA-Rezeptoren

Wenn sich die isolierten Ligandenbindedomänen von AMPA-Rezeptoren in Lösung befinden, bilden sie oberhalb einer bestimmten Proteinkonzentration Dimere^{106,7,11,129,187}. Außerdem ist wie oben erwähnt, die Stabilität der Dimer Grenzflächen für das Aktivierungs- und Desensitivierungsverhalten von AMPA-Rezeptoren wichtig. Daraus folgt, dass die Oligomerisierung von AMPA-Rezeptoren ein zweistufiger Prozess ist. Zuerst dimerisieren zwei Untereinheiten, anschließend lagern sich zwei Dimere zu einem Tetramer zusammen. Die aminoterminal Domäne (ATD) ist für die initiale Dimerisierung notwendig^{120,11}. Der tetramere Rezeptorkomplex wird durch die Dimer Grenzfläche zwischen zwei benachbarten S2-Domänen und die Porendomäne stabilisiert. Besonders wichtig sind die porenbildende Haarnadelschleife und die Aminosäure an der Q/R-Edierposition, da R-Formen zwar dimerisieren können, die Tetramerisierung jedoch nicht oder nur sehr langsam erfolgt⁷¹. Es werden wohl bevorzugt heteromere Dimere gebildet, was sich auf die räumliche Anordnung der Untereinheiten im tetrameren Rezeptorkomplex auswirkt¹²⁹. Da im endoplasmatischen Retikulum die R-Monomere im Überschuss vorliegen, werden vorzugsweise GluR2-enthaltende, heteromere AMPA-Rezeptoren gebildet, bei denen jeweils zwei Heteromere ein Tetramer bilden^{129,71}.

1.2.7 Oberflächenexpression von AMPA-Rezeptoren

Stargazin wurde als erstes Transmembranprotein gefunden, welches mit AMPA-Rezeptoren interagiert³¹. Es beeinflusst entscheidend die Oberflächenexpression von AMPA-Rezeptoren. Die Regulation des Trafficking von AMPA-Rezeptoren durch Stargazin beinhaltet auf der einen Seite, die Interaktion von Untereinheiten der AMPA-Rezeptoren mit Stargazin und auf der anderen Seite, die Interaktion mit PSD-95^{35,169}. Stargazin besitzt vermutlich vier Transmembrandomänen, der N- und der C-Terminus sind intrazellulär lokalisiert und es weist Sequenzhomologien mit der γ 1-Untereinheit des Kalziumkanals des Skelettmuskels auf¹¹⁹. Stargazin wird auch als γ 2 bezeichnet und mit anderen sequenzähnlichen Proteinen (γ 3, γ 4 und γ 8) zur Proteinfamilie der transmembranen AMPA-Rezeptor-interagierenden Proteine (TARPs) zusammengefasst²⁹. Für den zielgerichteten Einbau von AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran von Körnerzellen des Kleinhirns und die dortige Oberflächenexpression, ist die Anwesenheit von Stargazin unbedingt notwendig³¹. Durch Interaktion zwischen AMPA-Rezeptoren und dem cytoplasmatischen C-Terminus von Stargazin wird die verstärkte Oberflächenexpression vermittelt. Stargazin besitzt im C-Terminus eine PDZ-Bindedomäne, die mit PSD-95 interagieren kann³¹. Die Interaktion von Stargazin mit den Untereinheiten der AMPA-Rezeptoren reguliert die Abgabe und/oder die Erhaltung von funktionellen Rezeptoren in der Membran, während die Bindung an PSD-95 für die Ansammlung von AMPA-Rezeptoren in der Synapse benötigt werden. Dadurch kann der AMPA-Rezeptor-Stargazin-Komplex in der postsynaptischen Membran von Neuronen akkumulieren. Interessanterweise enthält die PDZ-Bindedomäne von Stargazin eine gemeinsame Sequenz für mehrere neuronale Proteinkinasen und eine Phosphorylierung an dieser Stelle unterbricht die Interaktion mit PSD-95³⁷. Damit wird das synaptische Anhäufen von AMPA-Rezeptoren verhindert³⁵. Deletionsanalysen der C-terminalen Domäne von Stargazin haben den Bereich zwischen den

Resten 212 und 268 für die Bindung und das Trafficking von AMPA-Rezeptoren eingegrenzt¹⁸⁹.

Die extrazelluläre Schleife zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne von Stargazin wird als zweite Interaktionsdomäne angesehen. Diese zweite Interaktionsdomäne ist wichtig für elektrophysiologische Eigenschaften von AMPA-Rezeptoren, wie die Effizienz der Agonisten Glutamat und Kainat und das Aktivierungs- und Desensitisierungsverhalten des Rezeptorkomplexes^{31,188,189}.

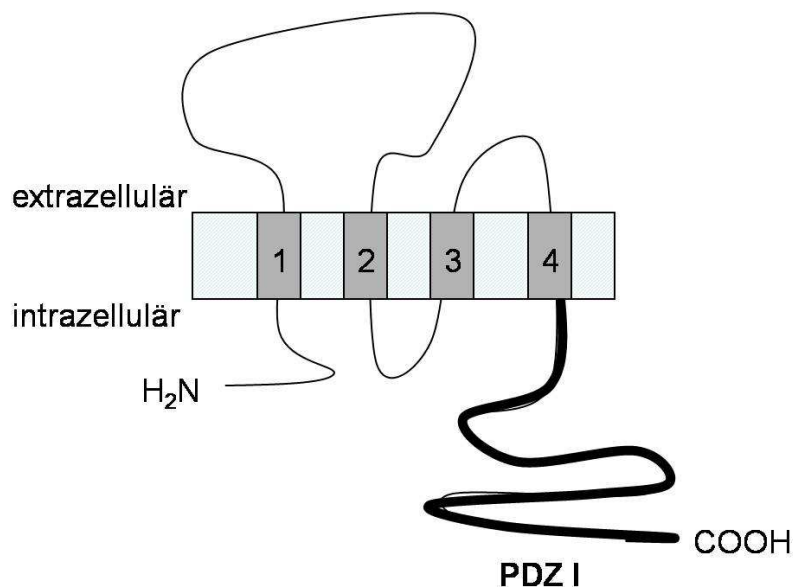


Abbildung 5: Membrantopologie des TAR-Proteins Stargazin. Die extrazelluläre Schleife zwischen der 1. und 2. Transmembrandomäne interagiert wahrscheinlich mit den AMPA-Rezeptoren und beeinflusst deren elektrophysiologische Eigenschaften.

1.3 Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinase

Die Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinase 1 (SGK1) wurde zuerst als primäres Responsgen („immediate early gene“) in Rattentumorzellen kloniert, welches transkriptionell durch Serum und Glukokortikoide stimuliert wird^{62,209,210}. Die SGK gehört zur Gruppe der Serin/Threonin Kinasen. Die humanen Isoformen (hSGK) wurden als volumenregulierende Gene entdeckt, die durch Zellschrumpfung hochreguliert werden²⁰¹. Außer Serum und Glukokortikoiden gibt es inzwischen eine große Zahl an weiteren Signalwegen und Faktoren, die an der Regulation der SGK beteiligt sind.

1.3.1 Eingruppierung der hSGK innerhalb der Proteinkinasen

Die Weiterleitung extrazellulärer Stimuli auf die Zelle geschieht über membranständige und intrazelluläre Signalmechanismen. Diese bestehen aus einem komplexen Zusammenspiel von Proteinkinasen, Phospholipasen und Phosphatasen. Die Aufgabe der Proteinkinasen ist dabei die Bindung eines Phosphatrestes aus ATP an eine Aminosäure (Serin, Threonin oder Tyrosin) des regulierenden Proteins (Targetprotein). Die damit erwirkte lokale Ladungsänderung führt zu einer Konformationsänderung, der Freigabe von Bindungsstellen oder der Änderung der Affinität für Substrate an diesem Targetprotein. Im Gegensatz dazu bewirken Phosphatasen die Abspaltung eines Phosphatrestes von dem Targetprotein und damit wiederum die Aktivierung oder Hemmung des betroffenen Proteins⁶⁶.

Die SGK gehört zur Gruppe der „AGC“-Familie von Kinasen, zu denen auch Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase B (PKB), Proteinkinase C (PKC) und Proteinkinase G (PKG) gehören. Zwischen den katalytischen Domänen der PKB und SGK gibt es auf Aminosäurenebene eine 54%-ige Übereinstimmung¹¹⁰. Bei den extrakatalytischen Domänen gibt es allerdings keine Sequenzübereinstimmungen mit anderen bekannten Proteinkinasen oder Proteinen.

1.3.2 Isoformen und Gewebeverteilung

Von der SGK konnten bisher 3 Isoformen identifiziert werden: SGK1, SGK2 und SGK3. Dabei weist SGK1 in der katalytischen Domäne eine 80%-ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz mit SGK2 und SGK3 auf¹⁰². Die nicht katalytischen Domänen sind nur zu 44-68% homolog und die N-terminalen Enden sind praktisch nicht homolog¹⁰². Für die SGK1 beträgt das Molekulargewicht 49 kD, für die SGK2 41,1 kD und für die SGK3 47,5 kD¹⁰².

Das Gen, welches für die humane SGK1 kodiert, befindet sich auf Chromosom 6q23²⁰², das Gen für die SGK2 auf Chromosom 20q12¹¹⁰ und das Gen für die SGK3 ist auf Chromosom 8q12 kodiert⁴⁸.

Unterschiede bei den Isoformen der SGK zeigen sich in deren unterschiedlicher Gewebeverteilung. SGK1 wird in allen menschlichen Geweben exprimiert, jedoch unterscheidet sich die Expression je nach Zelltyp und Gewebe^{102,201}. SGK3 wird ebenfalls in fast allen Geweben exprimiert. Hohe Konzentrationen finden sich vor allem im Embryo und in Herzen und Milz von Erwachsenen^{102,85,116}. Die Verteilung von SGK2 ist deutlich mehr eingeschränkt. Sie kommt vor allem in den Epithelien von Nieren, Leber und Pankreas vor^{102,101,200}.

1.3.3 Regulation der SGK

Die Serin/Threonin Proteinkinasen werden auf der Transkriptionsebene reguliert, während die meisten anderen bekannten Proteinkinasen auf der posttranskriptionellen Ebene reguliert werden²⁰³. Die SGK kann über drei unterschiedliche Wege beeinflusst werden, da noch zwei weitere Möglichkeiten der Regulation bestehen.

Transkription

Die Wichtigste der drei Regulationsmechanismen ist die transkriptionelle Hochregulation durch verschiedene hormonelle und nicht-hormonelle Stimuli. Wie schon erwähnt wird die Transkription von SGK1 durch Serum und Glukokortikoide hochreguliert^{26,43,58,62,92,97,139,148,172,209,210,222}. Mehrere

andere Hormone und Mediatoren können die SGK Transkription erhöhen. Dazu gehören Mineralkortikoide^{18,26,33,58,73,99,115,123,147,173}, Gonatotropine^{38,69,162,163,168}, 1,25-dyhydroxyvitamin-D₃³, TNF-β^{103,112,204}, Interleukin-6¹³⁷, Thrombin¹³, Endothelin, so wie weitere Zytokine^{45,110,194}. In Epithelzellen der Niere wird die SGK Expression sowohl durch Zellschrumpfung, als auch durch Zellschwellung stimuliert¹⁶⁵. Zusätzlich wird die Transkription noch durch sehr hohe Glukosekonzentrationen^{112,166}, Hitzeschock, ultraviolette Strahlung und oxidativen Stress stimuliert¹¹⁸. Durch Heparin kann die Transkription der SGK inhibiert werden⁵⁴. Wichtig für diese Arbeit ist auch, dass die Expression von SGK auch durch neuronale Verletzungen oder übermäßige Reizung der Neuronen erhöht wird^{88,80}.

Die Regulation der SGK Expression ist sehr schnell. Das Auftauchen und Verschwinden von SGK mRNA benötigt weniger als 20 Minuten²⁰¹. Über die genetische Regulation von SGK2 und SGK3 ist bisher noch wenig bekannt, aber sie scheinen weniger empfindlich auf hormonelle Regulation zu reagieren als SGK1¹¹⁰.

Regulation der katalytischen Aktivität

Die posttranskriptionelle Ebene ist die zweite Form der SGK-Aktivitätsregulation. Dafür sind zwei Phosphorylierungen an unterschiedlichen Stellen nötig um die SGK-Proteinkinase zu aktivieren. Das geschieht durch eine Signalkaskade die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), die 3- Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (PDK1) und PDK2 enthält^{4,19,41,65,101,144,149,155,218}. Bei der SGK1 finden die Phosphorylierungen an den Aminosäuren Thr²⁵⁶ und Ser⁴²² statt. Die maximale Stimulation der SGK Aktivität erfordert die PDK1-abhängige Phosphorylierung des Thr²⁵⁶ und die des Ser⁴²² durch PDK2^{102,101,155}. Die durch die PDK1 vermittelte SGK1 Phosphorylierung wird erleichtert, wenn Ser⁴²² bereits phosphoryliert ist. PDK1 und PDK2 ihrerseits werden durch die PI3-Kinase aktiviert⁶². Die PI3-Kaskade wird durch Insulin, IGF-1, oxidativen Stress, FSH und Glukokortikoide stimuliert⁶².

Der Austausch der Aminosäure Serin gegen Aspartat an der Position 422 der SGK1 ergibt die konstitutiv aktive SGK1^{S422D}¹⁰², während das Ersetzen von Lysin durch Asparagin an der Position 127 in der ATP-Bindungsregion zur inaktiven SGK1^{K127N} führt¹⁰².

Ähnlich wie SGK1 werden SGK2 und SGK3 durch Oxidation, Insulin und IGF-1 durch die PI3-Kinase-Kaskade sowie durch PDK1 und PDK2 aktiviert^{101,196}.

Regulation über die Kontrolle der subzellulären Lokalisation

Die dritte Form der Expressionskontrolle von SGK ist die subzelluläre Lokalisation, die vom Funktionszustand der Zelle abhängt. Eine Aktivierung durch einen hyperosmotischen Schock oder Glukokortikoide bewirkt einen Stopp des Zellzyklus in der G1-Phase und erhöht die Konzentration der Kinase im Zytoplasma⁶². Das bedeutet, dass stressinduzierte Zellen vor allem enzymatisch aktiviertes SGK im Zytoplasma besitzen. Durch Kontakt der Zelle in der Proliferationsphase mit Serum befindet sich aktiviertes SGK vor allem im Nukleus, was über den Importin- α -Rezeptor vermittelt wird^{127,14}.

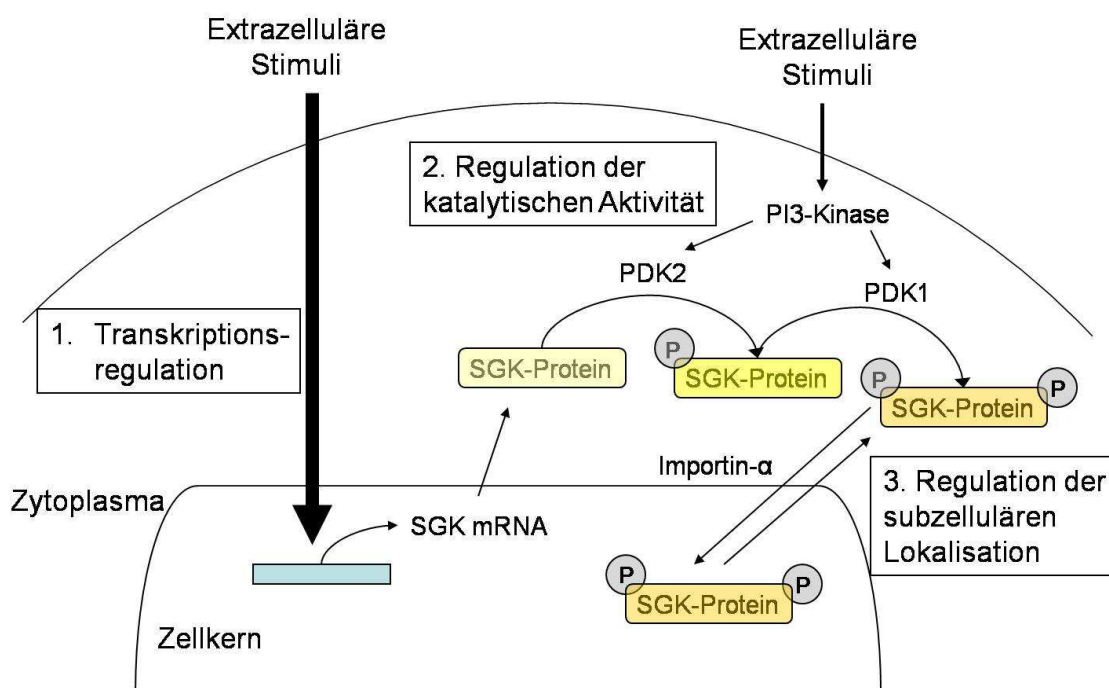


Abbildung 6: Regulation der hSGK

1.3.4 Interaktion der SGK mit anderen Proteinen

Für die mögliche Interaktion eines Targetproteins mit der SGK ist eine SGK-Phosphorylierungs-Sequenz nötig. Allerdings werden auch Proteine ohne diese Sequenz durch SGK reguliert¹⁵². Als Modell kommt in Betracht, dass SGK nicht das Targetprotein direkt reguliert, sondern ein drittes Protein, welches dann wiederum das Targetprotein beeinflusst¹⁵⁸.

Dieses Modell konnte bereits für den epithelialen Natriumkanal ENaC mit Nedd4-2¹⁵² und den kardialen und epithelialen Kaliumkanal KCNE1/KCNQ1 mit PIKfyve und PI(3,5)P₂¹⁷⁰ gezeigt werden.

SGK 1 kann ENaC indirekt über eine Phosphorylierung der Ubiquitinligase Nedd4-2 (neural precursor cell expressed, developmentally downregulated gen) regulieren^{10,53}, welche dann wiederum ENaC ubiquitiert. Die Ubiquitinierung markiert das Kanalprotein zur Internalisierung und Degradierung durch Proteasomen¹⁸⁰. Die Phosphorylierung von Nedd4-2 durch die SGK verringert die Ubiquitinierungsfähigkeit von Nedd4-2 an ENaC, somit erhöht SGK1 indirekt die Rezeptordichte von ENaC in der Zellmembran^{96,199}.

Durch mehrere Expressionsstudien in *Xenopus* Oozyten konnte gezeigt werden, dass SGK1, SGK2 und/oder SGK3 KCNE1/KCNQ1 abhängige Ströme durch Erhöhung der Rezeptordichte stimulieren^{60,170}. Allerdings wird KCNE1/KCNQ1 nicht direkt durch die SGK reguliert. SGK1 aktiviert die PI(5)-Kinase PIKfyve und damit die PI(3,5)P₂ Produktion¹⁷⁰. PI(3,5)P₂ reguliert die durch RAB11 gesteuerte Exozytose von Vesikeln, was zu einer erhöhten Dichte von KCNE1/KCNQ1 in der Zellmembran führt¹⁷⁰. RAB11 gehört zur Familie der RAB Proteine, GTPasen die an der Vesikelregulation beteiligt sind^{79,130,132,138,191,28}. RAB5 ist an der Regulation der Endozytose und RAB11 an der Exozytose beteiligt, was für CFTR Chloridkanäle⁶⁷ und den Glukosetransporter GluT4^{138,16} gezeigt werden konnte.

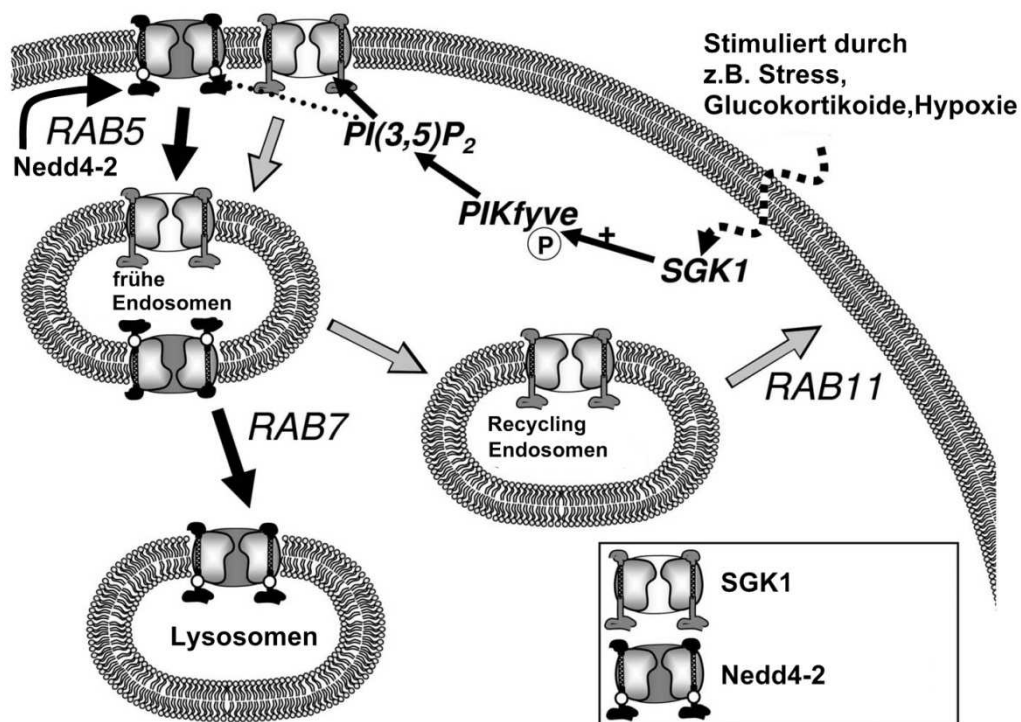


Abbildung 7: Regulation der Rezeptordichte durch Nedd4-2 und SGK1

1.3.5 Die physiologische Funktion der SGK

Die SGK wie auch die anderen Serin/Threonin-Kinasen (z. B. PKB) phosphorylieren die Aminosäuren Serin und Threonin, wenn sie in einer RxRxxS/T Sequenz vorliegen^{102,101}. Diese wird als SGK-Phosphorylierungs-Stelle genannt. Durch die direkte Phosphorylierung der Effektormoleküle oder durch deren Regulation, verändert die SGK eine Vielzahl von zellulären Funktionen in praktisch jedem Organ. Allerdings werden auch Proteine durch die SGK reguliert, die diese SGK-Phosphorylierungs-Stelle nicht enthalten¹⁵².

Kanäle und Transporter, die durch SGK reguliert werden, sind u. a. ENaC^{33,205}, SCN5A⁶⁰, ROMK1¹⁵³, Kv1.3⁷⁶, KCNE1/KCNQ1⁶⁰ sowie CFTR¹¹¹. Durch die Hochregulation von SGK in entzündlichem Lungengewebe könnte es einen Zusammenhang zwischen SGK und der bronchialen Cl⁻-Sekretion/-Absorption über CFTR geben¹⁹⁹.

Außerdem ist die SGK an der Volumenregulation der Zelle über eine Änderung der Cl⁻- und K⁺-Leitfähigkeit beteiligt^{151,201,14,22,102}. Auch bei der Zellproliferation und der Apoptose konnte schon eine Beteiligung der SGK gezeigt werden^{27,118,193}. Dabei vermittelt sie dort die antiapoptotische Wirkung von Glukokortikoiden^{27,118,139}.

Untersuchungen an SGK1 und SGK3 knock-out Mäusen geben einen Einblick in die funktionelle Bedeutung SGK1-²¹⁷ und SGK3-abhängiger¹³⁴ Regulationen bei physiologischen Abläufen. Interessanterweise führt weder das Fehlen von SGK1²¹⁷ oder SGK3¹³⁴ noch das Fehlen beider Kinasen⁷⁰ zu einem ernsten Phänotyp. Daraus lässt sich schließen, dass weder SGK1 noch SGK3 überlebenswichtig sind. Nähere Betrachtungen der Physiologie dieser Mäuse offenbaren jedoch mehrere physiologische Defizite, die auf die breite funktionelle Rolle der Kinasen hinweisen. Die Untersuchungen an SGK3 knock-out Mäusen haben gezeigt, dass das Fehlen von SGK3 zu einer signifikanten Reduktion von Bewegungsaktivität und einem leichten Abfall an räumlicher Präzision geführt haben. Die reduzierte Bewegung und die Beeinträchtigung der räumlichen Orientierung der Mäuse könnte möglicherweise mit einer veränderten glutaminergen Signalübertragung zusammenhängen¹¹³.

1.4 Fragestellung der Arbeit

Glutamatrezeptoren sind die wichtigsten Mediatoren des exzitatorischen Neurotransmittersystems im zentralen Nervensystem. Sie vermitteln synaptische Transmission, synaptische Plastizität und Lernvorgänge, wobei die Plastizität des Nervensystems von Mechanismen abhängt, die die Stärke der synaptischen Übertragung regulieren¹¹³. Außerdem können sich exzitatorische Synapsen einer Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD) unterziehen, zelluläre Modelle des Lernens und des Gedächtnisses^{113,12}. Durch Versuche an GluR1 knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass GluR1 essentiell für die LTP im Hippocampus ist^{221,125}.

Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von AMPA-Rezeptoren für Veränderungen der synaptischen Plastizität nötig ist^{176,2}. Der Signalweg, der dem Trafficking von AMPA-Rezeptoren zugrunde liegt, beinhaltet die PI3-Kinase¹⁵⁷. Diesem PI3-Kinase Signalweg gehört auch die SGK an⁶². Die wichtigen Kinasen, die die Plastizität vermitteln, wurden bisher noch nicht identifiziert¹².

Versuche an SGK knock-out Mäusen zeigen physiologische Defizite und Verhaltensänderungen, wie Abnahme der Bewegungsaktivität und reduzierte räumliche Orientierung^{113,217,134,70}, die eventuell im Zusammenhang mit veränderter glutaminerger Signalübertragung stehen könnten.

Da alle drei Kinasen im Gehirn exprimiert werden^{201,102} soll nun in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe überwiegend elektrophysiologischer Messungen der Beitrag der Serum- und Glukokortikoid-induzierbaren Kinase SGK und ihrer Isoformen an der Regulation der Glutamatrezeptoren GluR1, GluR2, GluR3 und GluR4 näher untersucht werden.

Genauer formuliert stehen folgende Fragen zur Beantwortung:

1. Nimmt die SGK an der Regulation der AMPA-Rezeptoren teil?

2. **Erfolgt die Regulation der AMPA-Rezeptoren durch SGK über eine Veränderung der Kanaleigenschaften oder über Veränderungen im Trafficking, d.h. der Lokalisation und Verankerung des Rezeptors in der Zellmembran?**

2. Material und Methoden

2.1 *Verwendete Lösungen und Substanzen*

OR-2

Die OR-2 Lösung wurde als Grundlösung bei der Oozytenpräparation und Kollagenasebehandlung der Oozyten nach der Frosch-OP verwendet. Sie ist Ca^{2+} -frei und verbessert damit die Kollagenasewirkung, beziehungsweise inhibiert diese nicht.

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	82,5
KCl	2
MgCl ₂	1
HEPES	5

Tabelle 1: Zusammensetzung der OR-2, pH 7,5

Kollagenase

Je nach Aktivität wurden 1-3 g Kollagenase Worthington Typ II pro Liter OR-2 verwendet. Die entnommenen Ovarien wurden dann in der Kollagenase 2-2,5 Stunden behandelt, um das Bindegewebe um die Oozyten herum zu entfernen.

ND96

ND96 diente als Ausgangslösung für die Aufbewahrung der Oozyten und als Messlösung bei den Versuchen.

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	96
KCl	2
CaCl ₂	1,8
MgCl ₂	1

Tris-Hepes	5
-------------------	----------

Tabelle 2: Zusammensetzung der ND96, pH 7,5

ND96 mit Antibiotika

Diese Lösung dient als Aufbewahrungslösung für die Oozyten nach der Kollagenasebehandlung. Sie enthält zusätzlich zur normalen ND96 Gentamycin (Abwehr von Infektionen), Theophyllin (Verhinderung der weiteren Reifung) sowie Natriumpyruvat (Ernährung der Oozyten).

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

Tabelle 3: Zusammensetzung der Aufbewahrungslösung, pH 7,5, Osmolarität 200 mOsm

Messlösungen

ND96 basierte für die Messlösungen als Ausgangslösung. Es wurden 300 µM Lösung L-Glutamatsäure der Firma TOCRIS (Missouri, USA) hinzugefügt, so dass eine Konzentration von 300 µM erreicht wurde. Außerdem wurden der ND96 Ausgangslösung 400 µl pro 100 ml einer 25 µM Lösung Cyclothiazid der Firma TOCRIS zugefügt, so dass eine Konzentration von 10 µM erreicht wurde.

Mg²⁺-Ringer

Zur Messung der Strom-/Spannungskurven wurde eine Calcium-freie ND96 als Grundlösung verwendet, um die Ca²⁺-aktivierten Cl⁻-Kanäle nicht zu öffnen.

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	96

KCl	2
MgCl₂	2,8
HEPES	5

Tabelle 4: Zusammensetzung der Mg²⁺-Ringer

2.2 Oozyten des *Xenopus laevis* als Expressionssystem

Gurdon et al. zeigte, dass die Oozyten des südafrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* die injizierte heterologe mRNA effizient translatieren⁷⁴. Seither werden die Oozyten vielfach als Expressionssystem eukaryontischer cRNA verwendet^{74,51,52}.

Dieses System weist viele Vorteile auf, wie z.B. die einfache und günstige Haltung und Züchtung der Tiere, sowie der Durchmesser der Oozyten von 1,1 – 1,3 mm und die damit verbundene einfache Handhabung der Oozyten^{174,198}. Die Frösche sind einfach zu operieren und die Oozyten durch ihre Größe erlauben eine relativ einfache Injektion mit dünnen Glaskapillaren. Außerdem können die Oozyten in einem geeigneten Nährmedium 8 bis 10 Tage überleben.

Wichtig ist auch, dass die Oozyten in der Lage sind, posttranslationale Veränderungen vorzunehmen, so dass die Synthese von Vorstufen von Proteinen, sowie Phosphorylierung und Glykosylierung von fremden Proteinen in Oozyten beobachtet und analysiert werden kann^{42,175}.

Allerdings weist dieses System auch gewisse Nachteile auf. So gibt es 6 verschiedene Stadien der Oozyten abhängig von ihrer Größe¹⁷⁴, und man sollte darauf achten, nur Oozyten der Stadien V oder VI zu verwenden, da sich die Stadien in ihrer Stoffwechsellage unterscheiden¹⁷⁴. Außerdem exprimieren die Oozyten auch endogene Transporter und Ionenkanäle, die die Ergebnisse der Messungen verändern können. Auch können endogen exprimierte Proteine mit exogenen Proteinen interferieren. Allerdings ist der Anteil der meisten endogen exprimierten Proteine sehr gering. Weiter gilt es zu beachten, dass sich die Signalwege von Säugerzellen zu denen der Oozyten unterscheiden können oder gar nicht vorhanden sind und somit eine mögliche Regulation auch nicht stattfinden kann.

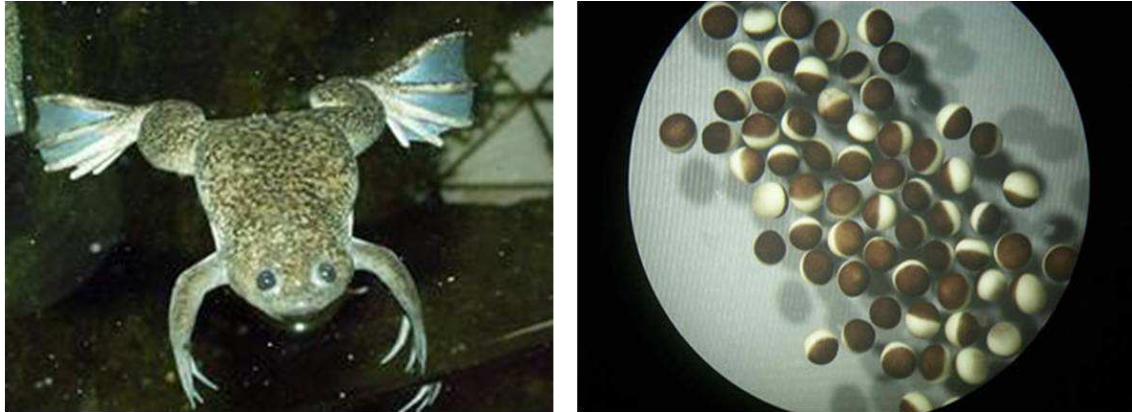


Abbildung 8: *Xenopus laevis* und Oozyten des Froschs

	Konzentration intrazellulär [mM]
Na ⁺	4-23
K ⁺	76-148
Cl ⁻	24-62
Ca ²⁺	3-100 x 10 ⁻⁶

Tabelle 5: Intrazelluläre Ionenkonzentration in *Xenopus* Oozyten

2.2.1 Frosch-OP und Präparation der Oozyten

Zur Betäubung wurden die weiblichen *Xenopus laevis* Frösche für ca. 20 min in eine 0,1%ige 3-Aminobenzoessäureethylester-Lösung (Sigma, Taufkirchen) gelegt. Wenn der Frosch vollständig betäubt war, wurde er auf dem Rücken in eine mit Eis gefüllte Wanne gelegt und die Bauchhaut desinfiziert. Allerdings musste man darauf achten, dass die Augen nicht im Eis lagen, um sie durch die Kälte nicht zu verletzen. Um die Oozyten entnehmen zu können, wurde zuerst die Bauchdecke mit einer Pinzette angehoben und dann in der Leistengegend ein ca. 7 mm langer Schnitt mit einer Schere durchgeführt. Anschließend wurde ebenfalls vorsichtig die darunter liegende Muskelschicht durchtrennt, ohne andere Organe zu verletzen. Somit konnte man die Ovarien erreichen und mit Pinzette und Schere einen Teil des Ovars entnehmen. Zur Weiterbehandlung wurden die entnommenen Ovarien in eine Petrischale mit OR2-Lösung gelegt.

Danach wurde die Wunde mit resorbierbarem Faden (Ethicon Vicryl, Polyglactin 910, ungefärbt, geflochten, resorbierbar; (Firma Johnson&Johnson, Belgien)) verschlossen. Zuerst wurde die Muskelschicht mit 3-4 Knoten und anschließend die Bauchhaut mit ebenfalls 3-4 Knoten genäht. Bis die Betäubung des Frosches nachließ, wurde er in einen Styroporbehälter mit Leitungswasser gelegt. Der Behälter enthielt nur so wenig Wasser, dass die Nasenlöcher des Froschs oberhalb der Wasseroberfläche lagen. Wenn man dem Frosch nur einen Teil des Ovars entnommen hatte, dann konnte man ihn, sobald er wieder adäquat auf äußere Reize reagierte, zurück in sein Aquarium setzen bis die Wunde verheilt war und man ihn erneut operieren konnte.

Die Ovarialsäckchen in der Petrischale wurden mit einer Schere in kleinere Fragmente geteilt, damit die Kollagenase besser wirken konnte. Die Fragmente wurden 2-2,5 h in der Kollagenase bei Zimmertemperatur geschwenkt um sie vom Bindegewebe und den einhüllenden Follikel epithelzellen zu befreien. Um den Verdau durch die Kollagenase zu beenden, wurde die Kollagenaselösung dekantiert und die Oozyten mehrmals mit ND96 gewaschen.

Anschließend wurden unter dem Mikroskop die Oozyten im Entwicklungsstadium V und VI selektioniert, die intakt aussahen, d.h. eine klare Trennung zwischen der animalischen (pigmentierten) und der vegetativen (gelben) Seite aufwiesen und deren Pigmentierung gleichmäßig war, also keine helleren oder dunkleren Flecken zeigten.

Die selektionierten Zellen wurden bis zum nächsten Tag in einer Petrischale mit ND96 und Antibiotika bei 17-18° Grad aufbewahrt.

2.2.2 cRNA-Synthese und -Injektion

Die Transformation der cDNA in *E.coli* (Stamm DH5 α) führte zur Vermehrung der cDNA³⁹. Eine Kolonie auf der Agarplatte wurde am zweiten Tag in eine Flüssigkultur überführt. Am darauf folgenden Tag wurde der Erfolg der Transformation durch Minipräparation dieser Flüssigkultur kontrolliert und dann mittels Midipräparation die Plasmid-DNA gewonnen (Qiagen kit, Quiagen GmbH, Hilden, Germany). Die Plasmid-DNA konnte dann durch die in der Tabelle 6 aufgeführten Restriktionsenzyme am 3'-Ende des Inserts geschnitten und damit linearisiert werden. Die cRNA wurde mittels reverser Transkription durch die entsprechende Polymerase aus der linearisierten Plasmid-DNA hergestellt. Dabei kam das mMessage mMachine Kit von Ambion (Ambion Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) zur Anwendung. Die Stocklösung der cRNA wurde bei -80°C aufbewahrt und bei Bedarf aufgetaut und auf die notwendige Endkonzentration verdünnt.

Rezeptor	Herkunft des cDNA-Klons	Oozytenvektor	Restriktionsenzym zur Linearisierung	Polymerase
GluR1(LY)	Labor Hollmann, Bochum	pSGEM	Nhe I	T7
GluR2(R)	Labor Hollmann, Bochum	pSGEM	Nhe I	T7
GluR2(R)(LY)	Labor Hollmann, Bochum	pSGEM	Nhe I	T7
GluR2(Q)	Labor Hollmann, Bochum	pSGEM	Nhe I	T7

GluR3	Labor Hollmann, Bochum	pSGEM	Nhe I	T7
GluR4	Labor Hollmann, Bochum	pSGEM	Nhe I	T7

Tabelle 6: Verwendete Vektoren, Restriktionsenzyme und Polymerasen bei der Herstellung der cRNA

Zum Injizieren der Oozyten wurden Borosilikatglaskapillaren (World Precision Instruments, Berlin) verwendet. Die Kapillaren wurden mit Hilfe eines Mikroelektrodenpullers (DMZ Universal-Puller der Firma Zeitz, München) zu feinen Spitzen ausgezogen und anschließend mit Hilfe einer Pinzette auf einen Öffnungsdurchmesser von 10-20 µm zurückgebrochen. Anschließend wurde die Kapillare mit Parafinöl gefüllt, um sie luftfrei zu machen. Dann konnte die cRNA Lösung mit dem Microinjektor 2000 (World Precision Instruments, Berlin) aufgezogen werden. Dabei mußte darauf geachtet werden, dass die cRNA nicht mit RNase kontaminiert wurde, weshalb bei der Injektion Handschuhe getragen und DEPC Wasser zum Verdünnen der cRNA verwendet wurde. Die Oozyten vom Vortag wurden in eine Petrischale mit ND96 mit Antibiotika gebracht auf dessen Boden sich ein Polypropylen-Netz befindet, damit die Oozyten beim Injizieren nicht verrutschen. Die mit der cRNA gefüllte Kapillare wurde nun vorsichtig in die Oozyten eingestochen und dann die cRNA mit definierten Mengen injiziert. Es wurde je nach Rezeptor entweder insgesamt 40 oder 60 nl injiziert. Die benutzten Konzentrationen der cRNA sind in Tabelle 7 aufgeführt. Anschließend wurden die injizierten Oozyten in ND96 mit Antibiotika bei 15-17° aufbewahrt und das Medium alle 1-2 Tage gewechselt, sowie schlechte oder kaputtgegangene Oozyten aussortiert. Nach 5-7 Tagen war genug RNA translatiert, um mit den elektrophysiologischen Messungen beginnen zu können.

cRNA	Konzentration der injizierten RNA	Mengen der injizierten cRNA pro Zelle
GluR1(L479Y)	200 ng/ μ l	8,0 ng
GluR2(R)	300 ng/ μ l	7,5 ng
GluR2(R)(L483Y)	200 ng/ μ l	8,0 ng
GluR3	300 ng/ μ l	6,0 ng
GluR4c-flop	200 ng/ μ l	4,0 ng
GluR1(L479Y)+GluR2(Q)	je 200 ng/ μ l	je 4,0 ng
GluR1(L479Y)+GluR2(R)(L483Y)	je 200 ng/ μ l	je 4,0 ng
Kinasen	300 ng/ μ l	6,0 oder 12,0 ng

Tabelle 7: Konzentrationen und Mengen der injizierten cRNA

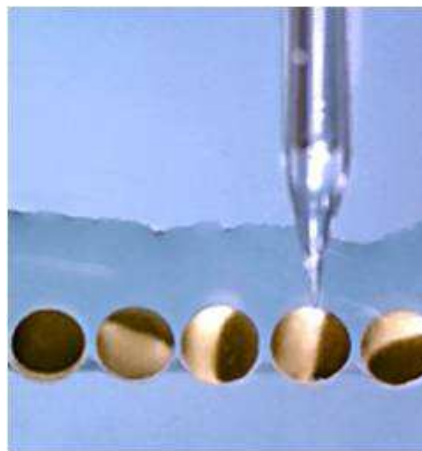


Abbildung 9 : Injektion von RNA in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis*

2.3 *Elektrophysiologische Methoden*

2.3.1 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (two electrode voltage clamp [TEVC])

Die TEVC-Methode bietet sich an, um Membraneigenschaften elektrisch oder chemisch erregbarer Rezeptoren zu studieren, ohne die intrazellulären Bedingungen zu verändern. Dadurch ist eine exakte Beschreibung der Ionenselektivität oder deren vorübergehende Änderung durch elektrische oder chemische Stimuli möglich.

Bei dieser Methode werden zwei Elektroden eingesetzt. Die Spannungselektrode misst das aktuelle Membranpotential gegen eine Referenzelektrode im Bad. Die zweite Elektrode ist die Stromelektrode, sie injiziert genau so viel Strom in die Oozyte wie für die Aufrechterhaltung des gewünschten Membranpotentials nötig ist (Haltestrom).

Wenn die in den Oozyten exprimierten Ionenkanäle aktiviert werden, dann fließt ein Ionenstrom durch die Zellmembran. Um das vorgegebene Potential konstant zu halten, muss die Stromelektrode den von ihr zu injizierenden Strom anpassen. Die Größe der zusätzlich benötigten Strommenge um die durch die Kanalöffnung hervorgerufene Veränderung zu kompensieren, entspricht der Größe des tatsächlich über die Membran geflossenen Ionenstroms. Somit ist dieser Kompensationsstrom eine indirekt Messgröße für den Ionenstrom. Dabei bedeutet die Erhöhung eines negativen Kompensationsstroms (= Strom negativer Ladung in die Oozyte) eine größere positive Ladungsdichte im Oozyteninneren, also einen Kationen-Einstrom oder Anionen-Ausstrom.

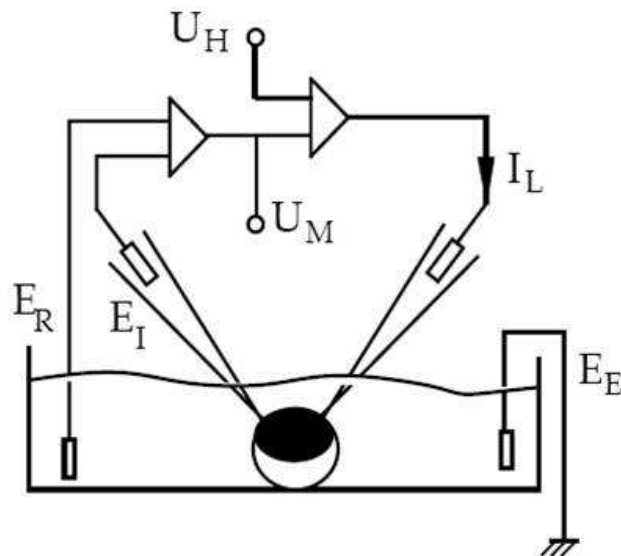


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Messanordnung bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme. Die Potentialdifferenz (= Membranpotential) U_M zwischen der intrazellulären Spannungselektrode E_I und der Bad-Referenzelektrode E_R wird mit dem gewünschten Potential (= Haltepotential) U_H verglichen. Ein Unterschied wird durch den Kompensationsstrom (= Leckstrom) I_L ausgeglichen. E_E : Erdungselektrode.

2.3.2 Aufbau des Messplatzes für die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Im Objektisch des Mikroskops war eine eigens angefertigte Messkammer eingebaut, die einen kontinuierlichen und schnellen Austausch der jeweiligen Lösungen erlaubte. Die Messkammer besaß einen Zulauf über den die verschiedenen Agonisten- und Spüllösungen durch ein Ventilsystem mit 8 Zuläufen variiert werden konnten und einen mit einer Vakuumpumpe verbundenen Sauger, der den Flüssigkeitsspiegel in der Messkammer konstant hielt, sowie den Abfluss der Lösungen in einen Abfallbehälter regulierte. In der Messkammer war eine Vertiefung angebracht in der die Oozyte positioniert wurde. Rechts und links der Messkammer waren Mikromanipulatoren auf dem Tisch befestigt, in die Messelektroden in Elektrodenhaltern eingespannt wurden. Als Messelektroden wurden Borosilikatglaskapillaren (Typ GC150TF-7,5; 1,5 mm Außendurchmesser; 1,17 mm Innendurchmesser; mit Filament, Fa.

HARVARD Apparatus, Kent GB) verwendet, die mit einem Mikroelektrodenpuller (DMZ Universal-Puller der Firma Zeitz, München) gezogen wurden. Beide Elektroden wurden mit 3 M KCl-Lösung gefüllt und durch einen Silberchloriddraht mit dem Verstärker verbunden. Der Widerstand der Elektroden wurde regelmäßig überprüft und betrug 0,5-1,5 MOhm. Im Bad befanden sich Ag/AgCl⁻ Referenzelektroden. Vor dem Einstechen der Elektroden in die Oozyte wurde ein Nullabgleich mit der Badlösung durchgeführt.

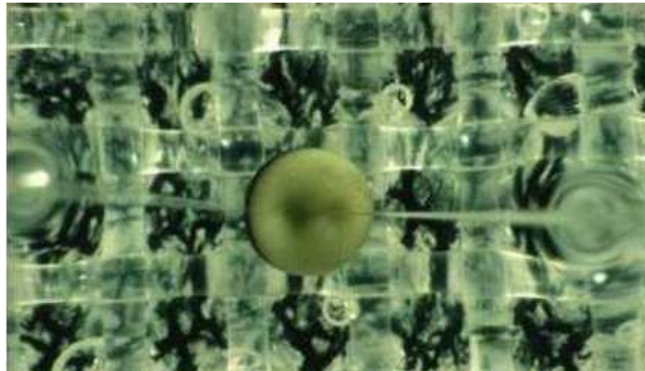


Abbildung 11: Für voltage clamp werden zwei Elektroden benötigt: die Spannungs- und die Stromelektrode

2.3.4 Durchführung der Experimente

Alle Messungen wurden 5-7 Tage nach cRNA-Injektion bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Standardmessungen von Glutamatrezeptoren erfolgten bei einem Haltepotential von -70 mV (physiologischer Bereich für Nervenzellen) mit Glutamatkonzentrationen im Sättigungsbereich. Es wurden Lösungen mit einer Konzentration von 300 µM Glutamat und wenn nötig zusätzlich 100 µM Cyclothiazid verwendet.

Dosis-Wirkungskurven wurden mit 6 verschiedenen Glutamatkonzentrationen durchgeführt.

Die Messungen wurden mehrfach wiederholt, um Oozyten verschiedener Frösche zu messen. Dabei kam es zu keinen qualitativ unterschiedlichen Ergebnissen. Teilweise variierte die Größe der Ströme von Batch zu Batch, wobei sich eine jahreszeitliche Abhängigkeit durchaus vermuten

ließ. Natürlich kann auch die unterschiedliche Raumtemperatur dazu beigetragen haben, da das Laboratorium keine Klimaanlage hatte und es somit Schwankungen der Innentemperatur gab.

Alle Daten wurden mit 10 Hz gefiltert und mit einer Abtastrate von 100 Datenpunkten pro Sekunde über die Software pCLAMP9 (Axon Instruments) auf einen PC aufgezeichnet.

2.4 Auswertung und Statistik

Die Originalkurven wurden mittels der Software Clampfit analysiert und der Glutamat-induzierte Einwärtsstrom I_{Glu} bestimmt. Dabei wurde I_{Glu} als die Differenz des Haltestroms bei ND96 und des Haltestroms bei ND96 + 300 μM Glutamat (+ 100 μM Cyclothiazid) als Badlösung definiert.

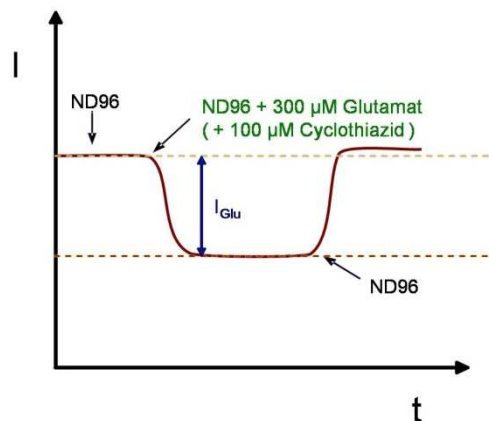


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Originalkurve. I_{Glu} berechnet sich aus der Differenz der Halteströme ohne und mit Glutamat. Die Pfeile markieren die Zugabe von ND96 bzw. ND96+Glutamat. I bezeichnet die Stromstärke, t die Zeit

Von den Messdaten sind, wenn nicht anders beschrieben, arithmetischer Mittelwert und Standardfehler vom Mittel (SEM) bestimmt worden. „n“ gibt dabei die Anzahl voneinander unabhängiger Messungen an. Alle Messungen wurden mindestens 3 Mal verifiziert mit Oozyten aus

unterschiedlichen Batches. Die Ergebnisse aus den Einzelexperimenten wurden normalisiert und gepoolt.

Die ermittelten Werte wurden mit Hilfe des ANOVA-Tests bei mehr als zwei zu vergleichenden Gruppen auf Signifikanz überprüft und nur Gruppen mit einem p-Wert < 0,05 als signifikant angesehen. Wurden zwei Gruppen auf Signifikanz geprüft so wurde der STUDENT-T Test verwendet. Auch hier wurden nur Gruppen, die einen p-Wert < 0,05 aufwiesen, als signifikant angesehen.

Signifikante Gruppen wurden mit einem Sonderzeichen (*) gekennzeichnet.

Alle kinetischen Messdaten, die eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve ergeben, wurden mit der „Hill-Gleichung“ gefittet, die sich von der Michaelis-Menten-Gleichung ableiten lässt.

(1) Hill-Gleichung, angepasst an die Elektrophysiologie

$$I = I_{max} \frac{C^n}{C + EC_{50}^n}$$

- wobei:
- I = gemessener Strom
 - I_{max} = maximaler Strom
 - C = Agonistenkonzentration
 - EC_{50} = Substratkonzentration bei halbmaximaler Aktivierung
 - n = Hillkoeffizient, Steigung im Wendepunkt

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Proteinisolierung aus *Xenopus*-Oozyten und spezifische Markierung von Proteinen in der Plasmamembran

Dies ist eine Methode, die es erlaubt, nur diejenigen Proteine zu isolieren, die in der Plasmamembran der Oozyten vorhanden sind. Proteine, die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums, des Golgi-Apparates oder in andern Membranen im Zytosol exprimiert werden, sind von dieser Methode ausgeschlossen.

6-8 Tage nach RNA-Injektion wurden 20 Oozyten mit 1 ml 10 μ M biotinyliertem Concanavalin A (ConA) (Sigma C-2272) für 30 min. inkubiert. Dadurch wurden die membranständigen Rezeptoren sowie alle anderen membranständigen ConA-bindenden Proteine markiert. Anschließend wurden die Oozyten gewaschen, um überschüssiges ConA zu entfernen. Dann wurden die Oozyten mit einem Teflon-Pistill homogenisiert, wodurch die Oozytenmembran solubilisiert wird. Durch Zugabe von 20 μ l Streptavidin-Sepharose-Kügelchen (Sigma S-1638) und Zentrifugation werden die mit biotinyliertem ConA markierten Oberflächenproteine aus dem Oozyten-Homogenisat separiert.

2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

PAGE nach Laemmli¹⁰⁹ ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Die beladenen Teilchen wandern durch ein Netz aus Polyacrylamid, wobei sich die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen nach deren Größe richtet. Das Polyacrylamid-Gel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen. Die Proben und Marker wurden vorsichtig in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese wurde für 2-3 h bei 80 mA durchgeführt.

2.5.3 Western Blot

Um die auf dem Gel aufgetrennten Proteine spezifisch mittels Antikörpern nachweisen zu können, wurden sie auf Nitrozellulose überführt¹⁹⁰. Dieser

Vorgang wird als „Western blotting“ bezeichnet. Die Blots wurden mit PBS, welches 5% Milchpulver enthielt, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Für den Nachweis von GluR1 wurde der Primärantikörper Kaninchen Anti-GluR1 (1µg/µl; Upstate, Biomol, Hamburg, Deutschland) und anschließend Esel Anti-Kaninchen Antikörper (1:1000 Verdünnung; Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) verwendet.

2.5.4 RT-PCR

Die PCR stellt eine *in vitro*-Methode zur exponentiellen Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Zielsequenz dar. Dies wird durch den wiederholten Ablauf der folgenden drei Prozesse erreicht: Denaturierung, Anlagern von Primern und Elongation der Zielsequenz.

Die gesamte RNA wurde aus dem Gewebe isoliert durch die Verwendung von Qiashreder und RNeasy Mini Kit von Qiagen. Für die Synthese des ersten Strangs der cDNA wurde 1 µg der RNA in 12,5 µl DEPC-Wasser mit 1 µl des Oligo-dT Primer (500 µg/ml; Invitrogen) vermischt und für 2 min auf 70° erhitzt. Ein Mix aus einem Reaktionspuffer, den Nukleotiden, einem RNase Inhibitor, einer reversen Transkriptase und DEPC-Wasser wurde hinzugefügt und für 60 min bei 42° inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen für 5 min auf 94° gestoppt. Die PCR Analyse wurde anschließend mit einem gesamten Volumen von 25 µl durchgeführt, welches 1 µl des Produktes der Reversen Transkriptase, 22 µl steriles Wasser, 1 µl des Primers 1 (10 pmol/µl) und 1 µl des Primers 2 (10 pmol/µl) enthielt. Die Reaktion wurde in 40 Zyklen durchgeführt.

3. Versuche und Ergebnisse

3.1 Regulation des GluR1

3.1.1 GluR1 und SGK

Um herauszufinden, ob die AMPA-Rezeptoren durch die SGK Isoformen reguliert werden, wurden die Rezeptoren in *Xenopus* Oozyten alleine oder mit SGK1, SGK2 oder SGK3 exprimiert.

Für die Experimente mit GluR1 wurde die nicht desensitisierende Mutante GluR1(L479Y) benutzt¹⁸². Als Koinjektionen wurde DEPC-Wasser, wtSGK1, wtSGK2, wtSGK3 und ^{T308D,S473D}PKB cRNA verwendet. Außerdem wurden Versuche mit den konstitutiv aktiven Mutanten ^{S422D}SGK1 und ^{S419D}SGK3 und den inaktiven Mutanten ^{K127N}SGK1 und ^{K124N}SGK3 durchgeführt.

Wie in der Einleitung schon beschrieben, wird die SGK Aktivität durch PI3-Kinase abhängige Phosphorylierungen gesteuert. Phosphorylierung an Ser⁴²² der SGK1 oder an Thr³⁰⁸ und Ser⁴⁷³ der PKB führt zu einer Aktivierung dieser Kinasen. Ersetzt man nun diese Aminosäuren mit Aspartat, so simuliert dessen negative Ladung die Phosphorylierung und man erhält die permanent aktiven Mutanten ^{S422D}SGK1 und ^{T308D, S473D}PKB. Demgegenüber ist bei der ^{K127N}SGK1 die katalytische Einheit durch das Ersetzen von Lys¹²⁷ mit Asparagin zerstört und die Mutante nicht aktiv. Die SGK verwandte Proteinkinase B (PKB) wurde als Kontrolle für die Spezifität der Regulationsmechanismen koexprimiert.

Injektion der GluR1(L479Y) cRNA führte zur Expression des GluR1(L479Y) Proteins in den Oozyten. Nach Applikation von 300 µM Glutamat ließ sich ein Glutamat-induzierten Einwärtsstrom (I_{Glu}) von ca. 1 – 2 µA elektrophysiologisch messen. Durch Koexpression von GluR1(L479Y) mit SGK3 wurden die Glutamat-induzierten Einwärtsströme signifikant größer, als in Oozyten die nur GluR1(L479Y) exprimieren (Tab. 8) Der Glutamat-induzierte Einwärtsstrom war in SGK2 exprimierenden Oozyten signifikant kleiner als in SGK3 exprimierenden Oozyten, aber signifikant größer als in

Oozyten, die nur GluR1(L479Y) alleine exprimierten (Tab. 8). Keine signifikante Veränderung der Glutamat-induzierten Ströme wurde beobachtet, wenn GluR1(L479Y) mit SGK1 oder PKB koexprimiert wurde. Abbildung 13 zeigt Glutamat-induzierte Stromspuren von GluR1(L479Y) alleine oder koexprimiert mit SGK Isoformen oder PKB in *Xenopus* Oozyten. Die Ströme wurden auf GluR1(L479Y) + H₂O normalisiert und die normalisierten Stromamplituden sind in Abbildung 14 dargestellt.

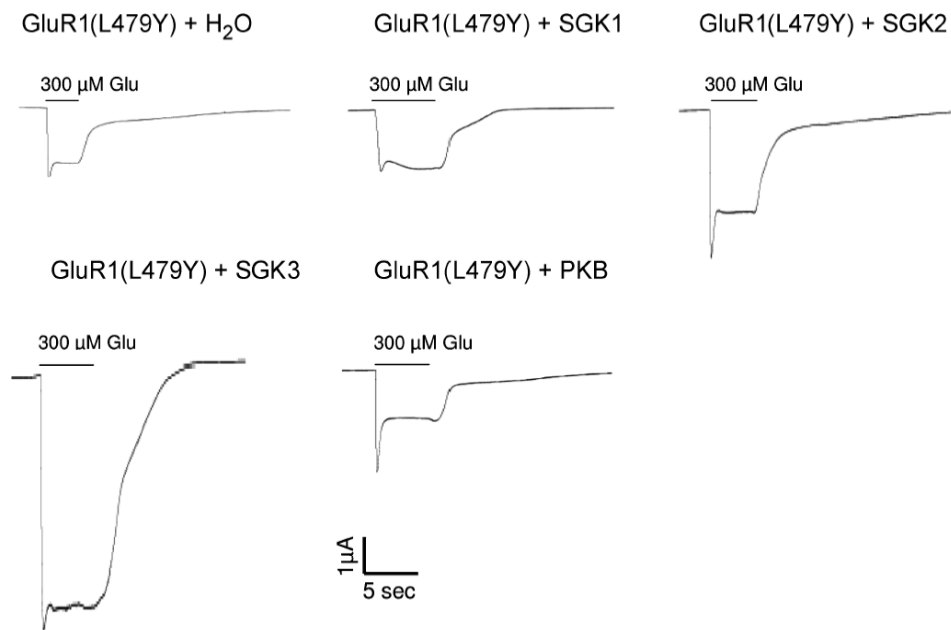


Abbildung 13: Repräsentative Stromspuren, gemessen in *Xenopus* Oozyten nach Zugabe von 300 µM Glutamat. Alle Ströme wurden bei -70 mV gemessen.

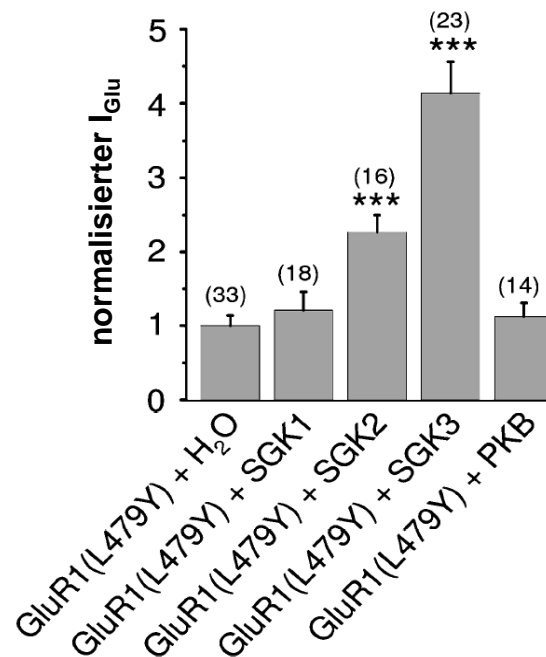


Abbildung 14: Glutamat-induzierte Stromamplituden, normalisiert auf die Ströme von GluR1(L479Y)+H₂O. Anzahl der Oozyten in Klammern. Signifikante Ströme (p<0,001) sind mit *** gekennzeichnet.

Expression	Arithmetisches Mittel ± Standardfehler	n
GluR1(L479Y) + H ₂ O	1 ± 0,14	33
GluR1(L479Y) + SGK1	1,48 ± 0,25	18
GluR1(L479Y) + SGK2	2,16 ± 0,24	16
GluR1(L479Y) + SGK3	4,14 ± 0,42	23
GluR1(L479Y) + PKB	0,94 ± 0,27	14

Tabelle 8: Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler

Durch Gelelektrophorese und Western Blot wurde die Rezeptordichte von GluR1(L479Y) in der Oozytenmembran bestimmt. Zur Quantifizierung wurde die mittlere Intensität von drei verschiedenen Blots ermittelt. Auch hier zeigte sich, dass die Rezeptordichte von GluR1(L479Y) in Oozyten signifikant erhöht war, wenn GluR1(L479Y) zusammen mit SGK3 koexprimiert wurde, im Vergleich zur alleinigen Expression von

GluR1(L479Y. Bei Koexpression von GluR1(L479Y) mit SGK2, schien die Dichte an GluR1(L479Y) in der Membran ebenfalls erhöht zu sein, wobei SGK1 und PKB die Rezeptordichte nicht beeinflussen können, wie in Abbildung 15 zu sehen ist.

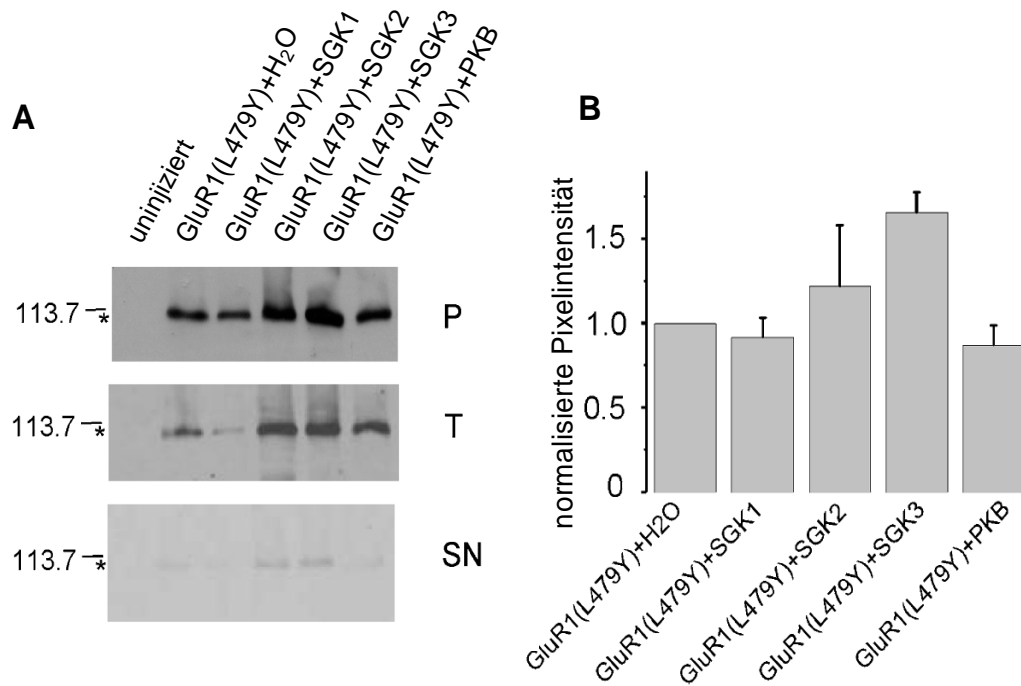


Abbildung 15: A, repräsentativer Western Blot. P, Plasmamembranprotein (n=18); SN, Überstand der intrazelluläres Protein enthält (n=1); T, gesamtes Protein (n=1). B, zeigt die relative Dichte der GluR1(L479Y) Plasmamembranproteine.

Um sicherzustellen, dass die SGK Isoformen in den Oozyten aktiv sind, wurden die Experimente mit den aktiven Mutanten ^{S422D}SGK1 und ^{S419D}SGK3 und den inaktiven Mutanten ^{K127N}SGK1 und ^{K124N}SGK3 wiederholt. Bei Koexpression von ^{S419D}SGK3 mit GluR1(L479Y) zeigte sich eine vergleichbare Stromamplitude wie bei der Koexpression von wtSGK3 mit GluR1(L479Y. Bei SGK1 wurde im Vergleich zu I_{Glu} von wtSGK1 weder für die aktive noch die inaktive Form der SGK1 eine signifikante Veränderung gesehen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 und Tabelle 9

dargestellt und zeigen, dass wtSGK1 und wtSGK3 aktiv sind, wenn sie in Oozyten exprimiert werden.

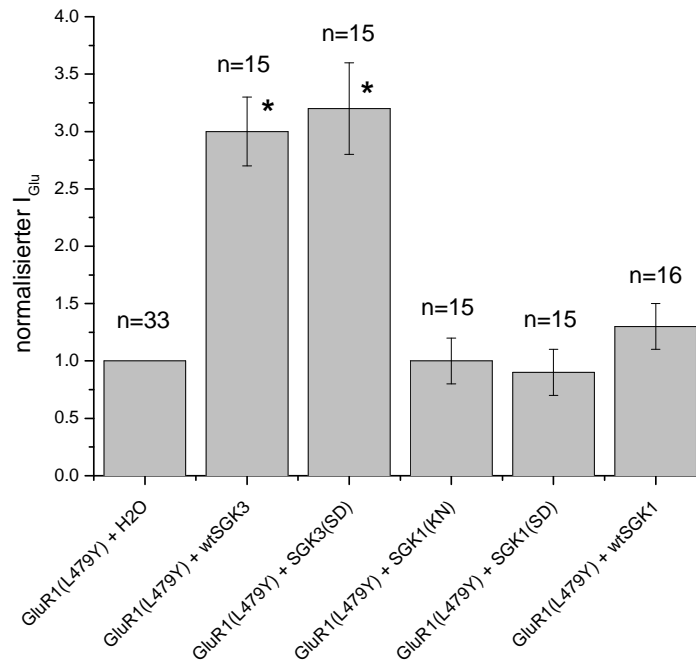


Abbildung 16: Koexpression von GluR1(L479Y) mit den verschiedenen Mutanten der Kinasen. Die Werte wurden auf GluR1(L479Y) + H₂O normalisiert. Signifikante Ströme ($p > 0,05$) sind mit * gekennzeichnet. Die Anzahl der gemessenen Oozyten wird mit n bezeichnet.

Expression	Arithmetisches Mittel ± Standardfehler	n
GluR1(L479Y)+ H ₂ O	1,0 ± 0,14	33
GluR1(L479Y)+wtSGK3	3,0 ± 0,3 nA	15
GluR1(L479Y)+ ^{S419D} SGK3	3,2 ± 0,4 nA	15
GluR1(L479Y)+ ^{K127N} SGK1	1,0 ± 0,2 nA	15
GluR1(L479Y)+ ^{S422D} SGK1	0,9 ± 0,2 nA	15
GluR1(L479Y)+wtSGK1	1,3 ± 0,2 nA	16

Tabelle 9: Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler

SGK3 Expression im Hippokampus

GluR1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Langzeitpotenzierung, die im Hippocampus stattfindet^{82,211}. Bisher wurde allerdings noch nicht nachgewiesen, ob SGK3 im Hippocampus exprimiert wird, was aber durch die oben gezeigte Regulation von GluR1(L479Y) durch SGK3 interessant wäre. Dazu wurde das Hippokampusgewebe von Wildtyp SGK3-Mäusen (SGK3^{+/+}) mit dem Gewebe von knock-out Mäusen (SGK3^{-/-}) verglichen. Durch PCR Experimente (siehe Abbildung 17) konnte bei den Wildtyp-Mäusen SGK3 nachgewiesen werden, aber nicht bei den knock-out Mäusen. Durch *in situ* Hybridisierung konnte die genaue Lokalisation der SGK3 im Hippokampus bestimmt werden. SGK3 wird in CA1, CA3 und Gyrus dentatus des Hippokampus exprimiert und diese Lokalisationen überschneiden sich mit der Expression von GluR1(L479Y) im Gehirn⁸².

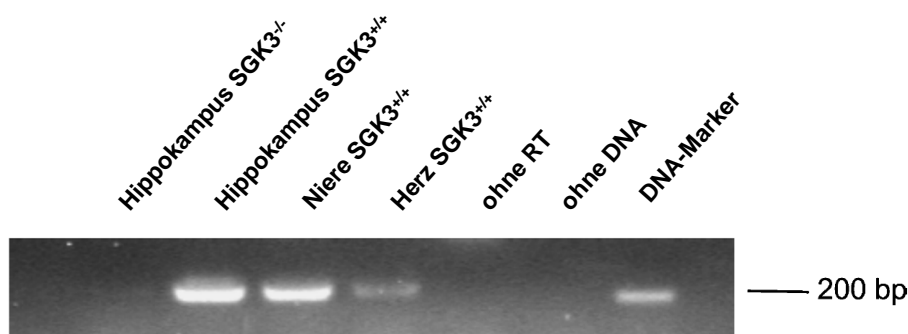


Abbildung 17: Amplifikation von SGK3 cDNA aus dem Hippokampus mittels RT-PCR. RT = reverse Transkriptase. Die RNA aus Hippokampusgewebe von SGK3^{-/-} und SGK3^{+/+} Mäusen wurde gesammelt und mittels RT-PCR bearbeitet. Als Kontrolle wurde RNA der Niere und des Herzens benutzt. Weitere Kontrollen sind Proben ohne reverse Transkriptase oder ohne DNA.

Regulation der GluR1(L479Y) Dichte in Neuronen des Hippokampus von Mäusen durch SGK3

Um herauszufinden, ob die Regulation von GluR1(L479Y) durch SGK3 relevant für die Rezeptordichte in Hippokampusneuronen ist, wurde das Hippokampusgewebe von SGK3 knock-out Mäusen (SGK3^{-/-}) mit dem ihrer Wildtypgeschwister (SGK3^{+/+}) verglichen¹³⁴. Durch Western Blot konnte in Hippokampusgewebe der knock-out Mäuse eine signifikant reduzierte Plasmamembranproteinexpression von GluR1(L479Y) im Vergleich zu den Wildtypmäusen gezeigt werden. Im Vergleich dazu wurde β -Tubulin als Kontrolle verwendet. Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, zeigten sich bei β -Tubulin keine Unterschiede bei der Proteinexpression zwischen den Wildtyp- und den knock-out Mäusen.

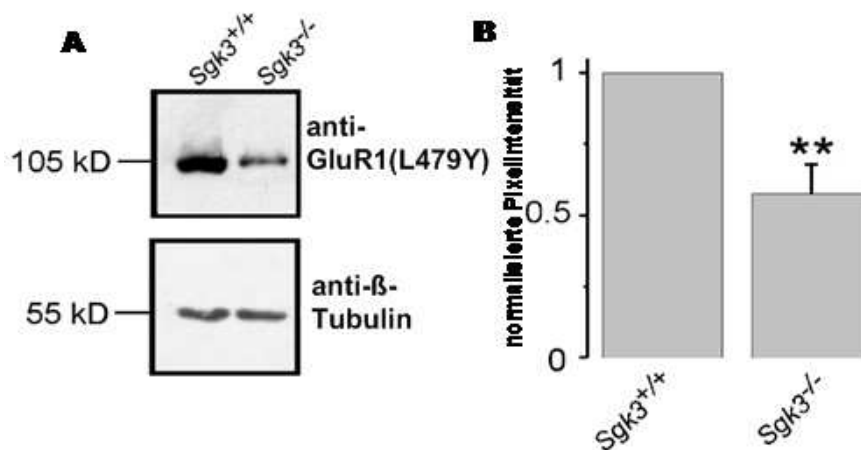


Abbildung 18:

A, repräsentativer Western Blot aus Hippokampusgewebe von Mäusen. Für die Immunfärbung der Proteinfractionen aus Hippokampusgewebe von Wildtypmäusen und SGK3 knock-out Mäusen wurde ein Kaninchen Primärantikörper Anti-GluR1 verwendet. Die Expression des GluR1(L479Y) Rezeptors war in Hippokampusgewebe von SGK3 knock-out Mäusen weniger stark ausgeprägt, als in Wildtypmäusen. Der gleiche Blot wurde entfärbt und erneut mit einem monoklonalen anti- β -Tubulin-Antikörper untersucht. Die Expression des β -Tubulin diente als Kontrolle und war bei SGK3 knock-out Mäusen und Wildtypmäusen vergleichbar. B, statistische Analyse: arithmetisches Mittel und Standardfehler

der relativen Dichte des GluR1(L479Y) Proteins. Signifikante Unterschiede ($p > 0,01$) sind mit ** gekennzeichnet.

Weiterhin wurde in Kooperation untersucht, ob die reduzierte Proteinexpression von GluR1(L479Y) in SGK3^{-/-} knock-out Mäusen, die AMPA-Rezeptor vermittelte Übertragung in Teilen des Hippokampus beeinflusst. Um die Stärke der synaptischen Übertragung zu beurteilen, wurde die Größe der präsynaptischen Stimulation (Input) mit dem Anstieg der EPSPs (Output) im Stratum radiatum verglichen. Dabei wurde zwischen den SGK3 Wildtyp (n=22) und den SGK3 knock-out (n=5) Mäusen kein signifikanter Unterschied gefunden. Da GluR1(L479Y) knock-out Mäuse unveränderte synaptische, aber stark reduzierte extrasynaptische AMPA-Rezeptorströme zeigen²²¹, wurde ebenfalls die Menge an extrasynaptischen Rezeptoren bestimmt. Durch extrasynaptische AMPA-Rezeptoren vermittelte Ströme wurden in „outside out somatic membrane patches“ gemessen, da exzitatorische Synapsen das Soma von pyramidalen Zellen nicht berühren. Die Ströme waren in SGK3 knock-out (-652 ± 181 pA, n=6) und SGK3 Wildtyp Mäusen (-601 ± 72 pA, n=12) vergleichbar.

3.1.2 Regulation von GluR1(L479Y) durch SGK3 und Stargazin

Das Membranprotein Stargazin beeinflusst entscheidend die Oberflächenexpression von AMPA-Rezeptoren. Es besitzt im C-Terminus eine PDZ-Bindedomäne, die mit PSD-95 interagieren kann³¹. Die Interaktion von Stargazin mit den Untereinheiten der AMPA-Rezeptoren reguliert die Abgabe und/oder die Erhaltung von funktionellen Rezeptoren in der Membran, während die Bindung an PSD-95 für die Ansammlung von AMPA-Rezeptoren in der Synapse benötigt wird.

Die weiteren Untersuchungen sollen nun klären, ob Stargazin und SGK3 GluR1(L479Y) unabhängig voneinander regulieren, also unterschiedliche molekulare Mechanismen benutzen, oder ob SGK3 die Regulation des GluR1(L479Y) Trafficking dadurch erhöht, indem es Stargazin an der betreffenden Sequenz (RXRXXS/T) am Rest 241 phosphoryliert.

Es wurde GluR1(L479Y) mit SGK1, SGK2, SGK3 und/oder Stargazin zusammen in *Xenopus* Oozyten exprimiert. Wie bereits in Kapitel 3.1.1. gezeigt, kommt es bei der Koexpression von GluR1(L479Y) und SGK3 zu einem signifikant erhöhten Einwärtsstrom (I_{Glu}). Wie ebenfalls schon gezeigt³² erhöht auch die Koexpression mit Stargazin die Stromamplitude. Wenn SGK3 und Stargazin zusammen mit GluR1(L479Y) koexprimiert werden, kommt es zu signifikant größeren Einwärtsströmen im Vergleich zu GluR1(L479Y) und SGK3 oder Stargazin alleine. Außerdem sind, wie auch in Abbildung 19 und in Tabelle 10 zu sehen ist, die Ströme größer als die Summe der Ströme, die durch GluR1(L479Y) mit SGK3 und GluR1(L479Y) mit Stargazin ausgelöst werden. Dadurch, dass sich die Effekte durch SGK3 und Stargazin potenzieren, weisen die Beobachtungen darauf hin, dass SGK3 und Stargazin GluR1(L479Y) auf verschiedene Weise regulieren.

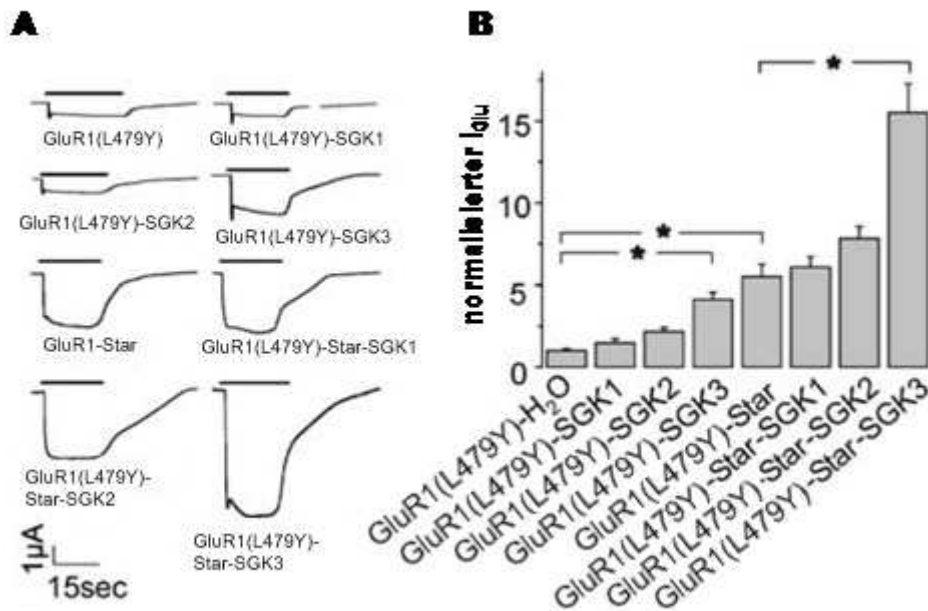


Abbildung 19: A, repräsentative Stromspuren von Oozyten, die GluR1(L479Y) mit oder ohne SGK1, SGK2, SGK3 und/oder Stargazin exprimieren. Die Ströme wurden 6 Tage nach der Injektion gemessen. B, Mittelwert und Standardabweichung der Ströme. Normiert auf

GluR1(L479Y)+H₂O. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden mit * markiert.

Expression	Arithmetisches Mittel \pm Standardfehler	n
GluR1(L479Y) + H ₂ O	1,0 \pm 0,1	41
GluR1(L479Y) + SGK1	1,5 \pm 0,3	17
GluR1(L479Y) + SGK2	2,2 \pm 0,2	14
GluR1(L479Y) + SGK3	4,1 \pm 0,4	32
GluR1(L479Y) + Stargazin	5,5 \pm 0,8	35
GluR1(L479Y) + Stargazin + SGK1	6,1 \pm 0,6	7
GluR1(L479Y) + Stargazin + SGK2	7,8 \pm 0,7	14
GluR1(L479Y) + Stargazin + SGK3	15,5 \pm 1,8	28

Tabelle 10: Arithmetisches Mittel und Standardfehler bei der Expression von GluR1(L479Y) mit SGK und/oder Stargazin.

Um zu bestimmen, ob der beobachtete Anstieg der Ströme von einer Erhöhung der Rezeptordichte von GluR1(L479Y) begleitet wird, wurden Untersuchungen mit Biotinyl-ConA durchgeführt. Dabei zeigte sich wie bereits bei früheren Untersuchungen, dass sechs Tage nach cRNA Injektion von GluR1(L479Y) und SGK3, die Rezeptordichte von GluR1(L479Y) in der Plasmamembran signifikant erhöht ist. Wohingegen die Koinjektion von GluR1(L479Y) und Stargazin cRNA zu keiner signifikant erhöhten Rezeptordichte führt, dargestellt in Abbildung 20. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Zunahme des Glutamat-induzierten Stroms durch SGK3 durch Erhöhung der Proteinexpression zustande kommt, wohingegen der Effekt von Stargazin auf GluR1(L479Y) durch funktionelle Aktivierung am GluR1(L479Y)-Protein zustande kommt.

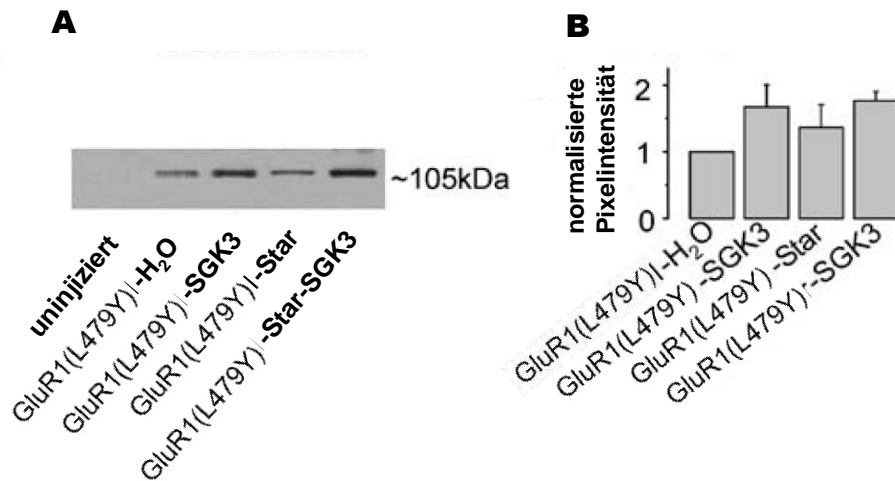


Abbildung 20: Western Blot der Plasmamembrandichte des GluR1(L479Y)-Proteins, exprimiert in Oozyten mit oder ohne SGK3 und/oder Stargazin. B, relative Plasmamembrandichte des GluR1(L479Y)-Proteins.

Um zu zeigen, dass die Regulation von GluR1(L479Y) und Stargazin von der Aktivität der Kinase abhängt, wurden Injektionen mit wtSGK3, der aktiven Mutante ^{S419D}SGK3 und der inaktiven Mutante ^{K124N}SGK3 durchgeführt.

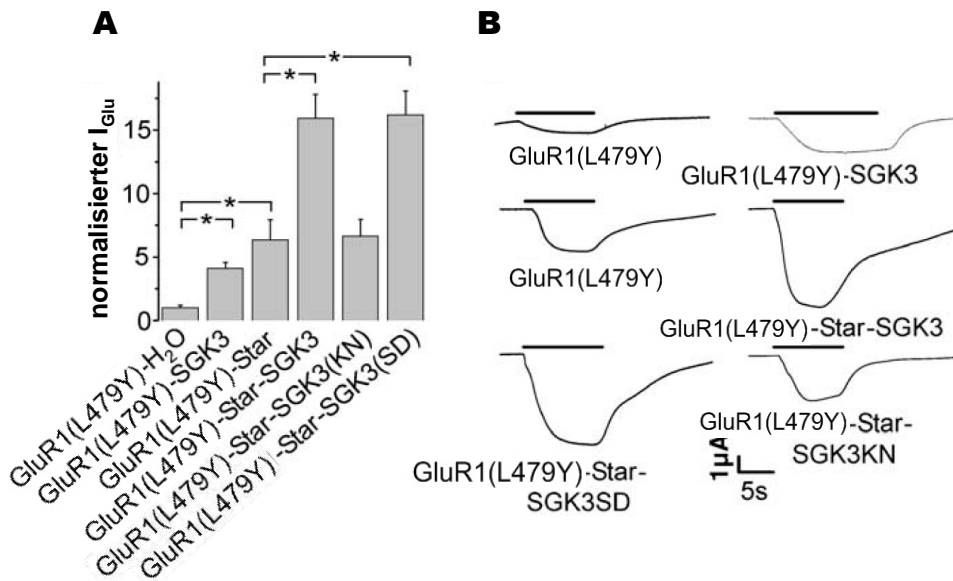


Abbildung 21: A, GluR1(L479Y)/Stargazin koexprimiert mit wtSGK3, inaktiver SGK3(KN) oder aktiver SGK3(SD). Die Ströme wurden 6 Tage nach der Injektion und nach Zugabe von 300 μ M Glutamat und 100 μ M Cyclothiazid als Desensitisierungsinhibitor gemessen. Die Werte wurden auf GluR1(L479Y) + H₂O normalisiert. Signifikante Ströme ($p < 0,05$) wurden mit * gekennzeichnet. B, repräsentative Stromspuren, gemessen 6 Tage nach Injektion.

Wie man in Abbildung 21 sehen kann, aktivieren ^{S419D}SGK3 und wtSGK3 den GluR1(L479Y)-Rezeptor, wohingegen ^{K124N}SGK3 die GluR1(L479Y)-Stargazin-Ströme nicht signifikant verändert (Tabelle 11). Auch die Rezeptordichte, die in Abbildung 22 dargestellt ist, wird durch die beiden aktiven SGK3 Formen erhöht, aber nicht durch die inaktive Mutante.

Expression	Arithmetisches Mittel ± Standardfehler	n
GluR1(L479Y) + H ₂ O	1,0 ± 0,2	8
GluR1(L479Y) + SGK3	4,1 ± 0,4	32
GluR1(L479Y) + Stargazin	6,4 ± 1,6	8
GluR1(L479Y) + Stargazin + SGK3	16,0 ± 1,8	28
GluR1(L479Y) + Stargazin + SGK3(KN)	6,6 ± 1,3	10
GluR1(L479Y) + Stargazin + SGK3(SD)	16,2 ± 1,9	11

Tabelle 11: Arithmetisches Mittel und Standardfehler von GluR1(L479Y) mit verschiedenen Mutanten von SGK3 und/oder Stargazin.

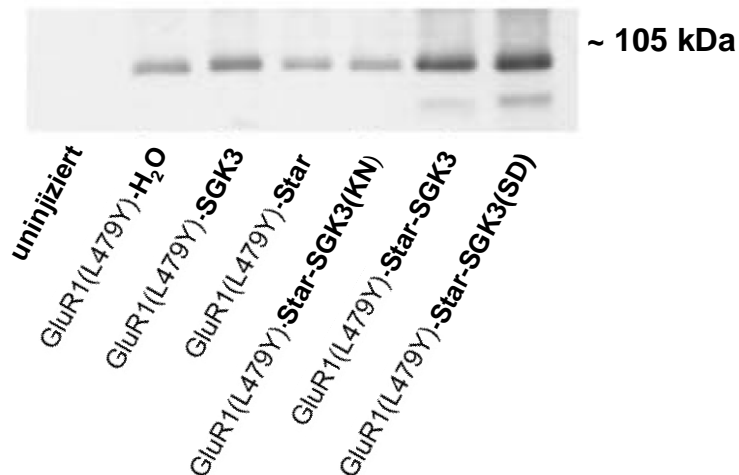


Abbildung 22: Plasmamembrandichte von GluR1(L479Y) in *Xenopus* Oozyten, die GluR1(L479Y) mit oder ohne Stargazin und den aktiven oder inaktiven Mutanten von SGK3 exprimieren.

Um herauszufinden, ob der Effekt von SGK3 oder Stargazin von einer intakten Phosphorylierungssequenz (RSRSSS) an der Aminosäure 241 im Stargazinprotein verursacht wird, wurde Serin gegen Alanin

(^{S241A}Stargazin) oder Aspartat (^{S241D}Stargazin) ausgetauscht. Die negative Ladung von Aspartat könnte eine Phosphorylierung an dieser Stelle simulieren, wobei Alanin, als eine neutrale Aminosäure, die Phosphorylierungssequenz zerstört.

^{S241A}Stargazin zeigt höhere I_{Glu} bei Expression mit GluR1(L479Y) als ^{S241D}Stargazin oder wtStargazin zusammen mit GluR1(L479Y). Somit ist ^{S241A}Stargazin effektiver als die nicht mutierte Form. Auch bei der Koexpression von GluR1(L479Y) mit SGK3 und wtStargazin oder einer der beiden Mutanten wird I_{Glu} signifikant erhöht. Die normalisierten Ströme sind in Abbildung 23 dargestellt und die in Tabelle 12 aufgeführt. Außerdem wurde die Plasmamembrandichte von GluR1(L479Y) nicht verändert, wenn GluR1(L479Y) mit SGK3 und ^{S241A}Stargazin oder ^{S241D}Stargazin koexprimiert wird, wie in Abbildung 24 zu sehen ist. Das bedeutet, dass Mutanten von Stargazin mehr die Kanalfunktion, als die Rezeptordichte beeinflussen und keine intakte Phosphorylierungssequenz für den stimulierenden Effekt von SGK3 nötig ist. SGK3 stimuliert GluR1(L479Y) durch einen anderen Mechanismus, als Stargazin an der Aminosäure Serin 241 zu phosphorylieren.

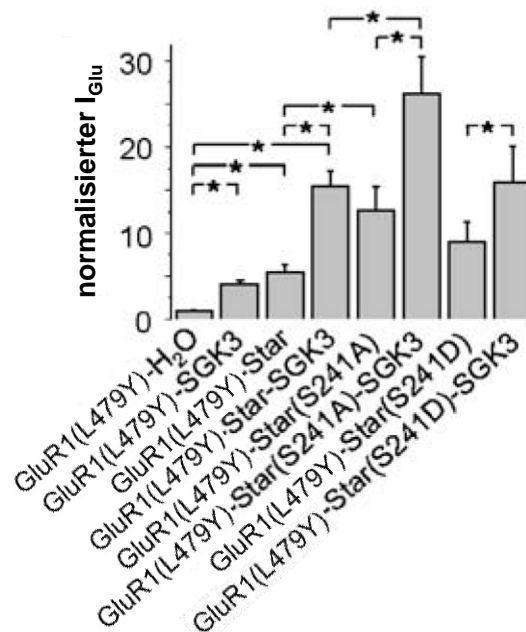


Abbildung 23: Ströme in Oozyten, die GluR1(L479Y) mit oder ohne wtStargazin oder Stargazinmutanten und/oder SGK3 exprimieren. Die Ströme

wurden 6 Tage nach Injektion gemessen und es wurde 300 μ M Glutamat und 100 μ M Cyclothiazid als Desensitisierungsinhibitor zugegeben. Die Ströme wurden auf GluR1(L479Y) + H₂O normalisiert. Signifikante Veränderungen der Stromamplituden ($p < 0,05$) wurden mit * markiert.

Expression	Arithmetisches Mittel \pm Standardfehler	N
GluR1(L479Y) + H ₂ O	1,0 \pm 0,1	41
GluR1(L479Y) + SGK3	4,1 \pm 0,4	32
GluR1(L479Y) + Stargazin	5,5 \pm 0,8	35
GluR1(L479Y) + Stargazin + SGK3	15,5 \pm 1,8	28
GluR1(L479Y) + ^{S241A} Stargazin	12,7 \pm 2,7	13
GluR1(L479Y) + ^{S241A} Stargazin + SGK3	26,2 \pm 4,2	16
GluR1(L479Y) + ^{S241D} Stargazin	9,0 \pm 2,4	14
GluR1(L479Y) + ^{S241D} Stargazin + SGK3	16,1 \pm 4,0	15

Tabelle 12: Arithmetisches Mittel und Standardabweichung der Expression von GluR1(L479Y) mit SGK3 und/oder Stargazin oder der Mutanten

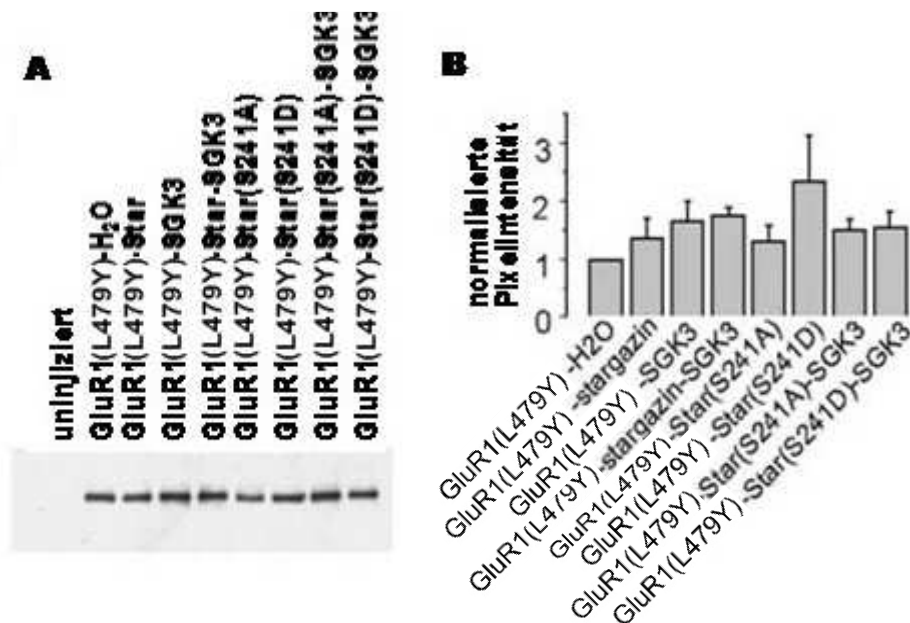


Abbildung 24: A, Plasmamembrandichte der GluR1 (L479Y) Proteine in Oozyten, die GluR1(L479Y) mit oder ohne Stargazin oder die Mutanten

und/oder SGK3 exprimieren. B, Relative Dichte der GluR1(L479Y) Plasmamembranproteine.

Die Beobachtungen, die 6 Tage nach cRNA Injektion gemacht wurden, unterschieden sich von den Beobachtungen, 2 Tage nach cRNA Injektion. 2 Tage nach der Koexpression von Stargazin oder SGK3 sind die Stromamplituden (siehe Abbildung 25 und Tabelle 13) von GluR1(L479Y)-exprimierenden Zellen nur in den exprimierenden Zellen mit Stargazin erhöht und nicht bei Koexpression mit SGK3. Das wird durch Western Blots, die in Abbildung 26 dargestellt sind, bestätigt, die 2 Tage nach Koexpression mit Stargazin eine signifikante Erhöhung der GluR1(L479Y)-Rezeptordichte zeigen, wohingegen SGK3 keine Erhöhung nach 2 Tagen zeigt.

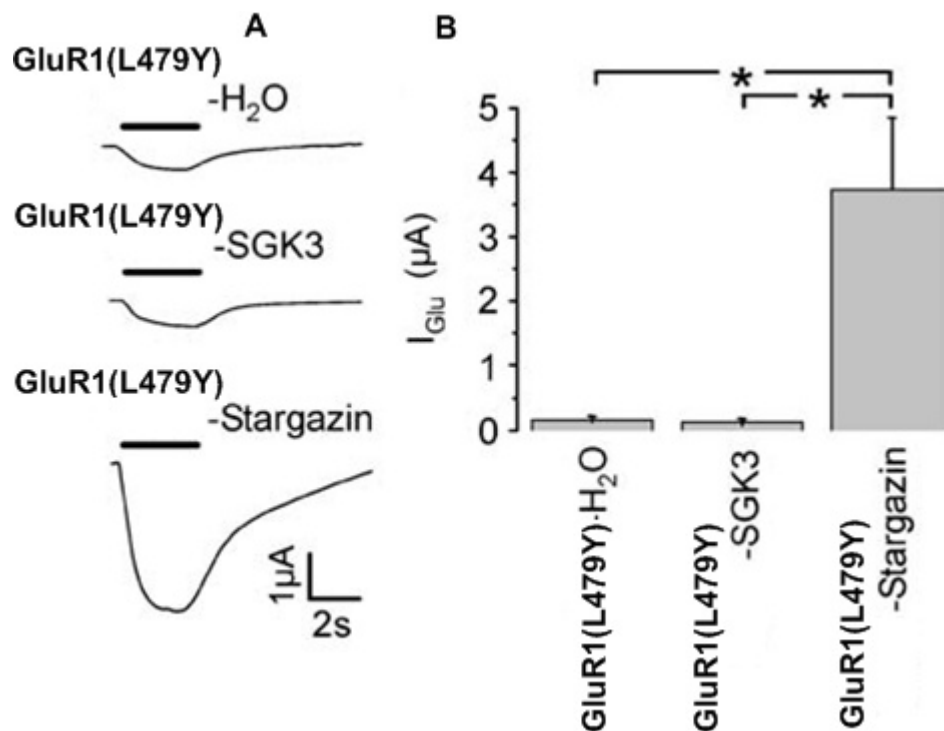


Abbildung 25: A, repräsentative Ströme 2 Tage nach Injektion von GluR1(L479Y) mit SGK3 oder Stargazin cRNA. Es wurde 300 μM Glutamat und 100 μM Cyclothiazid als Desensitisierungsinhibitor appliziert. B, Arithmetisches Mittelwert und Standardfehler der Ströme. Signifikante Ströme ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

Expression	Arithmetisches Mittel + Standardfehler	N
------------	--	---

GluR1(L479Y) + H₂O	0,18 ± 0,05 µA	7
GluR1(L479Y) + SGK3	0,13 ± 0,05 µA	8
GluR1(L479Y) + Stargazin	3,7 ± 1,1 µA	7

Tabelle 13: Arithmetisches Mittel und Standardfehler 2 Tage nach Koexpression von GluR1(L479Y) und SGK3 oder Stargazin

Mit Bezug auf diese Ergebnisse wurden die Effekte von Stargazin und SGK3 auf die GluR1(L479Y) Plasmamembranexpression im Laufe der Zeit untersucht. Die Koexpression von Stargazin beschleunigt das Auftreten der GluR1(L479Y) Proteine in der Plasmamembran, aber es verändert nicht signifikant die Dichte der GluR1(L479Y) Proteine 6 Tage nach cRNA Injektion. Wohingegen sich 6 Tage nach cRNA Injektion von SGK3 eine Erhöhung der Dichte an GluR1(L479Y) Rezeptoren in der Plasmamembran zeigt.

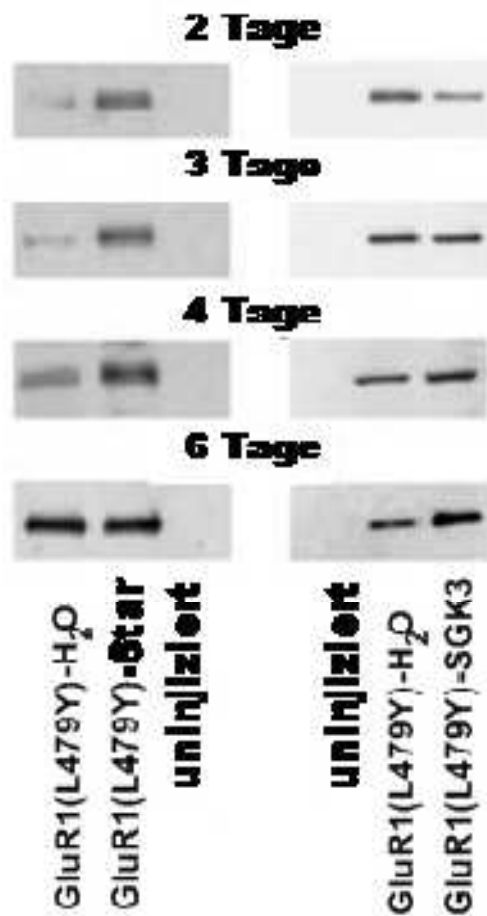


Abbildung 26: Plasmamembrandichte von GluR1(L479Y) koexprimiert mit H₂O, Stargazin oder SGK3 nach 2, 3, 4, und 6 Tagen.

3.1.3 Untersuchung von heteromeren AMPA-Rezeptorkomplexen

Da AMPA-Rezeptoren *in vivo* auch als heteromere Komplexe vorliegen können^{211,82}, werden im weiteren einige heteromere Komplexe untersucht. In Neuronen des Hippokampus kommen vor allem die Komplexe GluR1/2 bzw. GluR2/3 vor. Einige wenige Komplexe enthalten auch GluR1 und GluR3.

GluR1(L479Y) + GluR2(Q)

Zuerst wurde GluR1(L479Y) mit GluR2(Q), der nicht-edierten Form von GluR2 koexprimiert. Allerdings liegt GluR2 normalerweise zu nahezu 100% in der edierten R-Form vor.

Durch die Injektion von GluR1(L479Y) und GluR2(Q) in Oozyten, kam es durch Zugabe von 300 μM Glutamat zu einem durch Glutamat-induzierten Einwärtsstrom I_{Glu} . Durch Koinjektionen mit SGK1, SGK2, SGK3 und PKB kam es zu keiner signifikanten Änderung von I_{Glu} . Die gemessenen Absolutwerte wurden auf GluR1(L479Y) + H₂O normalisiert und in Abbildung 27 und Tabelle 14 dargestellt.

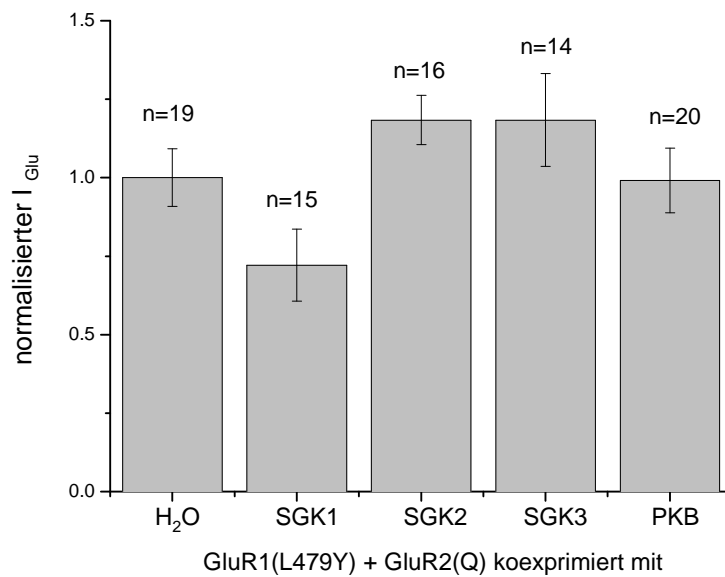


Abbildung 27: Koexpression von GluR1(L479Y) und GluR2(Q) mit wtSGK und PKB. Signifikante Ströme ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet. Mit n wird die Anzahl der gemessenen Oozyten bezeichnet.

Expression	Arithmetisches Mittel ± Standardfehler	n
GluR1(L479Y) + GluR2(Q) + H ₂ O	1,0 ± 0,1	19
GluR1(L479Y) + GluR2(Q) + SGK1	0,7 ± 0,1	15
GluR1(L479Y) + GluR2(Q) + SGK2	1,2 ± 0,1	16
GluR1(L479Y) + GluR2(Q) + SGK3	1,2 ± 0,1	14
GluR1(L479Y) + GluR2(Q) + PKB	1,0 ± 0,1	20

Tabelle 14: Arithmetisches Mittel und Standardfehler für die Expression von GluR1(L479Y) und GluR2(Q) mit den verschiedenen Kinasen.

GluR1(L479Y) + GluR2(R)

Für diese Versuche wurde die edierte Form von GluR2 benutzt. Es wurde die cRNA von GluR1(L479Y), GluR2(R)/(L483Y) und SGK1, SGK2, SGK3 oder PKB in Oozyten injiziert. Für die weiteren Versuche wird immer die Mutante GluR2(R)/(L483Y) verwendet, die im folgenden mit GluR2(LY) bezeichnet wird. Dabei zeigte sich, dass sowohl SGK1 als auch SGK3 I_{Glu} signifikant erhöhen. PKB dagegen erniedrigt den Einwärtsstrom signifikant. SGK2 hat keinen Einfluss auf I_{Glu} . Abbildung 28 zeigt den auf GluR1(L479Y) + GluR2(LY) + H₂O normalisierten Einwärtsstrom und Tabelle 15 die ermittelten Werte.

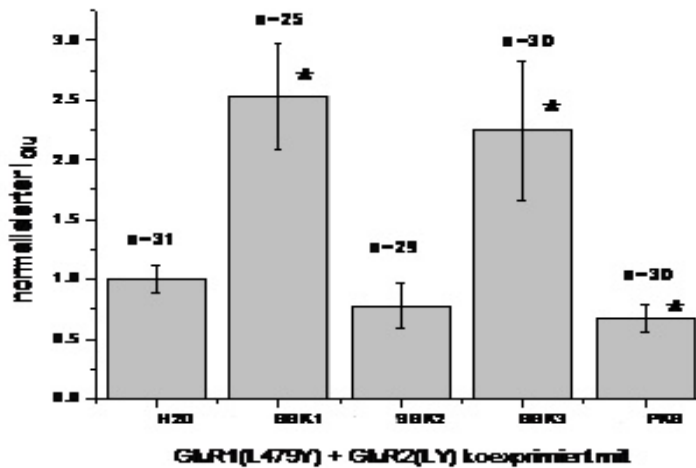


Abbildung 28: Koexpression von GluR1(L479Y) und GluR2(LY) mit den verschiedenen Kinasen. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden mit * gekennzeichnet. Die Anzahl der gemessenen Oozyten wird mit n bezeichnet.

Expression	Arithmetisches Mittel ± Standardfehler	N
GluR1(L479Y) + GluR2(LY) + H ₂ O	1,0 ± 0,1	31
GluR1(L479Y) + GluR2(LY) + SGK1	2,5 ± 0,4	25
GluR1(L479Y) + GluR2(LY) + SGK2	0,8 ± 0,2	29
GluR1(L479Y) + GluR2(LY) + SGK3	2,2 ± 0,6	30
GluR1(L479Y) + GluR2(LY) + PKB	0,7 ± 0,1	30

Tabelle 15: Arithmetisches Mittel und Standardfehler bei Koexpression von GluR1(L479Y) und GluR2(LY) mit den verschiedenen Kinasen.

GluR1(L479Y) + GluR3

Für die nativ im Hirn selten vorkommende heteromere Form von GluR1(L479Y) und GluR3, wurde die cRNA von GluR1(L479Y) und GluR3 nur mit der cRNA von SGK3 in Oozyten injiziert. Durch Zugabe von 300 µM Glutamat und 100 µM Cyclothiazid kam es zu einem durch Glutamat-induzierten Einwärtsstrom, der durch SGK3 nicht signifikant verändert wurde (siehe Abbildung 29 und Tabelle 16). Die Absolutwerte wurden auf GluR1(L479Y) + GluR3 + H₂O normalisiert.

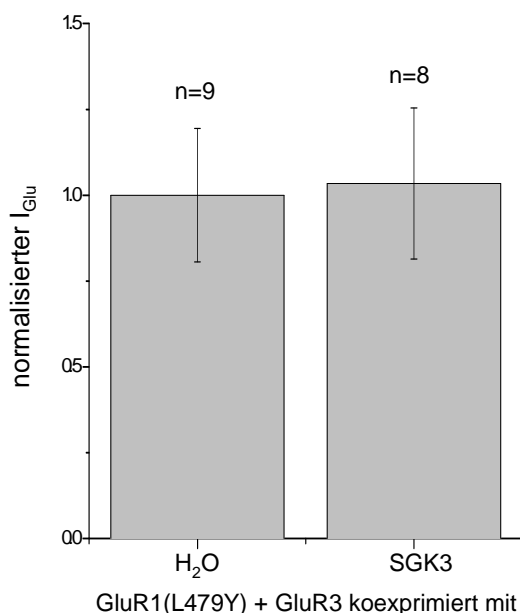


Abbildung 29: Koexpression von GluR1(L479Y) und GluR3 mit SGK3.

Expression	Arithmetisches Mittel + Standardfehler	n
GluR1(L479Y) + GluR3 + H ₂ O	1,0 ± 0,19	9
GluR1(L479Y) + GluR3 + SGK3	1,03 ± 0,22	8

Tabelle 16: Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler bei Expression von GluR1(L479Y) und GluR3 mit SGK3. Die Ströme wurden nach Applikation von 300 µM Glutamat als Agonist und 100 µM Cyclothiazid als Desensitisierungsinhibitor gemessen.

3.1.4 Bestimmung der Agonistensensitivität von GluR1(L479Y) in Abhängigkeit von SGK

Mit Hilfe der voltage-clamp Methode wurden Glutamat-induzierte Einwärtsströme bei 3 unterschiedlichen Konzentrationen von Glutamat im Bereich von 3 μM bis 300 μM gemessen. Damit erhält man genauere Aufschlüsse über die funktionellen Eigenschaften des Rezeptors. Für diese Arbeit war es insbesondere wichtig zu prüfen, ob sich die Wirksamkeit des Rezeptors für Glutamat bei Koexpression von SGK signifikant verändert. Dieses erfolgt über die Ermittlung des so genannten EC_{50} -Wertes (Konzentration der halbmaximalen Aktivierung).

Bei den Experimenten ergaben sich folgende EC_{50} -Werte: für GluR1(L479Y) + H_2O = $3,3 \pm 0,76$ (n=3), für GluR1(L479Y) + SGK1 = $4,4 \pm 0,52$ (n=3), für GluR1(L479Y) + SGK2 = $1,45 \pm 0,25$ (n=2) und für GluR1(L479Y) + SGK3 = $0,8 \pm 0,09$ (n=2). Dabei zeigt sich aber kein deutlicher Unterschied der Glutamatkonzentration, die benötigt wird, um den halbmaximalen Einwärtsstrom zu Erlangen. Der EC_{50} des GluR1(L479Y) bleibt durch die Koexpression von SGK also unbeeinflusst, d. h. die Wirksamkeit des Rezeptors wird durch SGK nicht beeinflusst.

3.1.5 Analyse der Ionenselektivität von GluR1(L479Y) in Abhängigkeit von SGK

Zusätzlich wurden Untersuchungen zur Ionenselektivität des GluR1(L479Y) durchgeführt. Dazu wurde die Strom-Spannungs-Beziehung (I-V) untersucht. Zunächst wurde GluR1(L479Y) mit einer der SGK Isoformen oder PKB exprimiert. Anschließend wurde die Spannung kontinuierlich von -150 mV bis +50 mV erhöht. Die Versuche haben gezeigt, dass keine der Kinasen die Strom-Spannungs-Kurven, dargestellt in Abbildung 30, von GluR1(L479Y) signifikant verändern. Das bedeutet, dass die Ionenselektivität für die Hauptionen (Na^+ und K^+) durch die Isoformen der SGK oder PKB nicht verändert wird.

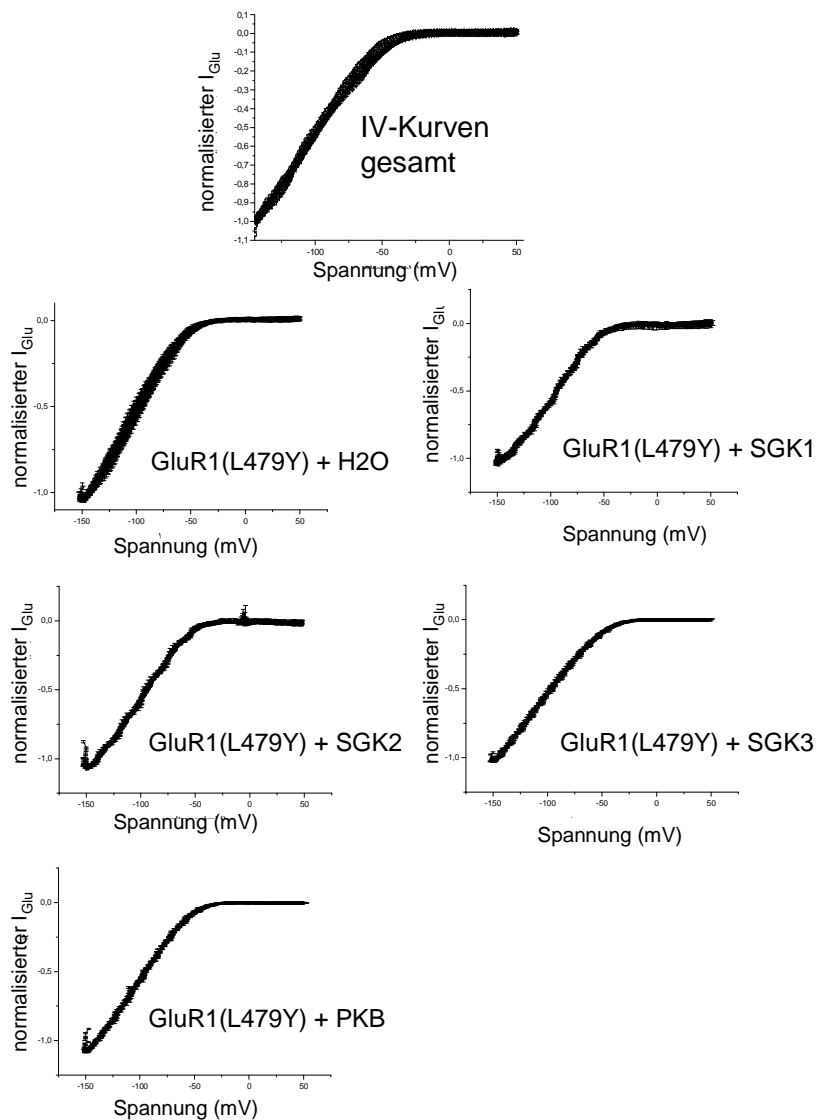


Abbildung 30: Strom-Spannungs-Kurven von GluR1(L479Y) mit den verschiedenen Kinasen. Die Ströme wurden in Mg^{2+} -Ringer und nach Applikation von 300 μM Glutamat und 100 μM Cyclothiazid, als Desensitisierungsinhibitor, gemessen. Es wurden mindestens 3 Zellen pro Gruppe gemessen.

3.2 Regulation des GluR2(R)

3.2.1 GluR2(R) und SGK

GluR2 kommt in zwei verschiedenen Varianten vor, die durch RNA-Edierung in der Porendomäne entstehen. Je nachdem ob an der Q/R-Edierposition der Aminosäuresequenz ein Arginin (R) oder ein Glutamin (Q) vorliegt, liegt der Rezeptor in der Q- oder R-Variante vor. Nativ liegt GluR2 in Neuronen zu fast 100% in der R-Variante, also ediert vor. Die RNA-Edierung ist wichtig für die Ca^{2+} -Permeabilität. Die Ca^{2+} -Leitfähigkeit von AMPA-Rezeptoren hängt u. a. davon ab, ob die GluR2 Untereinheit ein Teil des Rezeptors ist oder nicht. AMPA-Rezeptoren, die GluR2(Q) enthalten, haben eine hohe Ca^{2+} -Leitfähigkeit, im Gegensatz zu Rezeptoren, die GluR2(R) enthalten und eine geringe Ca^{2+} -Leitfähigkeit aufweisen. Da GluR2 zu 100% in der R-Variante vorliegt, haben AMPA-Rezeptoren, die GluR2 enthalten eine schlechte Ca^{2+} -Leitfähigkeit¹⁰⁸.

Um zu untersuchen, ob GluR2(R) durch SGK reguliert wird, wurde GluR2(R) cRNA mit oder ohne SGK1, SGK2, SGK3 oder PKB cRNA in Oozyten injiziert. Für die folgenden Versuche wurde immer mit der Mutante GluR2(R)(L483Y) gearbeitet, die im folgenden mit GluR2(LY) bezeichnet wird. Durch Applikation von 300 μM Glutamat, kam es zu einem durch Glutamat-induzierten Einwärtsstrom.

Die Experimente wurden an Oozyten durchgeführt, die von 5 verschiedenen Fröschen stammten. Die gemessenen Absolutwerte wurden auf GluR2(LY)+ H_2O normalisiert und in Abbildung 31 und Tabelle 17 zusammengefaßt.

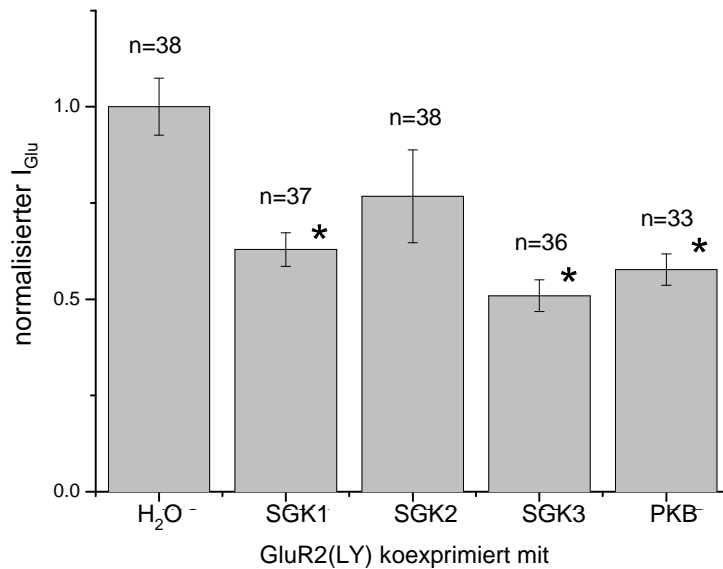


Abbildung 31: Koexpression von GluR2(LY) mit den Isoformen der Kinasen. Die Ströme wurden nach Applikation von 300 μ M Glutamat gemessen. Signifikante Ströme ($p < 0,05$) sind mit * markiert.

Die Versuche haben gezeigt, dass sowohl SGK1, SGK3 und PKB die Glutamat-induzierten Einwärtsströme signifikant reduzieren. SGK2 hat keinen signifikanten Einfluss auf I_{Glu} .

Expression	Arithmetisches Mittel + Standardfehler	n
GluR2(LY) + H ₂ O	1,0 ± 0,07	38
GluR2(LY) + SGK1	0,63 ± 0,04	37
GluR2(LY) + SGK2	0,77 ± 0,12	38
GluR2(LY) + SGK3	0,51 ± 0,04	36
GluR2(LY) + PKB	0,58 ± 0,04	33

Tabelle 17: Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler bei Expression von GluR2(LY) mit den verschiedenen Kinasen.

3.2.2 Bestimmung der Agonistenselektivität von GluR2(LY) in Abhängigkeit von SGK

Auch für GluR2(LY) wurden Analysen zur Bestimmung der apparenten Agonistenaffinität durchgeführt. Hierfür wurden bei 6 verschiedenen Glutamatkonzentrationen von 3 μM bis 10000 μM , die durch Glutamat-induzierten Einwärtsströme gemessen.

Anschließend wurden Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt und die Werte in Abbildung 32 und Tabelle 18 dargestellt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Das bedeutet der EC_{50} -Wert des GluR2(LY) bleibt durch die Koexpression von SGK oder PKB unbeeinflusst.

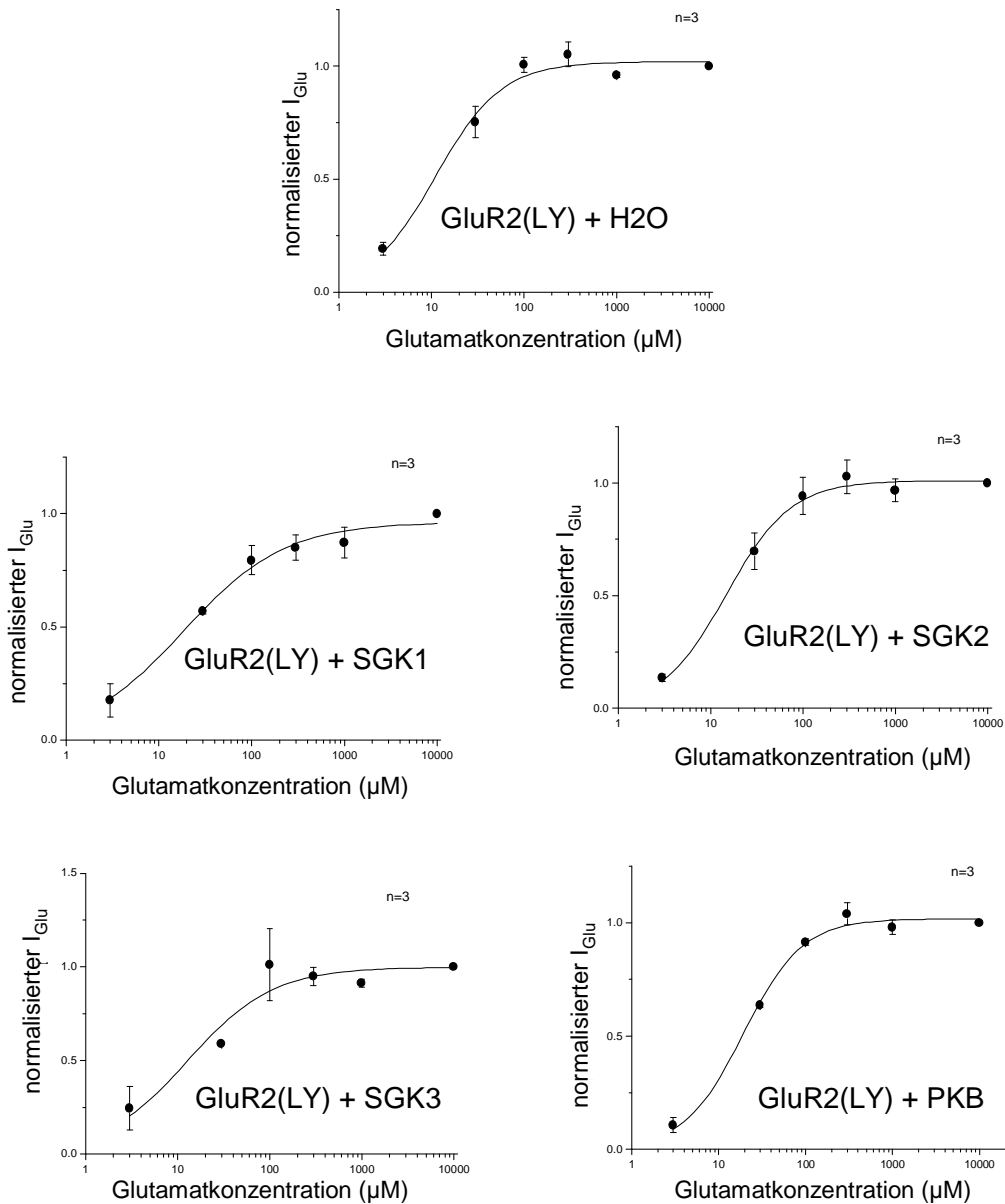


Abbildung 32:

Bestimmung der EC₅₀-Werte für GluR2(LY) injizierte Zellen mit SGK oder PKB. Die Ströme wurden 6 Tage nach Injektion gemessen und es wurden unterschiedliche Konzentrationen von Glutamat und 100 μM Cyclothiazid, als Desensitisierungsinhibitor, appliziert.

Expression	EC ₅₀ Mittelwert
GluR2(LY) + H ₂ O	10,9
GluR2(LY) + SGK1	18,4
GluR2(LY) + SGK2	14,8
GluR2(LY) + SGK3	12,8
GluR2(LY) + PKB	19,1

Tabelle 18: Mittelwert der EC₅₀ für GluR2(LY) und die verschiedenen Kinasen.

3.2.3 Analyse der Ionenselektivität von GluR2(LY) in Abhängigkeit von SGK

Um die Ionenselektivität von GluR2(LY) zu untersuchen, wurden ebenfalls Versuche mit dem Standardprotokoll (Spannungserhöhung von -150 mV bis +50 mV, siehe Abbildung 30) durchgeführt. GluR2(LY) cRNA wurde mit SGK1, SGK2, SGK3 oder PKB cRNA injiziert, um zu testen, ob die Kinasen die Ionenselektivität des Rezeptors beeinflussen. Die Versuche haben gezeigt, dass keine der exprimierten Kinasen die Strom-Spannungs-Kurven signifikant verändern kann (siehe Abbildung 33). Das bedeutet, dass die Ionenselektivität nicht beeinflusst wird.

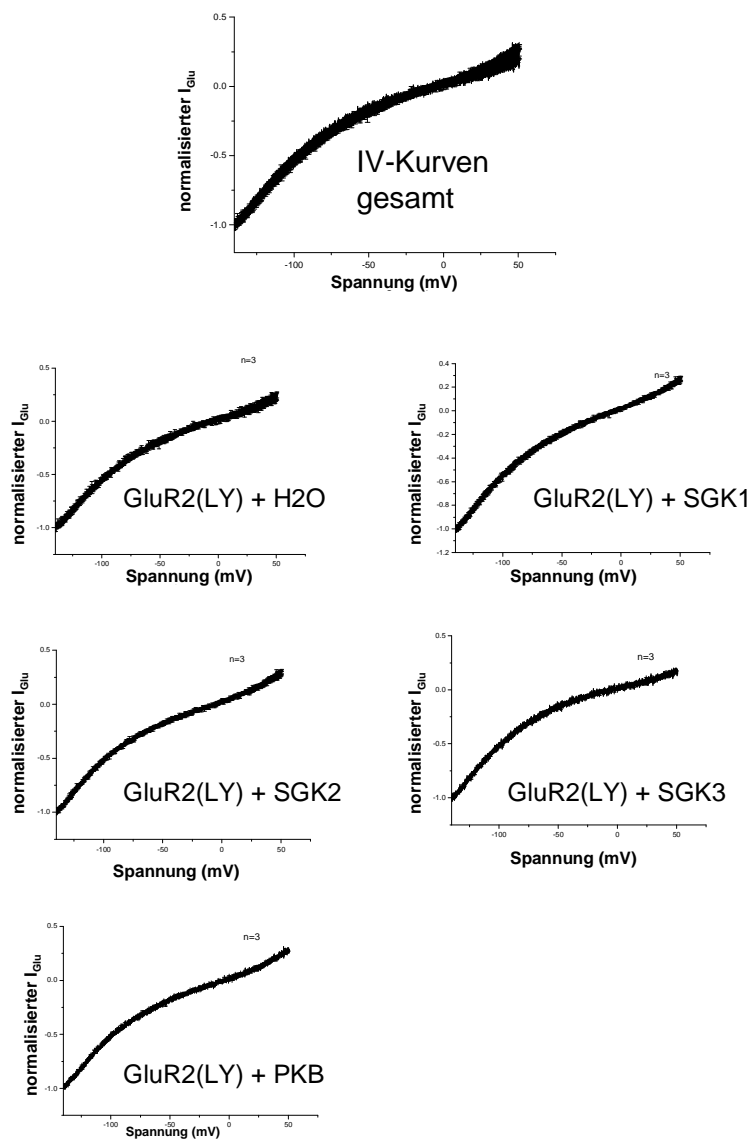


Abbildung 33:

Strom-Spannungs-Kurven für GluR2(LY) mit den verschiedenen Kinasen. Die Ströme wurden in Ca^{2+} -freier Ringerlösung und nach Applikation von 300 μ M Glutamat und 100 μ M Cyclothiazid, als Desensitisierungsinhibitor, gemessen.

3.3 Regulation des GluR3

3.3.1 GluR3 und SGK

GluR3 kann als homomerer und als heteromerer Rezeptorkomplex vorkommen. Als Heteromer kann er in Kombination mit GluR2(R) und seltener mit GluR1 vorkommen^{82,211}. Hier soll nun untersucht werden, ob GluR3 alleine durch die verschiedenen Kinasen reguliert wird und wenn ja, wie.

Hierzu wurde GluR3 cRNA mit DEPC-Wasser, SGK1, SGK2, SGK3 oder PKB cRNA in *Xenopus* Oozyten injiziert. Durch Zugabe von 300 μ M Glutamat und 100 μ M Cyclothiazid, kam es zu einem durch Glutamat-induzierten Einwärtsstrom I_{Glu} . Cyclothiazid blockiert die Desensibilisierung.

Es wurden drei Experimente aus unterschiedlichen Oozyten-Präparationen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 und Tabelle 19 zusammengefaßt. Dabei zeigte sich, dass sowohl SGK1, als auch SGK2 und SGK3 I_{Glu} signifikant erniedrigen. PKB hat keinen signifikanten Einfluss auf den Einwärtsstrom.

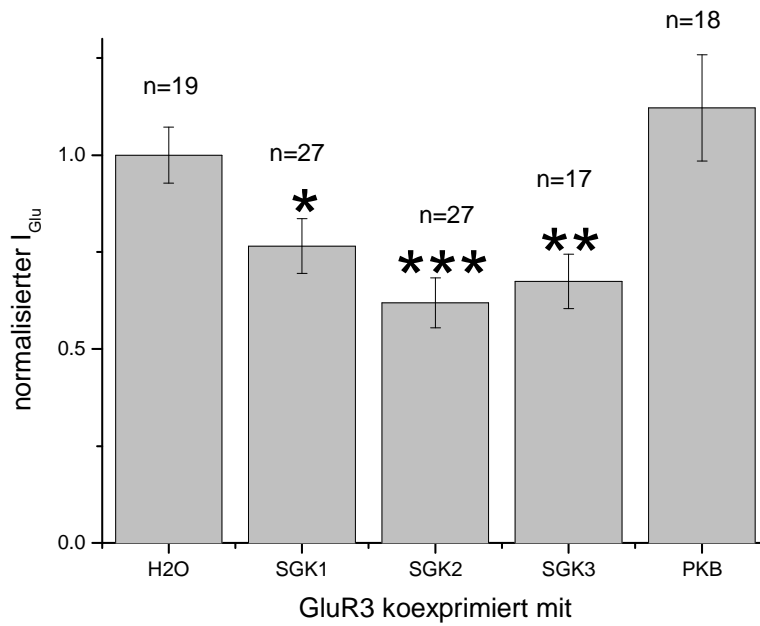


Abbildung 34: GluR3 koexprimiert mit den verschiedenen Kinasen. Die Werte sind auf GluR3 + H₂O normalisiert. Signifikante Ströme ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

Die Ergebnisse aus den drei Experimenten wurden auf GluR3 + H₂O normiert.

Expression	Arithmetisches Mittel + Standardfehler	n
GluR3 + H ₂ O	1,0 ± 0,07	19
GluR3 + SGK1	0,77 ± 0,07	27
GluR3 + SGK2	0,62 ± 0,06	27
GluR3 + SGK3	0,67 ± 0,07	17
GluR3 + PKB	1,12 ± 0,14	18

Tabelle 19: Arithmetisches Mittel und Standardfehler bei Koexpression von GluR3 mit den verschiedenen Kinasen.

3.3.2 Bestimmung der Agonistensensitivität von GluR3 in Abhängigkeit von SGK

Um die apparente Agonistenaffinität des GluR3-Rezeptors zu untersuchen, wurde GluR3 cRNA mit SGK1, SGK2, SGK3 oder PKB cRNA in Oozyten injiziert und die Glutamat-induzierten Ströme bei 6 unterschiedlichen Konzentrationen von 3 μM bis 1000 μM gemessen. Anschließend wurden die Ergebnisse jeder Zelle gefittet und der Mittelwert und der Standardfehler bestimmt. Da sich bei den ermittelten EC_{50} -Werten zwischen den einzelnen Kinasen keine signifikanten Unterschiede zeigten, wie in Abbildung 35 und Tabelle 20 dargestellt, bedeutet das, dass die Kinasen den EC_{50} -Wert von GluR3 nicht beeinflussen.

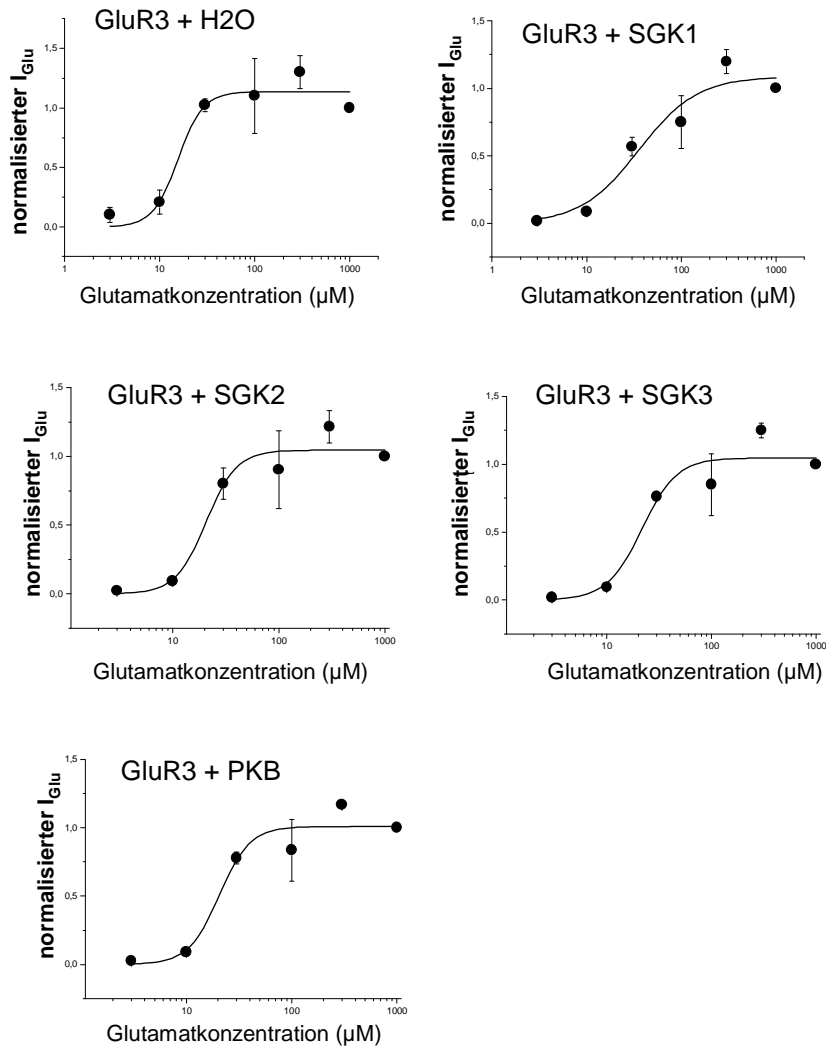


Abbildung 35: Bestimmung der EC₅₀-Werte für GluR3 injizierte Zellen mit SGK oder PKB. Pro Gruppe wurden 5 Zellen gemessen.

Expression	EC ₅₀ Mittelwert
GluR3 + H ₂ O	15,6
GluR3 + SGK1	35,6
GluR3 + SGK2	20,7
GluR3 + SGK3	21,6
GluR3 + PKB	20,5

Tabelle 20: Mittelwert der EC₅₀-Werte für GluR3 und die verschiedenen Kinasen.

3.3.3 Analyse der Ionenselektivität von GluR3 in Abhängigkeit von SGK

Um zu überprüfen, ob die verschiedenen Kinasen die Ionenselektivität des GluR3-Rezeptors beeinflussen, wurden die Strom-Spannungs-Kurven der unterschiedlichen Injektionen untersucht. Dazu wurde GluR3 mit SGK1, SGK2, SGK3 oder PKB koexprimiert und die glutamataktivierten Ströme gemessen. Die Ergebnisse, dargestellt in Abbildung 36, zeigen, dass die Kinasen keinen signifikanten Einfluss auf die Ionenselektivität des GluR3-Rezeptors haben.

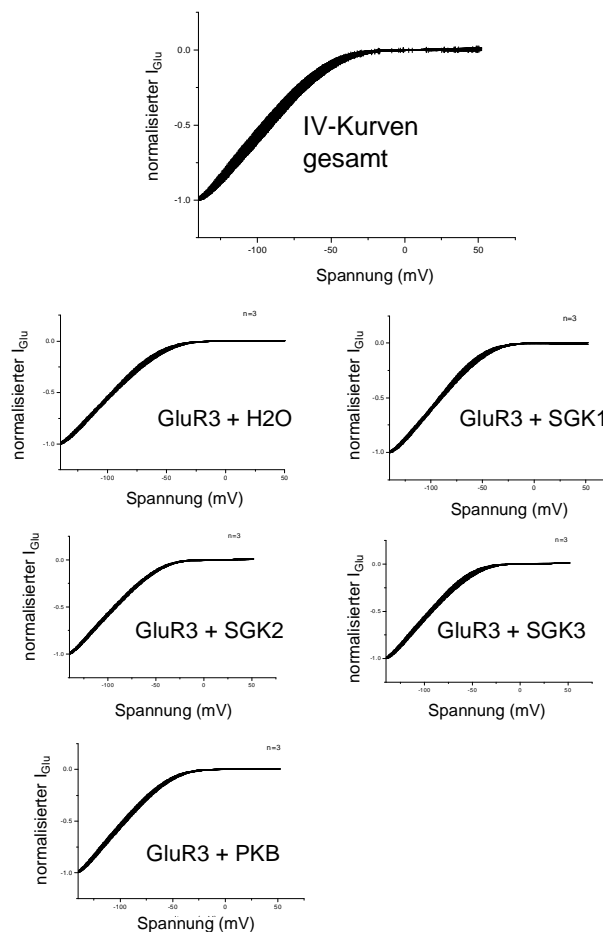


Abbildung 36: Strom-Spannungs-Kurven von GluR3 mit den verschiedenen Kinasen. Pro Gruppe wurden 3 Zellen gemessen. Es wurde 300 μM Glutamat und 100 μM Cyclothiazid, als Desensitierungsinhibitor, appliziert.

3.4 Regulation des GluR4

3.4.1 GluR4 und SGK

Wie bereits in Kapitel 1.2.3 erwähnt, existieren durch alternatives Spleißen von jedem AMPA-Rezeptor zwei verschiedene Formen, die flip- und flop-Varianten. Sie entstehen durch alternatives Spleißen in der extrazellulären Schleife vor der TMD C¹⁷⁷. Sie unterscheiden sich dadurch, wie wirksam Glutamat in der Lage ist, den Rezeptor zu aktivieren. Flip-Varianten sind effektiver als flop-Varianten. Außerdem kann der Desensitisierungsinhibitor Cyclothiazid die Glutamat-induzierten Stromantworten bei flip-Varianten bis zu 100-fach potenzieren.

GluR4c entsteht durch alternatives Spleißen. Es enthält ein Stopcodon, welches zu einem kurzen C-Terminus führt. Außerdem wird es im menschlichen Gehirn im Cerebellum und im cerebralen Cortex exprimiert⁹⁸.

Zur Untersuchung der Regulation von GluR4 durch die verschiedenen Isoformen der SGK, wurde GluR4c-flop cRNA verwendet. Sie wurde zusammen mit SGK1, SGK2, SGK3 oder PKB cRNA in Oozyten injiziert. Durch die Zugabe von 300 µM Glutamat und 100 µM Cyclothiazid kam es zu einem durch Glutamat-induzierten Einwärtsstrom I_{Glu} . Die Experimente wurden vier Mal wiederholt. Durch die Experimente konnte gezeigt werden, dass keine der Kinasen einen signifikanten Einfluss auf I_{Glu} hat. Der Glutamat-induzierte Einwärtsstrom wird weder vergrößert noch verkleinert (siehe Abbildung 37 und Tabelle 21).

Die Ströme wurden auf die Werte GluR4c-flop + H₂O normalisiert und der Mittelwert und der Standardfehler aufgetragen.

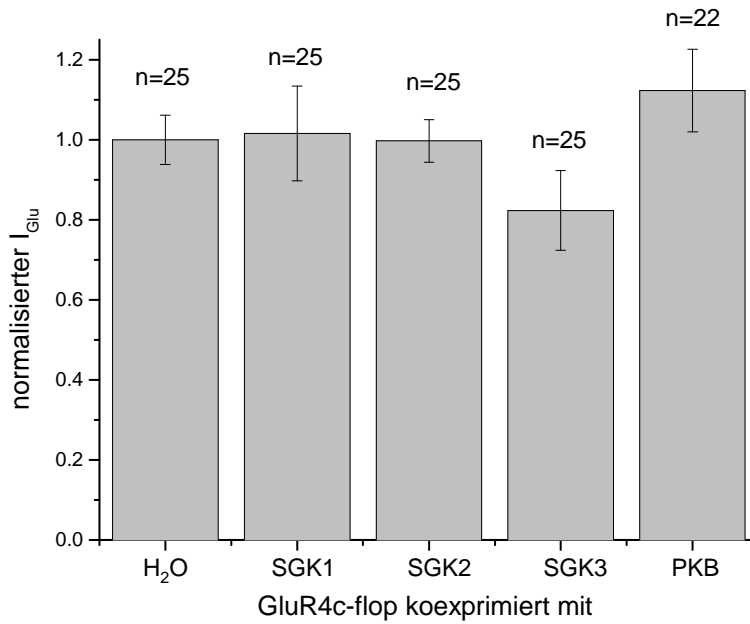


Abbildung 37: Koexpression von GluR4c-flop mit den verschiedenen Kinasen. Es wurde 300 μM Glutamat und 100 μM Cyclothiazid appliziert. Die Anzahl der gemessenen Zellen wird mit n gekennzeichnet.

Expression	Arithmetisches Mittel + Standardfehler	n
GluR4c-flop + H ₂ O	1,0 ± 0,06	25
GluR4c-flop + SGK1	1,01 ± 0,12	25
GluR4c-flop + SGK2	1,0 ± 0,05	25
GluR4c-flop + SGK3	0,82 ± 0,1	25
GluR4c-flop + PKB	1,12 ± 0,1	22

Tabelle 21: Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler bei Expression von GluR4c-flop mit den verschiedenen Kinasen.

3.4.2 Bestimmung der Agonistensensitivität von GluR4c-flop in Abhängigkeit von SGK

GluR4c-flop cRNA wurde mit DEPC-Wasser, SGK1, SGK2, SGK3, oder PKB cRNA zusammen in Oozyten injiziert. Mit Hilfe der voltage-clamp Methode wurde der durch Glutamat-induzierte Einwärtsstrom bei 6 unterschiedlichen Glutamatkonzentrationen von 3 μM bis 1000 mM gemessen. Dabei zeigte sich, dass die verschiedenen Kinasen die Wirksamkeit des Rezeptors für Glutamat nicht signifikant verändern. Der EC_{50} -Wert des GluR4c-flop, dargestellt in Abbildung 38 und Tabelle 22, bleibt also durch die Koexpression von SGK oder PKB unbeeinflusst.

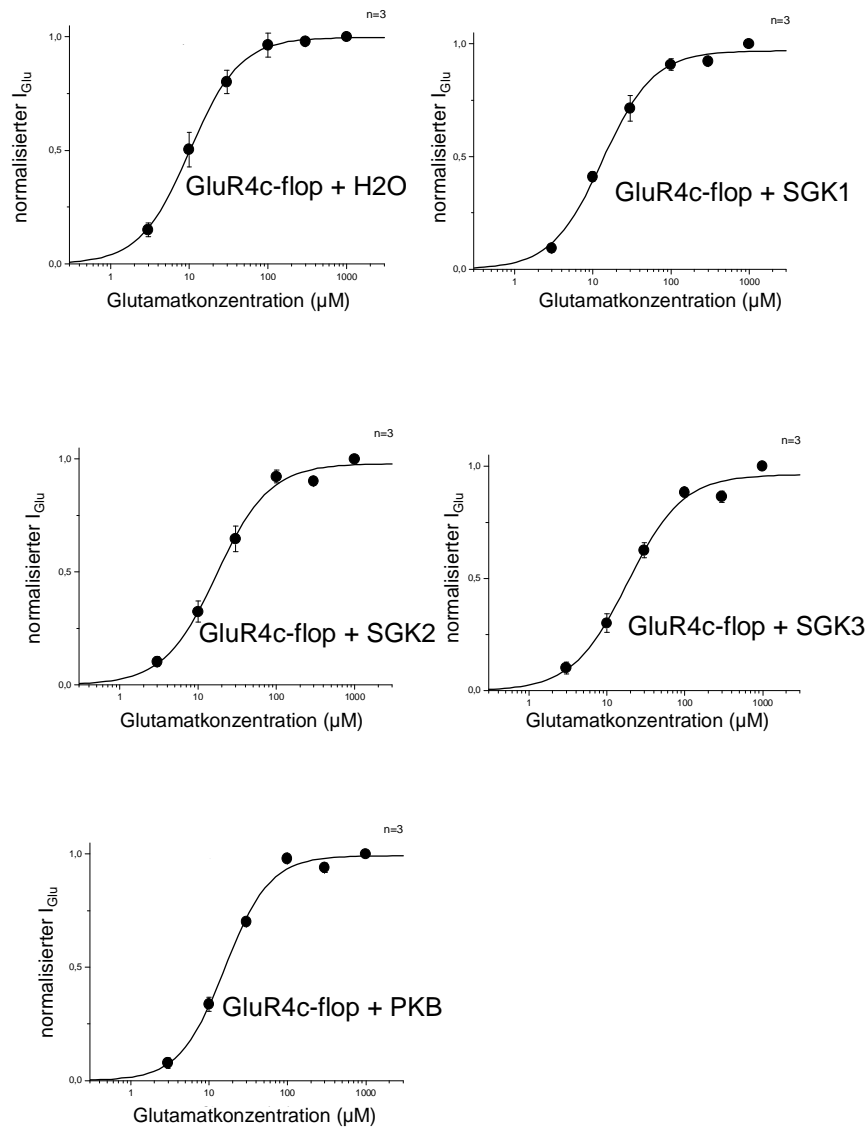


Abbildung 38 : Bestimmung der EC_{50} -Werte für GluR4c-flop injizierte Zellen mit SGK oder PKB. Es wurden pro Gruppe 3 Zellen gemessen.

Expression	EC_{50} Mittelwert
GluR4c-flop + H ₂ O	10,2
GluR4c-flop + SGK1	13,4
GluR4c-flop + SGK2	17,3
GluR4c-flop + SGK3	18,3
GluR4c-flop + PKB	15,8

Tabelle 22: Mittelwert für EC_{50} von GluR4c-flop mit den verschiedenen Kinasen.

3.4.3 Analyse der Ionenselektivität von GluR4c-flop in Abhängigkeit von SGK

Um die Strom-Spannungs-Beziehung (I/V) der mit GluR4c-flop injizierten Zellen zu untersuchen, wurde GluR4c-flop cRNA mit der cRNA der verschiedenen Kinasen in Oozyten injiziert und die durch Glutamat-induzierten Einwärtsströme bei einer Standard „Rampe“ von -150 mV bis +50 mV gemessen. Die Ergebnisse, die in Abbildung 39 dargestellt sind, zeigen, dass die verschiedenen Kinasen die Ionenselektivität bei Koexpression mit GluR4c-flop nicht signifikant verändern.

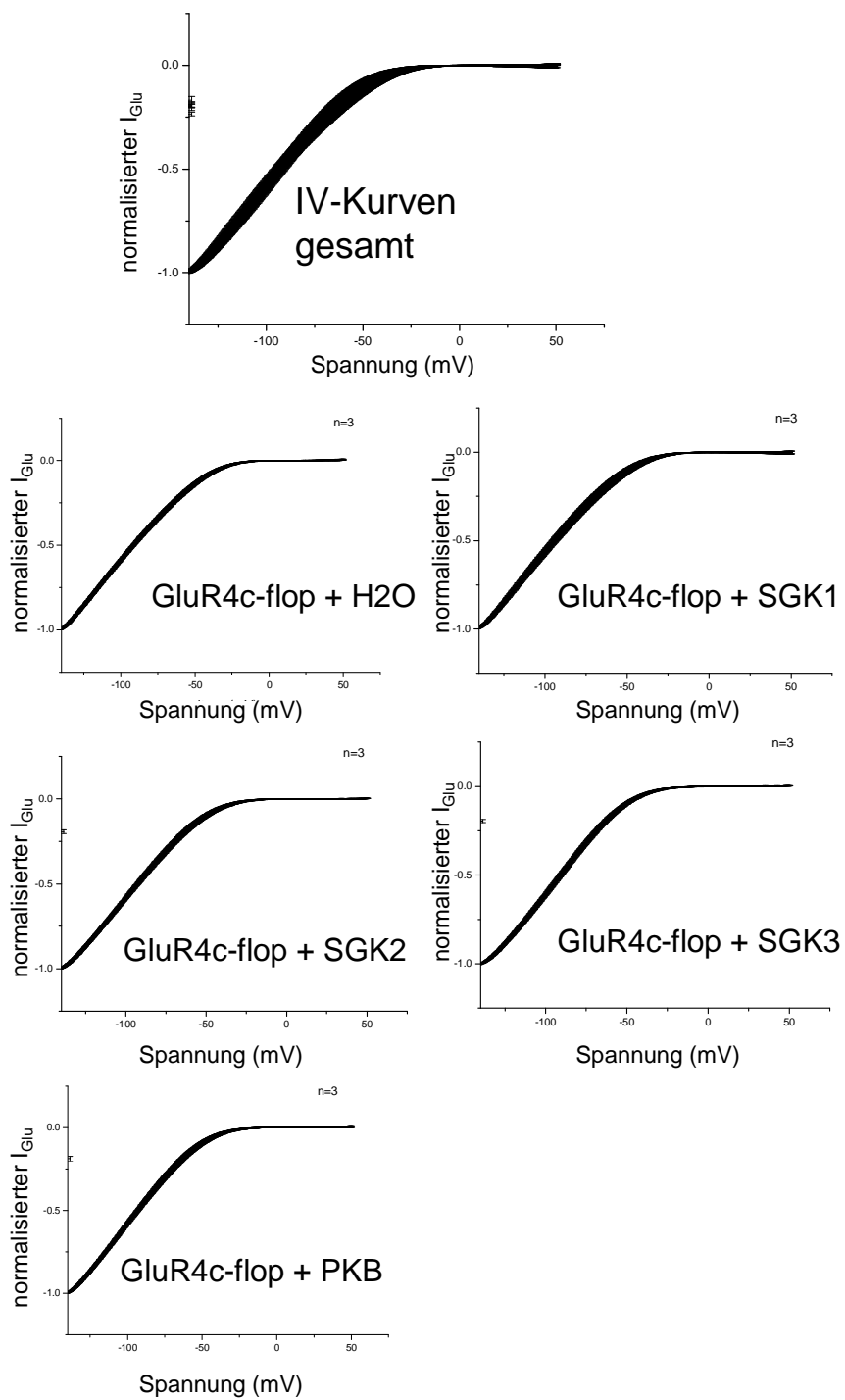


Abbildung 39: Strom-Spannungs-Kurven von GluR4c-flop mit den verschiedenen Kinasen. Die Messung wurde in Mg^{2+} -Ringer durchgeführt und n=3 für jede Gruppe.

4. Diskussion und Interpretation

4.1 Fehlerdiskussion

4.1.1 Oozyten als Expressionssystem

Wie in dieser Arbeit werden zahlreiche andere elektrophysiologische Studien von Transportern und Ionenkanälen in *Xenopus laevis* Oozyten durchgeführt. Allerdings können endogene *Xenopus* Proteine, die selbst als Ionenkanal oder Transporter fungieren, die Ergebnisse verfälschen, oder die endogenen Proteine können die heterolog exprimierten Proteine beeinflussen und so eine Fehlerquelle darstellen.

Aber da die Menge an endogen exprimiertem Protein in *Xenopus laevis* Oozyten im Vergleich zu heterolog exprimiertem Protein relativ gering ist, hängen die Messergebnisse fast ausschließlich von den heterolog injizierten Proteinen ab⁵⁰. Trotzdem ist es möglich, dass es zwischen mammalen Zellen und *Xenopus* Oozyten Unterschiede bezüglich der posttranslationalen Modifikation gibt¹⁷⁹. Allerdings können Ergebnisse, die durch Messungen an Oozyten entstanden sind nicht zu 100% auf mammale Zellen übertragen werden, da sich die intrazellulären Signalwege in den unterschiedlichen Systemen unterscheiden können.

Außerdem ist es wichtig zu beachten, dass Oozyten eine Bipolarität durch die zwei Hemisphären besitzen und sich in der vegetativen Hemisphäre sowohl ein Grossteil der RNA der Oozyte befindet, als auch dort die Membranmobilität größer ist⁵⁰.

Auch die Verteilung von membranständigen Transportern, Kanälen und Rezeptoren ist in beiden Hemisphären unterschiedlich¹⁵.

Bis heute ist auch unklar, ob der Ort der Injektion von RNA einen Einfluss auf die Expressionsrate hat und wenn ja, welchen^{15,179}. Möglicherweise werden die Proteine je nach Injektionsort mehr oder weniger stark exprimiert. Allerdings wurde der Injektionsort für diese Experimente rein zufällig gewählt, da bei der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp Methode die

Ströme über der gesamten Membran und nicht von einem einzelnen Areal gemessen werden^{15,50}.

Das Expressionssystem mit Oozyten weist aber auch einige Vorteile auf. Die Frösche lassen sich mit wenig Aufwand halten und der Umgang mit den Oozyten ist relativ einfach. Außerdem lassen sich die Experimente an den Oozyten leicht wiederholen. Durch Injektion von heterologer RNA sind die zu exprimierenden Proteine in so hoher Konzentration vorhanden, dass endogene Transportphänomene in den Hintergrund treten, und somit eine klare Trennung zwischen endo- und exogenen Transport besteht.

Alles in allem ist das *Xenopus laevis* Oozytenexpressionssystem ein etabliertes Verfahren zur Untersuchung von Transportvorgängen. Es ist für die Expression der AMPA-Rezeptoren und deren elektrophysiologischen Untersuchung nahezu ideal geeignet.

4.1.2 Oozyten und cRNA

Hinsichtlich ihrer Qualität weisen die Oozyten große Unterschiede auf. Die Oozyten wurden während der Oozytenpräparation, der cRNA Injektion und während der Expressionzeit genau bezüglich ihrer Reife und des Vitalitätszustandes beobachtet und gegebenenfalls geschädigte Oozyten entfernt. Während der 5-7 Tage dauernden Expressionszeit, wurden ca. 20% der cRNA-injizierten Oozyten durch latente Membranschäden so geschädigt, dass sie zur Messung nicht mehr geeignet waren und deshalb aussortiert wurden. Die Größe des Ruhemembranpotentials und des basalen Leckstroms lag dann nicht im tolerierbaren Bereich.

Wichtig für die Qualität der Oozyten war auch der Präparationsvorgang. Die Verdauung der Kollagenase führte häufig zu Alterationen der Zellmembran. Außerdem haben die Raumtemperatur, die Qualität der Aufbewahrungslösung und der Zustand des Frosches einen wichtigen Einfluss auf die Qualität der Oozyten. Durch das konsequente Beobachten und Aussortieren von beschädigten Oozyten, wurden die Schwankungen der Oozytenqualität maximal klein gehalten. Zellen mit niedrigem

Ruhemembranpotential und hohem basalem Leckstrom wurden nicht gemessen. Außerdem wurden die verschiedenen Experimente mit Oozyten unterschiedlicher Frösche wiederholt, um Fehler durch unterschiedliche Zustände der Frösche und damit der Oozyten zu minimieren.

Eine weitere potentielle Fehlerquelle stellt die cRNA-Injektion dar. Geringe Schwankungen der Konzentration der cRNA entstehen synthesebedingt. Außerdem wurde die Stammlösung der cRNA bei -70°C aufbewahrt und bei Bedarf aufgetaut und zur richtigen Konzentration verdünnt. Um die richtigen Verdünnungen zu erhalten, wurde im Mikroliterbereich pipettiert, was zu geringfügigen Pipettierfehlern führen konnte. Selbst am Injektor der zur Injektion verwendet wurde, kann es zu geringfügigen Schwankungen der Injektionsmenge kommen. Durch sorgfältige Bedienung wurde eine Minimierung dieser Fehler erreicht.

Trotz dieser Maßnahmen kam es jedoch zu Schwankungen im Expressionsniveau der AMPA-Rezeptoren, die sich in zum Teil unterschiedlich großen I_{Glu} -Werten bei gleicher Glutamatkonzentration der AMPA-Rezeptoren + DEPC Wasser injizierten Zellen zeigten. Allerdings mussten keine statistischen oder anderen Maßnahmen eingesetzt werden um diese Schwankungen zu eliminieren, da sie so akzeptabel und damit vernachlässigbar waren.

4.1.3 Lösungen

Die verwendeten Lösungen wurden meist als Stammlösungen vorbereitet und bei Bedarf auf die richtige Konzentration verdünnt. Dabei wurde auf Genauigkeit geachtet und auch der pH-Wert und die Gesamtosmolarität wurden stets überprüft. Außerdem wurden Lösungen, die trüb oder verunreinigt waren, ausgetauscht.

Um Einflüsse von Licht und Temperatur auf den Zustand der Lösungen gering zu halten, wurden die Lösungen immer im Kühl- oder Gefrierschrank aufbewahrt und in regelmäßigen Abständen neu angesetzt.

4.1.4 Geräte

Es musste darauf geachtet werden, dass die Perfusionanlage sauber war, um eine Kontamination mit Pilzen oder anderen Keimen während der Messung zu verhindern. Es war auch wichtig darauf zu achten, dass in der Messkammer immer eine kontinuierliche Durchflussrate herrschte, da Veränderungen des Substratflusses durch Strömungserscheinungen zu Bewegungen der Oozyte und somit zu möglichen Beschädigungen der Oozytenmembran durch die eingestochene Glaskapillare führen konnten. Die Messelektroden wurden vor Gebrauch neu chloriert und in die Glaskapillaren eingebracht. Ein Verstopfen oder Abbrechen der Glaskapillare konnte die Messwerte verfälschen, daher wurden die Kapillaren vor dem Einstechen in die Zelle optisch inspiziert und zudem der Elektrodenwiderstand überprüft. Elektroden mit Werten über 1,5 M Ω und unter 0,5 M Ω wurden ausgetauscht.

4.2 Regulation des GluR1(L479Y)

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen neuen Mechanismus der GluR1(L479Y) Regulation. Wie zuvor dargestellt, wird durch Koexpression von GluR1(L479Y) und SGK3 der durch Glutamat-induzierte Einwärtsstrom erhöht. Interessanterweise ist SGK3 in der Lage I_{Glu} stärker zu erhöhen als SGK1 und SGK2, obwohl die Aminosäuresequenz zu 80% identisch ist. Die Regulation von GluR1(L479Y) durch SGK3 erfolgt vermutlich indirekt, da GluR1(L479Y) keine Phosphorylierungssequenz für SGK3 besitzt.

Die Proteinphosphorylierung spielt eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der AMPA-Rezeptor Expression in Synapsen und in der Regulation der synaptischen Stärke^{176,2}. Der Signalweg zur Regulation des AMPA-Rezeptor Traffickings beinhaltet die PI3-Kinase¹⁵⁷. Weitere „Ziele“ der PI3-Kinase sind unter anderem die Phosphoinositol-abhängigen Kinasen PDK1 und PDK2, die Proteinkinase A und die Serum- und Glukokortikoid – abhängige Kinasen SGK1, SGK2 und SGK3.

Da es weder zu einer Änderung der Ionenselektivität noch zu einer Änderung der Agonistenwirksamkeit kommt, ist die Zunahme des Stroms nicht auf eine funktionelle Veränderung zurückzuführen. Es ist daher wahrscheinlich, dass der größere Einwärtsstrom durch einen vermehrten Einbau der AMPA-Rezeptoren in die Plasmamembran zustande kommt.

Durch Versuche mit den konstitutiv aktiven Mutanten von SGK1, SGK3 und PKB wurde gezeigt, dass der beobachtete Effekt von SGK3 auf GluR1(L479Y) nicht von den unterschiedlichen Aktivitäten der Kinasen abhängt. Der Effekt von SGK1, SGK2 und SGK3 auf den epithelialen Na⁺-Kanal ENaC ist ähnlich^{110,158,195}, was darauf hinweist, dass der fehlende Effekt von SGK1 auf GluR1(L479Y) nicht durch die Inaktivität der Kinase in den Oozyten zustande kommt. Leider ist es jedoch nicht möglich diese Ergebnisse direkt auf die Verhältnisse in Neuronen zu übertragen, da sich die Dichte und die Aktivität der Kinasen in Oozyten von denen in Neuronen unterscheiden könnten.

Die Abgabe von GluR1(L479Y) an die neuronale Oberfläche wird durch die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren reguliert¹⁵⁷, was über folgenden Signalweg erfolgen kann: Die Aktivierung eines NMDA-Rezeptors führt zu einem Ca²⁺-Einstrom in die Zelle¹⁷¹, mit anschließender Aktivierung des kleinen G-Protein Ras^{220,47}, welches wiederum eine Signalkaskade auslöst, die die PI3-Kinase, PDK1/PDK2 und SGK3 enthält¹¹⁰. SGK3 erhöht somit die Proteindichte von GluR1(L479Y) in der Zellmembran. SGK3 kann GluR1(L479Y) in der Membran stabilisieren und somit seine Bereitstellung und den folgenden Abbau verhindern und/oder das Trafficking von GluR1(L479Y) zur Zellmembran erhöhen. Die Abnahme von GluR1(L479Y) im Gewebe von SGK3^{-/-} Mäusen deutet auf eine niedrigere Expression oder erhöhten Abbau des GluR1(L479Y) Proteins hin. Offensichtlich verhindert das Fehlen von SGK3 nicht das Trafficking von GluR1(L479Y) zur Zellmembran, was auf weitere parallele Mechanismen hinweist, die sich gleicher oder ähnlicher Funktionen wie die Calmodulin-abhängige Kinase II und die Proteinkinase A bedienen^{171,61}. Allerdings deuten die

gezeigten Beobachtungen stark darauf hin, dass SGK3 wesentlich zur Feinabstimmung der GluR1(L479Y)-Dichte in der Zellmembran beiträgt. Somit ist anzunehmen, dass SGK3 an der GluR1(L479Y)-abhängigen neuronalen Funktion beteiligt ist. GluR1(L479Y) wird für die Langzeitpotenzierung in CA1-Neuronen des Hippokampus benötigt²²¹. Er ist an der Bildung des räumlichen Gedächtnisses beteiligt^{161,161,117} und wird mit Depression in Verbindung gebracht¹³⁵.

Das Fehlen von SGK3 führt nicht zum gleichen Phänotyp wie das Fehlen von GluR1(L479Y). Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei GluR1(L479Y)^{-/-} Mäusen, die sich als hyperaktiv erweisen^{12,44}, zeigen die SGK3^{-/-} Mäuse eine Reduktion der Bewegungsaktivität in einigen Umgebungen¹¹³. Ähnlich zu den GluR1(L479Y)^{-/-} Mäusen, die ängstlicher sind als ihre Wildtypkontrollen¹², verhalten sich auch die SGK3^{-/-} Mäuse in einem offenen Gebiet ängstlicher als ihre Wildtyp-Geschwister. In GluR1(L479Y) knock-out Mäusen sind die synaptischen AMPA-Rezeptorströme unverändert, aber extrasynaptische Ströme, die durch AMPA-Rezeptoren evoziert werden, sind reduziert²²¹. Da das Fehlen von SGK3 in SGK3 knock-out Mäusen nicht zu einem offensichtlichen Phänotyp führt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Regulierung des GluR1(L479Y) Trafficking in SGK3^{-/-} Mäusen nicht durch andere AMPA-Rezeptoren kompensiert werden kann. Es ist nicht möglich, die verschiedenen AMPA-Rezeptoruntereinheiten zu unterscheiden, wenn man AMPA-Rezeptor evozierte Ströme aufzeichnet. Auch können zusätzlich andere Moleküle als SGK den GluR1(L479Y) Rezeptor modulieren, z.B. durch Erhöhung der Leitfähigkeit, die die reduzierte Oberflächenexpression kompensieren kann und somit keine Unterschiede in der aufgezeichneten Stromamplituden entstehen. Das gleiche gilt für die extrasynaptischen Untereinheiten: Andere vorgeschaltete Moleküle könnten die fehlende Modulation durch SGK3 kompensieren.

Die Experimente mit Stargazin haben den stimulierenden Effekt von Stargazin auf die GluR1(L479Y) Expression gezeigt³². Zwei Tage nach

Injektion konnte eine erhöhte Proteindichte von GluR1(L479Y) in der Membran nachgewiesen werden. Außerdem wird nicht nur GluR1(L479Y), sondern auch GluR2(LY) und GluR4 durch Stargazin hochreguliert³¹. Die erhöhten Ströme 6 Tage nach der cRNA-Injektion in Oozyten, die Stargazin koexprimieren, können allerdings nicht durch eine erhöhte Proteindichte erklärt werden, sondern deuten auf veränderte Kanaleigenschaften von GluR1(L479Y) hin. Die zeit- und konzentrationsabhängige Regulation der GluR1(L479Y) Expression und Funktion durch Stargazin konnte kürzlich bereits von Priel et al. in HEK293 Zellen gezeigt werden¹⁶⁰. In diesen Zellen führt die Koexpression von Stargazin zu einer Verlangsamung der Rezeptor Desensibilisierung und zu einer verlangsamten Deaktivierung¹⁶⁰. Zwei Tage nach Injektion von GluR1(L479Y) und Stargazin in Oozyten, konnte von Priel et al. (2005) eine erhöhte Membrandichte von GluR1(L479Y) nachgewiesen werden, was durch die Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigt wird. Weiterhin wurde eine zeitabhängige Regulation der Membrandichte von GluR1(L479Y) durch Stargazin beobachtet. Auch für SGK3 wurde eine Abhängigkeit von der Zeit für die Einbringung von GluR1(L479Y) in die Plasmamembran festgestellt. Allerdings war im Gegensatz zu Stargazin, die Insertion von GluR1(L479Y) in die Membran, welche durch SGK3 stimuliert wird, zwei Tage nach Injektion der RNA gering, im Vergleich zu sechs Tage nach der Injektion. SGK3 reguliert auch andere Kanäle und Transporter zwei Tage nach der Injektion hoch. Für ENaC konnte gezeigt werden, dass SGK1 die Degeneration der Plasmamembranproteine inhibiert, indem es die Ubiquitinligase Nedd4.2 inhibiert. Nedd4.2 markiert Plasmaproteine für die Proteolyse indem es das Protein mit Ubiquitin verknüpft. Polyubiquitinierte Proteine werden abgebaut, wohingegen oligo-ubiquitinierte Proteine häufig recycelt werden. Zwei Tage nach der Expression von GluR1(L479Y) ist möglicherweise die Proteolyse der Plasmaproteine noch nicht so ausgeprägt, wie sechs Tage nach Expression, wenn mehr polyubiquitinierte Proteine abgebaut sind. Wenn SGK3 also ebenfalls über einen ähnlichen Mechanismus, wie er für SGK1 gezeigt wurde, den Abbau

der Proteine hemmt, würde man zwei Tage nach Expression keinen Effekt von SGK3 auf die Ströme oder die Membrandicht von GluR1(L479Y) erwarten. Genau das wurde durch die oben gezeigten Experimente bestätigt. Obwohl beide, SGK3 und Stargazin die GluR1(L479Y) Aktivität hochregulieren, ein Effekt, der zumindest teilweise darauf beruht, die Proteindichte in der Plasmamembran zu erhöhen, sind beide scheinbar nicht Teil der gleichen Signalkaskade. Folglich sind die Effekte der Koexpression von Stargazin und SGK3 auf die Aktivität von GluR1(L479Y) additiv und nicht synergistisch. Darüber hinaus führt das Ersetzen von Serin in der einzigen SGK-Konsensus-Sequenz von Stargazin nicht zu einem Verlust des stimulierenden Effekts von Stargazin auf GluR1(L479Y) und stört auch nicht den stimulierenden Effekt der koexprimierten SGK3. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Stargazin durch die Phosphorylierung durch die Proteinkinase A reguliert wird³⁷. Dennoch ist es offensichtlich kein direktes Ziel der SGK's und sein Effekt auf GluR1(L479Y) scheint nicht SGK3-abhängig zu sein.

Zusammengefasst sind beide, SGK3 und Stargazin, in der Lage die GluR1(L479Y) Rezeptordichte und -aktivität in der Zellmembran zu erhöhen. Jedoch benutzen beide unterschiedliche Mechanismen. Auch wenn Stargazin eine putative SGK-Phosphorylierungsstelle enthält, ist diese für den Effekt von SGK3 auf GluR1(L479Y) nicht verantwortlich. Stattdessen üben SGK3 und Stargazin ihre Effekte unabhängig voneinander aus, und das wiederum potenziert beide in der Regulation von GluR1(L479Y).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Exozytose von KCNQ1 Proteinen RAB11 abhängig ist, während die Endozytose RAB5 abhängig ist¹⁷⁰. Außerdem wird die RAB-abhängige Exozytose durch SGK1 erhöht und erfordert die Phosphorylierung und Aktivierung von PIKfyve und die Bildung von PI(3,5)P₂¹⁷⁰. Das bedeutet, dass PIKfyve RAB11-abhängiges Recycling reguliert. Zusätzlich gibt es Experimente, die zeigen, dass RAB11 GluR1(L479Y) Trafficking in Neuronen stimuliert¹²². Weitere

Untersuchungen müssen nun zeigen, ob die Regulation von GluR1(L479Y) durch SGK3 über einen ähnlichen Mechanismus wie oben beschrieben funktioniert.

4.3 Regulation des GluR2(LY)

Die Ergebnisse der Experimente mit GluR2(LY) zeigen eine Regulation von GluR2(LY) durch SGK1, SGK3 und PKB. Alle drei Kinasen reduzieren den Glutamat-induzierten Einwärtsstrom.

Wenn GluR2(LY) allerdings mit GluR1(L479Y) zusammen koexprimiert wird, werden die Ströme durch SGK1 und SGK3 hochreguliert. GluR1(L479Y) wirkt demnach dominant in dem heteromeren Komplex. Das bedeutet, dass die Regulation der AMPA-Rezeptoren durch die SGK nicht nur von der jeweiligen Untereinheit abhängt, sondern auch in welcher Form die Rezeptoren koexprimiert werden.

Die Regulation der AMPA-Rezeptoren durch die SGK scheint auch von der Edierung des Rezeptors abzuhängen. Wenn GluR2(Q), also die nicht-edierte Form von GluR2, mit GluR1(L479Y) zusammen exprimiert wird, übt keine der Kinasen einen regulatorischen Effekt auf den heteromeren Komplex aus. Durch den Austausch der Aminosäure Glutamin durch Arginin an der Q/R-Edierposition, kommt es zu Änderungen in der Funktion und der elektrophysiologischen Eigenschaften, wie z.B. der Strom-Spannungskurve und der Kalziumpermeabilität^{192,81}.

Die Veränderung von GluR2 durch RNA-Edierung ist ein biologisch entscheidender Vorgang für das neuronale Überleben und dessen Fehlen die direkte Ursache für neuronalen Tod bedeutet¹⁰⁸. Die merkliche Reduktion der RNA-Edierung in Motoneuronen bei Amyotropher Lateralsklerose (ALS) könnte die direkte Ursache des selektiven Untergangs von Motorneuronen sein, wie er bei der ALS beobachtet wird.

Einige Studien haben bereits gezeigt, dass die verschiedenen homomeren und heteromeren Komplexe an verschiedenen Lokalisationen in der Zelle vorkommen, also dass die verschiedenen Untereinheiten der AMPA-

Rezeptoren z.B. im Zellkörper, im Axon oder den Dendriten mit unterschiedlicher Häufigkeit vertreten sind^{150,211,100}. Die unterschiedliche Regulation durch die SGK könnte die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der heteromeren oder homomeren Komplexe beeinflussen.

Da durch die Experimente mit GluR2(LY) und den verschiedenen Kinasen gezeigt wurde, dass sich weder die Ionenselektivität noch die Agonistenwirksamkeit des Rezeptors geändert hat, ist eine funktionelle Veränderung des Rezeptors weitgehend ausgeschlossen. Es ist eher wahrscheinlich, dass die Abnahme der Ströme durch einen verminderten Einbau der Rezeptoren in die Membran zustande kommt.

4.4 Regulation des GluR3

Die Ergebnisse deuten auf einen neuartigen Mechanismus der Regulation des GluR3 Rezeptors hin. Wie bei GluR2(LY) wird der Glutamat-induzierte Einwärtsstrom durch die Kinasen erniedrigt. Allerdings wird GluR3 durch alle drei Kinasen, SGK1, SGK2 und SGK3, herunterreguliert.

Bei der Koexpression von GluR1(L479Y) mit GluR3 zeigt sich durch SGK3 keine Veränderung des Stroms. Das bedeutet, wenn die beiden Untereinheiten miteinander koexprimiert werden, wird die Regulation von GluR1(L479Y) durch SGK3 aufgehoben. Also zeigt sich auch hier, dass die Zusammensetzung der heteromeren Komplexe Einfluss auf die Regulation durch die SGK hat. Diese unterschiedliche Regulation durch die SGK könnte wie schon bei GluR2(LY) erwähnt, für die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der heteromeren und homomeren Komplexe verantwortlich sein. Es ist somit denkbar, dass die verschiedenen Lokalisationen der homomeren und heteromeren Komplexe der AMPA-Rezeptoren in der Zelle durch SGKs moduliert werden können^{150,211,100}.

Auch bei GluR3 zeigten die Experimente keine funktionelle Veränderung des Rezeptors, da sich nachweislich die apparente Agonistenaffinität und die Ionenselektivität in Abhängigkeit von den Kinasen nicht verändert haben. Auch hier scheint es so zu sein, dass die erniedrigten Ströme durch eine Abnahme der Rezeptordichte in der Membran zustande kommen.

4.5 Regulation des GluR4c-flop

Bei den Experimenten mit GluR4c-flop zeigte sich, dass GluR4c-flop nicht durch eine der Kinasen reguliert wird.

Auch funktionell gesehen haben die Kinasen keinen Einfluss auf die GluR4c-flop Aktivität. Es gibt weder Veränderungen der Ionenselektivität noch der Agonistenwirksamkeit.

4.6 Integrierende Diskussion der Regulation aller AMPA-Rezeptoren

Die dynamische Regulation der AMPA-Rezeptoren an der Synapse spielt eine wichtige Rolle bei Veränderungen der synaptischen Stärke, wie es für die Modelle von Lernen und Gedächtnis und die Langzeitpotenzierung im Hippokampus gezeigt werden konnte. Dabei spielt die Phosphorylierung von Proteinen eine wichtige Rolle^{176,2}. Der Signalweg für die Regulation der AMPA-Rezeptoren enthält die PI3-Kinase¹⁵⁷. Außerdem sind die PDK1, PDK2 die Proteinkinase A, SGK1, SGK2 und SGK3 an diesem Signalweg beteiligt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verschiedenen Isoformen der SGK und PKB die verschiedenen AMPA-Rezeptoren unterschiedlich regulieren, wobei am stärksten GluR1(L479Y) durch SGK3 reguliert wird. Es ist interessant, dass die verschiedenen Isoformen der SGK zwar 80% Übereinstimmung in der katalytischen Sequenz aufweisen aber trotzdem die AMPA-Rezeptoren so unterschiedlich regulieren. Die Wirksamkeit der verschiedenen Kinasen hängt vom entsprechenden Ziel ab. GluR1(L479Y) reagiert am empfindlichsten auf SGK3, wohingegen GluR6 auf SGK1 am empfindlichsten reagiert^{185,186}. Demnach teilen sich die drei verschiedenen Kinasen SGK1, SGK2 und SGK3 die gleichen Ziele, aber offensichtlich dienen sie unterschiedlichen Funktionen. Beide SGK1 und SGK3 werden in allen Geweben exprimiert, die bisher getestet wurden, aber sie unterscheiden sich in ihrer transkriptionellen Regulation. Während SGK1 durch eine hohe Anzahl von Hormonen, Mediatoren und durch zellulären

Stress, wie z.B. ein osmotischer Schock, hochreguliert wird, scheint die SGK3 Transkription unempfindlich gegenüber den meisten dieser Regulatoren zu sein^{62,110}. Beide Kinasen werden durch eine Signalkaskade, die die PI3-Kinase und PDK1 und PDK2 enthält, aktiviert^{102,101}. Somit gibt es eine erhebliche Übereinstimmung, aber gleichzeitig eindeutige Unterschiede in der Funktion und Regulation der beiden Kinasen. Außerdem sind die Phänotypen der SGK1 knock-out Maus²¹⁷ und der SGK3 knock-out Maus¹³⁴ völlig verschieden.

Möglicherweise lassen die Unterschiede in der Aktivierung, Regulation und Funktion der verschiedenen Isoformen der SGK Rückschlüsse auf die unterschiedliche Regulation der AMPA-Rezeptoren durch die SGK zu. Da die verschiedenen Subtypen je nach Expression, als homomere oder heteromere Komplexe, unterschiedlich durch die Kinasen reguliert werden, könnte das wiederum die unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen der AMPA-Rezeptor-Komplexe erklären.

Die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der AMPA-Rezeptoren definiert ihre physiologische Funktion im Organismus und damit sind die verschiedenen AMPA-Rezeptoren auch in die Pathophysiologie zahlreicher unterschiedlicher Erkrankungen involviert. V. a. bei der Pathophysiologie verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen wie z.B. bei der Alzheimer Krankheit, der Parkinson Krankheit oder der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) spielen die AMPA-Rezeptoren eine Rolle.

5. Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit konnten Aufschlüsse über die Rolle der Serum- und Glukokortikoid-induzierten Kinase SGK auf die Regulation der AMPA-Rezeptoren gewonnen werden:

1. GluR1-Ströme werden durch SGK2, SGK3 und Stargazin erhöht.
2. GluR2-Ströme werden durch SGK1, SGK3 und PKB reduziert.
3. GluR3-Ströme werden durch SGK1, SGK2 und SGK3 reduziert.
4. GluR4c-flop-Ströme werden durch keine der Kinasen verändert.
5. Die Ströme des heteromeren Komplexes GluR1 + GluR2(Q) werden nicht durch eine der Isoformen der SGK verändert. Das bedeutet, dass GluR2(Q) den stimulierenden Effekt der SGK2 und SGK3 auf den Strom von GluR1 aufhebt.
6. Die Ströme des heteromeren Komplexes GluR1 + GluR2 werden durch SGK1 und SGK3 erhöht und durch PKB reduziert.
7. Die Ströme des heteromeren Komplexes GluR1 + GluR3 werden nicht durch SGK3 verändert.
8. Bei keinem der untersuchten AMPA-Rezeptoren wurde die Agonistenwirksamkeit oder die Ionenselektivität durch SGK verändert.

Die genaue Funktionsweise der SGK Regulation ist für die verschiedenen AMPA-Rezeptoren unterschiedlich. Die Regulation der AMPA-Rezeptoren erfolgt vermutlich indirekt, da sie keine Phosphorylierungssequenzen für SGK enthalten.

Die Regulation erfolgt nicht durch funktionelle Veränderungen und kommt daher wahrscheinlich durch einen vermehrten oder verminderten Einbau der Rezeptoren in die Membran zustande.

Durch die gezeigte Beteiligung der SGK an der Regulation der AMPA-Rezeptoren, ist auch ein Einfluss der SGK auf die Pathophysiologie zahlreicher neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen wahrscheinlich.

Trotz dieser Ergebnisse bleiben über das genaue Interaktionsmuster von SGK und den AMPA-Rezeptoren viele Fragen offen. Antworten dazu fanden sich nur ansatzweise, wie z.B. dass SGK3 und Stargazin zwar beide GluR1 stimulieren, aber dafür nicht den gleichen Signalweg benutzen, oder wie in anderen Arbeiten gezeigt wurde, dass GluR1 Trafficking RAB11 abhängig ist. Ziel weiterer Arbeiten wird es jetzt sein, diese Interaktionsvorgänge näher zu beleuchten und eventuelle Proteine, die in diese Regulationsvorgänge involviert sind, zu identifizieren und zu charakterisieren.

6. Literatur

6.1 *Publikationsverzeichnis*

- (1) 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 (2005). Regulation of GluR1 abundance in murine hippocampal neurones by serum- and glucocorticoid-inducible kinase 3. *J.Physiol*; 565: 381-390.
- (2) Strutz-Seebohm N, Seebohm G, Korniychuk G, Baltaev R, Ureche O, Striegel M, Lang F (2006). Additive regulation of GluR1 by stargazin and serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoform SGK3. *Pflugers Arch.*; 452: 276-282.

6.2 *Literaturverzeichnis*

1. 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.
2. Ahmadian G, Ju W, Liu L, Wyszynski M, Lee SH, Dunah AW, Taghibiglou C, Wang Y, Lu J, Wong TP, Sheng M, Wang YT (2004). Tyrosine phosphorylation of GluR2 is required for insulin-stimulated AMPA receptor endocytosis and LTD. *EMBO J.*; 23: 1040-1050.
3. Akutsu N, Lin R, Bastien Y, Bestawros A, Enepekides DJ, Black MJ, White JH (2001). Regulation of gene Expression by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and Its analog EB1089 under growth-inhibitory conditions in squamous carcinoma Cells. *Mol.Endocrinol.*; 15: 1127-1139.
4. Alessi DR, Deak M, Casamayor A, Caudwell FB, Morrice N, Norman DG, Gaffney P, Reese CB, MacDougall CN, Harbison D, Ashworth A, Bownes M (1997). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. *Curr.Biol.*; 7: 776-789.
5. Appel SH (1993). Excitotoxic neuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *Trends Neurosci.*; 16: 3-5.
6. Araki K, Meguro H, Kushiya E, Takayama C, Inoue Y, Mishina M (1993). Selective expression of the glutamate receptor channel delta 2 subunit in cerebellar Purkinje cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*; 197: 1267-1276.

7. **Armstrong N, Gouaux E (2000). Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron*; 28: 165-181.**
8. **Armstrong N, Mayer M, Gouaux E (2003). Tuning activation of the AMPA-sensitive GluR2 ion channel by genetic adjustment of agonist-induced conformational changes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 100: 5736-5741.**
9. **Arvola M, Keinanen K (1996). Characterization of the Ligand-binding Domains of Glutamate Receptor (GluR)-B and GluR-D Subunits Expressed in *Escherichia coli* as Periplasmic Proteins. *Journal of Biological Chemistry*; 271: 15527-15532.**
10. **Asher C, Sinha I, Garty H (2003). Characterization of the interactions between Nedd4-2, ENaC, and *sgk-1* using surface plasmon resonance. *Biochim.Biophys.Acta*; 1612: 59-64.**
11. **Ayalon G, Stern-Bach Y (2001). Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron*; 31: 103-113.**
12. **Bannerman DM, Deacon RM, Brady S, Bruce A, Sprengel R, Seeburg PH, Rawlins JN (2004). A comparison of GluR-A-deficient and wild-type mice on a test battery assessing sensorimotor, affective, and cognitive behaviors. *Behav.Neurosci.*; 118: 643-647.**
13. **BelAiba RS, Djordjevic T, Bonello S, Artunc F, Lang F, Hess J, Gorlach A (2006). The serum- and glucocorticoid-inducible kinase *Sgk-1* is involved in pulmonary vascular remodeling: role in redox-sensitive regulation of tissue factor by thrombin. *Circ.Res.*; 98: 828-836.**
14. **Bell LM, Leong ML, Kim B, Wang E, Park J, Hemmings BA, Firestone GL (2000). Hyperosmotic stress stimulates promoter activity and regulates cellular utilization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase (*Sgk*) by a p38 MAPK-dependent pathway. *J.Biol.Chem.*; 275: 25262-25272.**
15. **Berardi S, Hagenbuch B, Carafoli E, Krahenbuhl S (1995). Characterization of the endogenous carnitine transport and expression of a rat renal Na(+)-dependent carnitine transport system in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem.J.*; 309 (Pt 2): 389-393.**
16. **Berwick DC, Dell GC, Welsh GI, Heesom KJ, Hers I, Fletcher LM, Cooke FT, Tavaré JM (2004). Protein kinase B phosphorylation of PIKfyve regulates the trafficking of GLUT4 vesicles. *J.Cell Sci.*; 117: 5985-5993.**

17. Bettler B, Boulter J, Hermans-Borgmeyer I, O'Shea-Greenfield A, Deneris ES, Moll C, Borgmeyer U, Hollmann M, Heinemann S (1990). Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: expression in the nervous system during development. *Neuron*; 5: 583-595.
18. Bhargava A, Fullerton MJ, Myles K, Purdy TM, Funder JW, Pearce D, Cole TJ (2001). The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology*; 142: 1587-1594.
19. Biondi RM, Kieloch A, Currie RA, Deak M, Alessi DR (2001). The PIF-binding pocket in PDK1 is essential for activation of S6K and SGK, but not PKB. *EMBO J.*; 20: 4380-4390.
20. Blaschke M, Keller BU, Rivosecchi R, Hollmann M, Heinemann S, Konnerth A (1993). A single amino acid determines the subunit-specific spider toxin block of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate/kainate receptor channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 90: 6528-6532.
21. Bliss TV, Collingridge GL (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*; 361: 31-39.
22. Bohmer C, Wagner CA, Beck S, Moschen I, Melzig J, Werner A, Lin JT, Lang F, Wehner F (2000). The shrinkage-activated Na(+) conductance of rat hepatocytes and its possible correlation to rENaC. *Cell Physiol Biochem.*; 10: 187-194.
23. Boulter J, Hollmann M, O'Shea-Greenfield A, Hartley M, Deneris E, Maron C, Heinemann S (1990). Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. *Science*; 249: 1033-1037.
24. Bowie D, Mayer ML (1995). Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron*; 15: 453-462.
25. Brackley PT, Bell DR, Choi SK, Nakanishi K, Usherwood PN (1993). Selective antagonism of native and cloned kainate and NMDA receptors by polyamine-containing toxins. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*; 266: 1573-1580.
26. Brennan FE, Fuller PJ (2000). Rapid upregulation of serum and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) gene expression by corticosteroids in vivo. *Mol.Cell Endocrinol.*; 166: 129-136.
27. Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, Greenberg ME (2001). Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the

- forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol.Cell Biol.*; 21: 952-965.
28. Bucci C, Wandinger-Ness A, Lutcke A, Chiariello M, Bruni CB, Zerial M (1994). Rab5a is a common component of the apical and basolateral endocytic machinery in polarized epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 91: 5061-5065.
29. Burgess DL, Davis CF, Gefrides LA, Noebels JL (1999). Identification of three novel Ca(2+) channel gamma subunit genes reveals molecular diversification by tandem and chromosome duplication. *Genome Res.*; 9: 1204-1213.
30. Burnashev N, Schoepfer R, Monyer H, Ruppersberg JP, Gunther W, Seeburg PH, Sakmann B (1992). Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science*; 257: 1415-1419.
31. Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ, Brecht DS, Nicoll RA (2000). Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature*; 408: 936-943.
32. Chen L, El Husseini A, Tomita S, Brecht DS, Nicoll RA (2003). Stargazin differentially controls the trafficking of alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionate and kainate receptors. *Mol.Pharmacol.*; 64: 703-706.
33. Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P, Firestone GL, Verrey F, Pearce D (1999). Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 96: 2514-2519.
34. Chenu C, Serre CM, Raynal C, Burt-Pichat B, Delmas PD (1998). Glutamate receptors are expressed by bone cells and are involved in bone resorption. *Bone*; 22: 295-299.
35. Chetkovich DM, Chen L, Stocker TJ, Nicoll RA, Brecht DS (2002). Phosphorylation of the postsynaptic density-95 (PSD-95)/discs large/zona occludens-1 binding site of stargazin regulates binding to PSD-95 and synaptic targeting of AMPA receptors. *J.Neurosci.*; 22: 5791-5796.
36. Choi DW, Rothman SM (1990). The Role of Glutamate Neurotoxicity in Hypoxic-Ischemic Neuronal Death. *Annual Review of Neuroscience*; 13: 171-182.

37. Choi J, Ko J, Park E, Lee JR, Yoon J, Lim S, Kim E (2002). Phosphorylation of stargazin by protein kinase A regulates its interaction with PSD-95. *J.Biol.Chem.*; 277: 12359-12363.
38. Chu S, Rushdi S, Zumpfe ET, Mamers P, Healy DL, Jobling T, Burger HG, Fuller PJ (2002). FSH-regulated gene expression profiles in ovarian tumours and normal ovaries. *Mol.Hum.Reprod.*; 8: 426-433.
39. Cohen SN, Chang AC, Hsu L (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 69: 2110-2114.
40. Collingridge GL, Lester RA (1989). Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol.Rev.*; 41: 143-210.
41. Collins BJ, Deak M, Arthur JS, Armit LJ, Alessi DR (2003). In vivo role of the PIF-binding docking site of PDK1 defined by knock-in mutation. *EMBO J.*; 22: 4202-4211.
42. Colman A, Bhamra S, Valle G (1984). Post-translational modification of exogenous proteins in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem.Soc.Trans.*; 12: 932-937.
43. Cooper MS, Bujalska I, Rabbitt E, Walker EA, Bland R, Sheppard MC, Hewison M, Stewart PM (2001). Modulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoid inactivation to activation. *J.Bone Miner.Res.*; 16: 1037-1044.
44. Cowen MS, Schroff KC, Gass P, Sprengel R, Spanagel R (2003). Neurobehavioral effects of alcohol in AMPA receptor subunit (GluR1) deficient mice. *Neuropharmacology*; 45: 325-333.
45. Cowling RT, Birnboim HC (2000). Expression of serum- and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) mRNA is up-regulated by GM-CSF and other proinflammatory mediators in human granulocytes. *J.Leukoc.Biol.*; 67: 240-248.
46. Craig AM, Blackstone CD, Haganir RL, Banker G (1993). The distribution of glutamate receptors in cultured rat hippocampal neurons: postsynaptic clustering of AMPA-selective subunits. *Neuron*; 10: 1055-1068.
47. Cullen PJ, Lockyer PJ (2002). Integration of calcium and Ras signalling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*; 3: 339-348.
48. Dai F, Yu L, He H, Zhao Y, Yang J, Zhang X, Zhao S (1999). Cloning and mapping of a novel human serum/glucocorticoid regulated kinase-like gene, SGKL, to chromosome 8q12.3-q13.1. *Genomics*; 62: 95-97.

49. Danbolt NC (1994). The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Prog.Neurobiol.*; 44: 377-396.
50. Dascal N (1987). The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev.Biochem.*; 22: 317-387.
51. Dawid IB, Rebbert ML, Rosa F, Jamrich M, Sargent TD (1988). Gene expression in amphibian embryogenesis. *Cell Differ.Dev.*; 25 Suppl: 67-74.
52. Dawid IB, Sargent TD (1988). *Xenopus laevis* in developmental and molecular biology. *Science*; 240: 1443-1448.
53. Debonneville C, Flores SY, Kamynina E, Plant PJ, Tauxe C, Thomas MA, Munster C, Chraibi A, Pratt JH, Horisberger JD, Pearce D, Loffing J, Staub O (2001). Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. *EMBO J.*; 20: 7052-7059.
54. Delmolino LM, Castellot JJ, Jr. (1997). Heparin suppresses sgk, an early response gene in proliferating vascular smooth muscle cells. *J.Cell Physiol*; 173: 371-379.
55. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol.Rev.*; 51: 7-61.
56. Dingledine R, McBain CJ, McNamara JO (1990). Excitatory amino acid receptors in epilepsy. *Trends Pharmacol.Sci.*; 11: 334-338.
57. Doyle DA, Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998). The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. *Science*; 280: 69-77.
58. Driver PM, Rauz S, Walker EA, Hewison M, Kilby MD, Stewart PM (2003). Characterization of human trophoblast as a mineralocorticoid target tissue. *Mol.Hum.Reprod.*; 9: 793-798.
59. Egebjerg J, Bettler B, Hermans-Borgmeyer I, Heinemann S (1991). Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. *Nature*; 351: 745-748.
60. Embark HM, Bohmer C, Vallon V, Luft F, Lang F (2003). Regulation of KCNE1-dependent K(+) current by the serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) isoforms. *Pflugers Arch.*; 445: 601-606.
61. Esteban JA, Shi SH, Wilson C, Nuriya M, Huganir RL, Malinow R (2003). PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat.Neurosci.*; 6: 136-143.

62. Firestone GL, Giampaolo JR, O'Keeffe BA (2003). Stimulus-dependent regulation of serum and glucocorticoid inducible protein kinase (SGK) transcription, subcellular localization and enzymatic activity. *Cell Physiol Biochem.*; 13: 1-12.
63. Fonnum F (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J.Neurochem.*; 42: 1-11.
64. Fonnum F (1993). Regulation of the synthesis of the transmitter glutamate pool. *Prog.Biophys.Mol.Biol.*; 60: 47-57.
65. Frodin M, Antal TL, Dummler BA, Jensen CJ, Deak M, Gammeltoft S, Biondi RM (2002). A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *EMBO J.*; 21: 5396-5407.
66. Gao J, Cohen IS, Mathias RT, Baldo GJ (1994). Regulation of the beta-stimulation of the Na(+)-K+ pump current in guinea-pig ventricular myocytes by a cAMP-dependent PKA pathway. *J.Physiol*; 477 (Pt 3): 373-380.
67. Gentzsch M, Chang XB, Cui L, Wu Y, Ozols VV, Choudhury A, Pagano RE, Riordan JR (2004). Endocytic trafficking routes of wild type and DeltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol.Biol.Cell*; 15: 2684-2696.
68. Gill SS, Pulido OM, Mueller RW, McGuire PF (1998). Molecular and immunochemical characterization of the ionotropic glutamate receptors in the rat heart. *Brain Res.Bull.*; 46: 429-434.
69. Gonzalez-Robayna IJ, Falender AE, Ochsner S, Firestone GL, Richards JS (2000). Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-Induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol.Endocrinol.*; 14: 1283-1300.
70. Grahammer F, Henke G, Sandu C, Rexhepaj R, Hussain A, Friedrich B, Risler T, Metzger M, Just L, Skutella T, Wulff P, Kuhl D, Lang F (2006). Intestinal function of gene-targeted mice lacking serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol*; 290: G1114-G1123.
71. Greger IH, Khatri L, Kong X, Ziff EB (2003). AMPA receptor tetramerization is mediated by Q/R editing. *Neuron*; 40: 763-774.
72. Gregor P, Mano I, Maoz I, McKeown M, Teichberg VI (1989). Molecular structure of the chick cerebellar kainate-binding subunit of a putative glutamate receptor. *Nature*; 342: 689-692.

73. Gumz ML, Popp MP, Wingo CS, Cain BD (2003). Early transcriptional effects of aldosterone in a mouse inner medullary collecting duct cell line. *Am.J.Physiol Renal Physiol*; 285: F664-F673.
74. Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*; 233: 177-182.
75. Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R (1994). Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys.J.*; 66: 1061-1067.
76. Henke G, Maier G, Wallisch S, Boehmer C, Lang F (2004). Regulation of the voltage gated K⁺ channel Kv1.3 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1. *J.Cell Physiol*; 199: 194-199.
77. Henley JM (1994). Kainate-binding proteins: phylogeny, structures and possible functions. *Trends Pharmacol.Sci.*; 15: 182-190.
78. Herlitze S, Raditsch M, Ruppersberg JP, Jahn W, Monyer H, Schoepfer R, Witzemann V (1993). Argitoxin detects molecular differences in AMPA receptor channels. *Neuron*; 10: 1131-1140.
79. Hoekstra D, Tyteca D, van Ijzendoorn SC (2004). The subapical compartment: a traffic center in membrane polarity development. *J.Cell Sci.*; 117: 2183-2192.
80. Hollister RD, Page KJ, Hyman BT (1997). Distribution of the messenger RNA for the extracellularly regulated kinases 1, 2 and 3 in rat brain: effects of excitotoxic hippocampal lesions. *Neuroscience*; 79: 1111-1119.
81. Hollmann M, Hartley M, Heinemann S (1991). Ca²⁺ permeability of KA-AMPA--gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science*; 252: 851-853.
82. Hollmann M, Heinemann S (1994). Cloned Glutamate Receptors. *Annual Review of Neuroscience*; 17: 31-108.
83. Hollmann M, Maron C, Heinemann S (1994). N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron*; 13: 1331-1343.
84. Hollmann M, O'Shea-Greenfield A, Rogers SW, Heinemann S (1989). Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature*; 342: 643-648.
85. Huber SM, Friedrich B, Klingel K, Lenka N, Hescheler J, Lang F (2001). Protein and mRNA expression of serum and glucocorticoid-dependent kinase 1 in metanephrogenesis. *Dev.Dyn.*; 221: 464-469.

86. Hume RI, Dingledine R, Heinemann SF (1991). Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science*; 253: 1028-1031.
87. Iino M, Koike M, Isa T, Ozawa S (1996). Voltage-dependent blockage of Ca(2+)-permeable AMPA receptors by joro spider toxin in cultured rat hippocampal neurones. *J.Physiol*; 496 (Pt 2): 431-437.
88. Imaizumi K, Tsuda M, Wanaka A, Tohyama M, Takagi T (1994). Differential expression of sgk mRNA, a member of the Ser/Thr protein kinase gene family, in rat brain after CNS injury. *Brain Res.Mol.Brain Res.*; 26: 189-196.
89. Inagaki N, Kuromi H, Gono T, Okamoto Y, Ishida H, Seino Y, Kaneko T, Iwanaga T, Seino S (1995). Expression and role of ionotropic glutamate receptors in pancreatic islet cells. *The FASEB Journal*; 9: 686-691.
90. Isa T, Iino M, Ozawa S (1996). Spermine blocks synaptic transmission mediated by Ca(2+)-permeable AMPA receptors. *Neuroreport*; 7: 689-692.
91. Ishimaru H, Kamboj R, Ambrosini A, Henley JM, Soloviev MM, Sudan H, Rossier J, Abutidze K, Rampersad V, Usherwood PN, Bateson AN, Barnard EA (1996). A unitary non-NMDA receptor short subunit from *Xenopus*: DNA cloning and expression. *Receptors.Channels*; 4: 31-49.
92. Itani OA, Liu KZ, Cornish KL, Campbell JR, Thomas CP (2002). Glucocorticoids stimulate human sgk1 gene expression by activation of a GRE in its 5'-flanking region. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*; 283: E971-E979.
93. Jin R, Banke TG, Mayer ML, Traynelis SF, Gouaux E (2003). Structural basis for partial agonist action at ionotropic glutamate receptors. *Nat.Neurosci.*; 6: 803-810.
94. Johnston GA, Curtis DR, Davies J, McCulloch RM (1974). Spinal interneurone excitation by conformationally restricted analogues of L-glutamic acid. *Nature*; 248: 804-805.
95. Kamboj SK, Swanson GT, Cull-Candy SG (1995). Intracellular spermine confers rectification on rat calcium-permeable AMPA and kainate receptors. *J.Physiol*; 486 (Pt 2): 297-303.
96. Kamynina E, Staub O (2002). Concerted action of ENaC, Nedd4-2, and Sgk1 in transepithelial Na(+) transport. *Am.J.Physiol Renal Physiol*; 283: F377-F387.

97. Kaufer D, Ogle WO, Pincus ZS, Clark KL, Nicholas AC, Dinkel KM, Dumas TC, Ferguson D, Lee AL, Winters MA, Sapolsky RM (2004). Restructuring the neuronal stress response with anti-glucocorticoid gene delivery. *Nat.Neurosci.*; 7: 947-953.
98. Kawahara Y, Ito K, Sun H, Ito M, Kanazawa I, Kwak S (2004). GluR4c, an alternative splicing isoform of GluR4, is abundantly expressed in the adult human brain. *Brain Res.Mol.Brain Res.*; 127: 150-155.
99. Kellner M, Peiter A, Hafner M, Feuring M, Christ M, Wehling M, Falkenstein E, Losel R (2003). Early aldosterone up-regulated genes: new pathways for renal disease? *Kidney Int.*; 64: 1199-1207.
100. King AE, Chung RS, Vickers JC, Dickson TC (2006). Localization of glutamate receptors in developing cortical neurons in culture and relationship to susceptibility to excitotoxicity. *J.Comp Neurol.*; 498: 277-294.
101. Kobayashi T, Cohen P (1999). Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem.J.*; 339 (Pt 2): 319-328.
102. 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 Pt 1: 189-197.
103. Kumar JM, Brooks DP, Olson BA, Laping NJ (1999). Sgk, a putative serine/threonine kinase, is differentially expressed in the kidney of diabetic mice and humans. *J.Am.Soc.Nephrol.*; 10: 2488-2494.
104. Kuner T, Wollmuth LP, Karlin A, Seeburg PH, Sakmann B (1996). Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron*; 17: 343-352.
105. Kuner T, Beck C, Sakmann B, Seeburg PH (2001). Channel-Lining Residues of the AMPA Receptor M2 Segment: Structural Environment of the Q/R Site and Identification of the Selectivity Filter. *Journal of Neuroscience*; 21: 4162-4172.
106. Kuusinen A, Abele R, Madden DR, Keinänen K (1999). Oligomerization and ligand-binding properties of the ectodomain of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunit GluRD. *Journal of Biological Chemistry*; 274: 28937-28943.
107. Kuusinen A, Arvola M, Keinänen K (1995). Molecular dissection of the agonist binding site of an AMPA receptor. *EMBO J.*; 14: 6327-6332.

108. Kwak S, Kawahara Y (2005). Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *J.Mol.Med.*; 83: 110-120.
109. Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227: 680-685.
110. Lang F, Cohen P (2001). Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci.STKE.*; 2001: RE17-
111. 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.
112. Lang F, Klingel K, Wagner CA, Stegen C, Warntges S, Friedrich B, Lanzendorfer M, Melzig J, Moschen I, Steuer S, Waldegger S, Sauter M, Paulmichl M, Gerke V, Risler T, Gamba G, Capasso G, Kandolf R, Hebert SC, Massry SG, Broer S (2000). Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 97: 8157-8162.
113. Lang UE, Wolfer DP, Grahammer F, Strutz-Seebohm N, Seebohm G, Lipp HP, McCormick JA, Hellweg R, Dawson K, Wang J, Pearce D, Lang F (2006). Reduced locomotion in the serum and glucocorticoid inducible kinase 3 knock out mouse. *Behav.Brain Res.*; 167: 75-86.
114. Laube B, Kuhse J, Betz H (1998). Evidence for a Tetrameric Structure of Recombinant NMDA Receptors. *Journal of Neuroscience*; 18: 2954-2961.
115. Le Menuet D, Isnard R, Bichara M, Viengchareun S, Muffat-Joly M, Walker F, Zennaro MC, Lombes M (2001). Alteration of cardiac and renal functions in transgenic mice overexpressing human mineralocorticoid receptor. *J.Biol.Chem.*; 276: 38911-38920.
116. Lee E, Lein ES, Firestone GL (2001). Tissue-specific expression of the transcriptionally regulated serum and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) during mouse embryogenesis. *Mech.Dev.*; 103: 177-181.
117. Lee HK, Takamiya K, Han JS, Man H, Kim CH, Rumbaugh G, Yu S, Ding L, He C, Petralia RS, Wenthold RJ, Gallagher M, Huganir RL (2003). Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell*; 112: 631-643.

118. Leong ML, Maiyar AC, Kim B, O'Keeffe BA, Firestone GL (2003). Expression of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells. *J.Biol.Chem.*; 278: 5871-5882.
119. Letts VA, Felix R, Biddlecome GH, Arikath J, Mahaffey CL, Valenzuela A, Bartlett FS, Mori Y, Campbell KP, Frankel WN (1998). The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel gamma subunit. *Nat.Genet.*; 19: 340-347.
120. Leuschner WD, Hoch W (1999). Subtype-specific assembly of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits is mediated by their n-terminal domains. *Journal of Biological Chemistry*; 274: 16907-16916.
121. Lipton P (1999). Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiological Reviews*; 79: 1431-1568.
122. Lise MF, Wong TP, Trinh A, Hines RM, Liu L, Kang R, Hines DJ, Lu J, Goldenring JR, Wang YT, El Husseini A (2006). Involvement of myosin Vb in glutamate receptor trafficking. *J.Biol.Chem.*; 281: 3669-3678.
123. Loffing J, Zecevic M, Feraille E, Kaissling B, Asher C, Rossier BC, Firestone GL, Pearce D, Verrey F (2001). Aldosterone induces rapid apical translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK. *Am.J.Physiol Renal Physiol*; 280: F675-F682.
124. Lomeli H, Sprengel R, Laurie DJ, Kohr G, Herb A, Seeburg PH, Wisden W (1993). The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. *FEBS Lett.*; 315: 318-322.
125. Mack V, Burnashev N, Kaiser KM, Rozov A, Jensen V, Hvalby O, Seeburg PH, Sakmann B, Sprengel R (2001). Conditional restoration of hippocampal synaptic potentiation in Glur-A-deficient mice. *Science*; 292: 2501-2504.
126. Madden DR (2002). The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat.Rev.Neurosci.*; 3: 91-101.
127. Maiyar AC, Leong ML, Firestone GL (2003). Importin-alpha mediates the regulated nuclear targeting of serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by recognition of a nuclear localization signal in the kinase central domain. *Mol.Biol.Cell*; 14: 1221-1239.
128. Mano I, Teichberg VI (1998). A tetrameric subunit stoichiometry for a glutamate receptor-channel complex. *Neuroreport*; 9: 327-331.

129. Mansour M, Nagarajan N, Nehring RB, Clements JD, Rosenmund C (2001). Heteromeric AMPA receptors assemble with a preferred subunit stoichiometry and spatial arrangement. *Neuron*; 32: 841-853.
130. Marks DL, Pagano RE (2002). Endocytosis and sorting of glycosphingolipids in sphingolipid storage disease. *Trends Cell Biol.*; 12: 605-613.
131. Martin LJ, Blackstone CD, Levey AI, Huganir RL, Price DL (1993). AMPA glutamate receptor subunits are differentially distributed in rat brain. *Neuroscience*; 53: 327-358.
132. Maxfield FR, McGraw TE (2004). Endocytic recycling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*; 5: 121-132.
133. Mayer ML, Westbrook GL (1987). The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog.Neurobiol.*; 28: 197-276.
134. McCormick JA, Feng Y, Dawson K, Behne MJ, Yu B, Wang J, Wyatt AW, Henke G, Grahammer F, Mauro TM, Lang F, Pearce D (2004). Targeted disruption of the protein kinase SGK3/CISK impairs postnatal hair follicle development. *Mol.Biol.Cell*; 15: 4278-4288.
135. Meador-Woodruff JH, Hogg AJ, Jr., Smith RE (2001). Striatal ionotropic glutamate receptor expression in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Brain Res.Bull.*; 55: 631-640.
136. Meldrum B, Garthwaite J (1990). Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol.Sci.*; 11: 379-387.
137. Meng F, Yamagiwa Y, Taffetani S, Han J, Patel T (2005). IL-6 activates serum and glucocorticoid kinase via p38alpha mitogen-activated protein kinase pathway. *Am.J.Physiol Cell Physiol*; 289: C971-C981.
138. Miinea CP, Sano H, Kane S, Sano E, Fukuda M, Peranen J, Lane WS, Lienhard GE (2005). AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. *Biochem.J.*; 391: 87-93.
139. Mikosz CA, Brickley DR, Sharkey MS, Moran TW, Conzen SD (2001). Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, *sgk-1*. *J.Biol.Chem.*; 276: 16649-16654.
140. Molnar E, Baude A, Richmond SA, Patel PB, Somogyi P, McIlhinney RA (1993). Biochemical and immunocytochemical characterization of antipeptide antibodies to a cloned GluR1 glutamate receptor subunit: cellular and subcellular distribution in the rat forebrain. *Neuroscience*; 53: 307-326.

141. Molnar E, McIlhinney RAJ, Baude A, Nusser Z, Somogyi P (1994). Membrane Topology of the GluR1 Glutamate Receptor Subunit: Epitope Mapping by Site-Directed Antipeptide Antibodies. *Journal of Neurochemistry*; 63: 683-693.
142. Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW (1989). The Excitatory Amino Acid Receptors: Their Classes, Pharmacology, and Distinct Properties in the Function of the Central Nervous System. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*; 29: 365-402.
143. Monyer H, Seeburg PH, Wisden W (1991). Glutamate-operated channels: developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. *Neuron*; 6: 799-810.
144. Mora A, Komander D, van Aalten DM, Alessi DR (2004). PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin.Cell Dev.Biol.*; 15: 161-170.
145. Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*; 354: 31-37.
146. Nakanishi N, Shneider NA, Axel R (1990). A family of glutamate receptor genes: evidence for the formation of heteromultimeric receptors with distinct channel properties. *Neuron*; 5: 569-581.
147. Naray-Fejes-Toth A, Canessa C, Cleaveland ES, Aldrich G, Fejes-Toth G (1999). *sgk* is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial Na^+ channels. *J.Biol.Chem.*; 274: 16973-16978.
148. Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G, Volk KA, Stokes JB (2000). SGK is a primary glucocorticoid-induced gene in the human. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*; 75: 51-56.
149. Nilsen T, Slagsvold T, Skjerpén CS, Brech A, Stenmark H, Olsnes S (2004). Peroxisomal targeting as a tool for assaying protein-protein interactions in the living cell: cytokine-independent survival kinase (CISK) binds PDK-1 in vivo in a phosphorylation-dependent manner. *J.Biol.Chem.*; 279: 4794-4801.
150. Ong WY, He Y, Tan KK, Garey LJ (1998). Differential localisation of the metabotropic glutamate receptor mGluR1a and the ionotropic glutamate receptor GluR2/3 in neurons of the human cerebral cortex. *Exp.Brain Res.*; 119: 367-374.
151. Palmada M, Dieter M, Boehmer C, Waldegger S, Lang F (2004). Serum and glucocorticoid inducible kinases functionally regulate CIC-2 channels. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*; 321: 1001-1006.

152. Palmada M, Dieter M, Speil A, Bohmer C, Mack AF, Wagner HJ, Klingel K, Kandolf R, Murer H, Biber J, Closs EI, Lang F (2004). Regulation of intestinal phosphate cotransporter NaPi IIb by ubiquitin ligase Nedd4-2 and by serum- and glucocorticoid-dependent kinase 1. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol*; 287: G143-G150.
153. Palmada M, Embark HM, Yun C, Bohmer C, Lang F (2003). Molecular requirements for the regulation of the renal outer medullary K(+) channel ROMK1 by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*; 311: 629-634.
154. Panchenko VA, Glasser CR, Mayer ML (2001). Structural Similarities between Glutamate Receptor Channels and K+ Channels Examined by Scanning Mutagenesis. *The Journal of General Physiology*; 117: 345-360.
155. Park J, Leong ML, Buse P, Maiyar AC, Firestone GL, Hemmings BA (1999). Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J.*; 18: 3024-3033.
156. Partin KM, Patneau DK, Winters CA, Mayer ML, Buonanno A (1993). Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. *Neuron*; 11: 1069-1082.
157. Passafaro M, Piech V, Sheng M (2001). Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat.Neurosci.*; 4: 917-926.
158. Pearce D (2003). SGK1 regulation of epithelial sodium transport. *Cell Physiol Biochem.*; 13: 13-20.
159. Petralia RS, Wenthold RJ (1992). Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J.Comp Neurol.*; 318: 329-354.
160. Priel A, Kollek A, Ayalon G, Gillor M, Osten P, Stern-Bach Y (2005). Stargazin reduces desensitization and slows deactivation of the AMPA-type glutamate receptors. *J.Neurosci.*; 25: 2682-2686.
161. Reisel D, Bannerman DM, Schmitt WB, Deacon RM, Flint J, Borchardt T, Seeburg PH, Rawlins JN (2002). Spatial memory dissociations in mice lacking GluR1. *Nat.Neurosci.*; 5: 868-873.
162. Richards JS (2001). New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol.Endocrinol.*; 15: 209-218.

163. Richards JS, Fitzpatrick SL, Clemens JW, Morris JK, Alliston T, Sirois J (1995). Ovarian cell differentiation: a cascade of multiple hormones, cellular signals, and regulated genes. *Recent Prog.Horm.Res.*; 50: 223-254.
164. Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF (1998). The Tetrameric Structure of a Glutamate Receptor Channel. *Science*; 280: 1596-1599.
165. Rozansky DJ, Wang J, Doan N, Purdy T, Faulk T, Bhargava A, Dawson K, Pearce D (2002). Hypotonic induction of SGK1 and Na⁺ transport in A6 cells. *Am.J.Physiol Renal Physiol*; 283: F105-F113.
166. Saad S, Stevens VA, Wassef L, Poronnik P, Kelly DJ, Gilbert RE, Pollock CA (2005). High glucose transactivates the EGF receptor and up-regulates serum glucocorticoid kinase in the proximal tubule. *Kidney Int.*; 68: 985-997.
167. Safferling M, Tichelaar W, Kummerle G, Jouppila A, Kuusinen A, Keinanen K, Madden DR (2001). First Images of a Glutamate Receptor Ion Channel: Oligomeric State and Molecular Dimensions of GluRB Homomers. *Biochemistry*; 40: 13948-13953.
168. Salvador LM, Park Y, Cottom J, Maizels ET, Jones JC, Schillace RV, Carr DW, Cheung P, Allis CD, Jameson JL, Hunzicker-Dunn M (2001). Follicle-stimulating hormone stimulates protein kinase A-mediated histone H3 phosphorylation and acetylation leading to select gene activation in ovarian granulosa cells. *J.Biol.Chem.*; 276: 40146-40155.
169. Schnell E, Sizemore M, Karimzadegan S, Chen L, Brecht DS, Nicoll RA (2002). Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 99: 13902-13907.
170. Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Birkin R, Dell G, Bucci C, Spinoso MR, Baltaev R, Mack AF, Korniyuchuk G, Choudhury A, Marks D, Pagano RE, Attali B, Pfeufer A, Kass RS, Sanguinetti MC, Tavaré JM, Lang F (2007). Regulation of Endocytic Recycling of KCNQ1/KCNE1 Potassium Channels. *Circ.Res.*
171. Sheng M, Kim MJ (2002). Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science*; 298: 776-780.
172. Sheppard KE, Autelitano DJ (2002). 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 transforms 11-dehydrocorticosterone into transcriptionally active glucocorticoid in neonatal rat heart. *Endocrinology*; 143: 198-204.

173. Shigaev A, Asher C, Latter H, Garty H, Reuveny E (2000). Regulation of *sgk* by aldosterone and its effects on the epithelial Na(+) channel. *Am.J.Physiol Renal Physiol*; 278: F613-F619.
174. Smith LD, Xu WL, Varnold RL (1991). Oogenesis and oocyte isolation. *Methods Cell Biol.*; 36: 45-60.
175. Snutch TP (1988). The use of *Xenopus* oocytes to probe synaptic communication. *Trends Neurosci.*; 11: 250-256.
176. Soderling TR, Derkach VA (2000). Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci.*; 23: 75-80.
177. Sommer B, Keinänen K, Verdoorn TA, Wisden W, Burnashev N, Herb A, Kohler M, Takagi T, Sakmann B, Seeburg PH (1990). Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science*; 249: 1580-1585.
178. Sommer B, Kohler M, Sprengel R, Seeburg PH (1991). RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell*; 67: 11-19.
179. Soreq H (1985). The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA-microinjected *Xenopus* oocytes. *CRC Crit Rev.Biochem.*; 18: 199-238.
180. Staub O, Gautschi I, Ishikawa T, Breitschopf K, Ciechanover A, Schild L, Rotin D (1997). Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination. *EMBO J.*; 16: 6325-6336.
181. Stern-Bach Y, Bettler B, Hartley M, Sheppard PO, O'Hara PJ, Heinemann SF (1994). Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron*; 13: 1345-1357.
182. Stern-Bach Y, Russo S, Neuman M, Rosenmund C (1998). A point mutation in the glutamate binding site blocks desensitization of AMPA receptors. *Neuron*; 21: 907-918.
183. Stevens CF (1993). Quantal release of neurotransmitter and long-term potentiation. *Cell*; 72 Suppl: 55-63.
184. 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.
185. Strutz-Seeböhm N, Seeböhm 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 (2005). Regulation of GluR1 abundance in murine hippocampal neurones by serum- and glucocorticoid-inducible kinase 3. *J.Physiol*; 565: 381-390.
186. 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 (2005). Glucocorticoid adrenal steroids and glucocorticoid-inducible kinase isoforms in the regulation of GluR6 expression. *J.Physiol*; 565: 391-401.
187. Sun Y, Olson R, Horning M, Armstrong N, Mayer M, Gouaux E (2002). Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature*; 417: 245-253.
188. Tomita S, Adesnik H, Sekiguchi M, Zhang W, Wada K, Howe JR, Nicoll RA, Brecht DS (2005). Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains. *Nature*; 435: 1052-1058.
189. Tomita S, Fukata M, Nicoll RA, Brecht DS (2004). Dynamic interaction of stargazin-like TARPs with cycling AMPA receptors at synapses. *Science*; 303: 1508-1511.
190. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 76: 4350-4354.
191. Ullrich O, Horiuchi H, Bucci C, Zerial M (1994). Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature*; 368: 157-160.
192. Verdoorn TA, Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1991). Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science*; 252: 1715-1718.
193. Vereninov AA, Vasil'eva IO, Iurinskaia VE, Matveev VV, Glushankova LN (2001). [Study of "group" expression of mRNA of the ion transporters ATP1B1, NHE1 and NKCC1, beta-actin, glycerophosphosphate dehydrogenase, proteins regulating proliferation and apoptosis of p53, Bcl-2, IL-2 and hSGK kinase at the prereplicative stage of human lymphocyte activation]. *Tsitologija*; 43: 613-618.
194. Vereninov AA, Vassilieva IO, Yurinskaya VE, Matveev VV, Glushankova LN, Lang F, Matskevitch JA (2001). Differential transcription of ion transporters, NHE1, ATP1B1, NKCC1 in human peripheral blood lymphocytes activated to proliferation. *Cell Physiol Biochem.*; 11: 19-26.

195. Verrey F, Loffing J, Zecevic M, Heitzmann D, Staub O (2003). SGK1: aldosterone-induced relay of Na⁺ transport regulation in distal kidney nephron cells. *Cell Physiol Biochem.*; 13: 21-28.
196. Virbasius JV, Song X, Pomerleau DP, Zhan Y, Zhou GW, Czech MP (2001). Activation of the Akt-related cytokine-independent survival kinase requires interaction of its phox domain with endosomal phosphatidylinositol 3-phosphate. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 98: 12908-12913.
197. Wada K, Dechesne CJ, Shimasaki S, King RG, Kusano K, Buonanno A, Hampson DR, Banner C, Wenthold RJ, Nakatani Y (1989). Sequence and expression of a frog brain complementary DNA encoding a kainate-binding protein. *Nature*; 342: 684-689.
198. Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Broer S (2000). The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem.*; 10: 1-12.
199. Wagner CA, Ott M, Klingel K, Beck S, Melzig J, Friedrich B, Wild KN, Broer S, Moschen I, Albers A, Waldegger S, Tummler 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.
200. Waldegger S, Barth P, Forrest JN, Jr., Greger R, Lang F (1998). Cloning of sgk serine-threonine protein kinase from shark rectal gland - a gene induced by hypertonicity and secretagogues. *Pflugers Arch.*; 436: 575-580.
201. 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.
202. Waldegger S, Erdel M, Nagl UO, Barth P, Raber G, Steuer S, Utermann G, Paulmichl M, Lang F (1998). Genomic organization and chromosomal localization of the human SGK protein kinase gene. *Genomics*; 51: 299-302.
203. Waldegger S, Gabrysch S, Barth P, Fillon S, Lang F (2000). h-sgk serine-threonine protein kinase as transcriptional target of p38/MAP kinase pathway in HepG2 human hepatoma cells. *Cell Physiol Biochem.*; 10: 203-208.
204. Waldegger S, Klingel K, Barth P, Sauter M, Rfer ML, Kandolf R, Lang F (1999). h-sgk serine-threonine protein kinase gene as

- transcriptional target of transforming growth factor beta in human intestine. *Gastroenterology*; 116: 1081-1088.
205. Wang J, Barbry P, Maiyar AC, Rozansky DJ, Bhargava A, Leong M, Firestone GL, Pearce D (2001). SGK integrates insulin and mineralocorticoid regulation of epithelial sodium transport. *Am.J.Physiol Renal Physiol*; 280: F303-F313.
206. Washburn MS, Dingledine R (1996). Block of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by polyamines and polyamine toxins. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*; 278: 669-678.
207. Watkins JC, Evans RH (1981). Excitatory Amino Acid Transmitters. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*; 21: 165-204.
208. Weaver CD, Yao TL, Powers AC, Verdoorn TA (1996). Differential Expression of Glutamate Receptor Subtypes in Rat Pancreatic Islets. *Journal of Biological Chemistry*; 271: 12977-12984.
209. Webster MK, Goya L, Firestone GL (1993). Immediate-early transcriptional regulation and rapid mRNA turnover of a putative serine/threonine protein kinase. *J.Biol.Chem.*; 268: 11482-11485.
210. 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.
211. Wenthold RJ, Petralia RS, Blahos J, II, Niedzielski AS (1996). Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *Journal of Neuroscience*; 16: 1982-1989.
212. Wo ZG, Oswald RE (1994). Transmembrane Topology of Two Kainate Receptor Subunits Revealed by N- Glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 91: 7154-7158.
213. Wo ZG, Oswald RE (1995). A topological analysis of goldfish kainate receptors predicts three transmembrane segments. *Journal of Biological Chemistry*; 270: 2000-2009.
214. Wo ZG, Oswald RE (1995). Unraveling the modular design of glutamate-gated ion channels. *Trends Neurosci.*; 18: 161-168.
215. Wollmuth LP, Kuner T, Seeburg PH, Sakmann B (1996). Differential contribution of the NR1- and NR2A-subunits to the selectivity filter of recombinant NMDA receptor channels. *J.Physiol*; 491 (Pt 3): 779-797.
216. Wood MW, VanDongen HMA, VanDongen AMJ (1995). Structural Conservation of Ion Conduction Pathways in K Channels and

Glutamate Receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences; 92: 4882-4886.

217. Wulff P, Vallon V, Huang DY, Volkl H, Yu F, Richter K, Jansen M, Schlunz M, Klingel K, Loffing J, Kauselmann G, Bosl MR, Lang F, Kuhl D (2002). Impaired renal Na(+) retention in the sgk1-knockout mouse. *J.Clin.Invest*; 110: 1263-1268.
218. Xing Y, Liu D, Zhang R, Joachimiak A, Songyang Z, Xu W (2004). Structural basis of membrane targeting by the Phox homology domain of cytokine-independent survival kinase (CISK-PX). *J.Biol.Chem.*; 279: 30662-30669.
219. Yamazaki M, Araki K, Shibata A, Mishina M (1992). Molecular cloning of a cDNA encoding a novel member of the mouse glutamate receptor channel family. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*; 183: 886-892.
220. Yun HY, Gonzalez-Zulueta M, Dawson VL, Dawson TM (1998). Nitric oxide mediates N-methyl-D-aspartate receptor-induced activation of p21ras. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 95: 5773-5778.
221. Zamanillo D, Sprengel R, Hvalby O, Jensen V, Burnashev N, Rozov A, Kaiser KM, Koster HJ, Borchardt T, Worley P, Lubke J, Frotscher M, Kelly PH, Sommer B, Andersen P, Seeburg PH, Sakmann B (1999). Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science*; 284: 1805-1811.
222. Zuo Z, Urban G, Scammell JG, Dean NM, McLean TK, Aragon I, Honkanen RE (1999). Ser/Thr protein phosphatase type 5 (PP5) is a negative regulator of glucocorticoid receptor-mediated growth arrest. *Biochemistry*; 38: 8849-8857.

7. Anhang

7.1 Danksagung

Zuallererst möchte ich natürlich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Florian Lang für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Unterstützung dieser Arbeit danken. Durch seine Begleitung und seine Begeisterung für die Physiologie konnte diese Arbeit erst entstehen.

Mein ganz besonderer Dank gilt dem gesamten Team des Labors. Danke für die vielen netten Stunden, die tolle Stimmung, die langen Gespräche, sowohl über fachliche als auch private Themen, die die Arbeit im Labor erst zu dem gemacht haben, was sie war. Ich konnte mir immer der Unterstützung und der Hilfsbereitschaft im Team gewiss sein.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. phil. nat. G. Seebohm bedanken, der mich in die Grundlagen der Elektrophysiologie und die Laborarbeit eingeführt hat. Er hat mir geduldig jede meiner Fragen beantwortet und immer die nötige Hilfestellung gegeben. Außerdem war er immer ein geduldiger Zuhörer, egal für welches Problem.

Ein herzliches Dankeschön auch an PD Dr. rer. nat. Nathalie Strutz-Seebohm für die vielen molekularbiologischen Arbeiten und ihre hilfsbereite Art, mit der sie mich immer unterstützt hat.

Besonders möchte ich mich auch bei Dr. Ravshan Baltaev bedanken, der mir die Arbeit im Labor sehr viel einfacher gemacht hat und immer bereit war mir zu helfen.

Auch möchte ich mich bei Dr. Ganna Korniychuk bedanken, die mir in der Mikrobiologie und bei der Herstellung der RNA eine große Hilfe war.

Herzlichen Dank auch an Dr. Andreas Mack aus dem anatomischen Institut in Tübingen für die Herstellung der Immunhistochemischen Daten. Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und Freunden bedanken, die sowohl Misserfolge als auch Erfolgserlebnisse mit mir geteilt haben und mir immer die Hilfestellung und Zuwendung

Anhang

zukommen ließen, die für die Entstehung dieser Arbeit wichtig für mich waren.

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

20.07.1979 geboren in Ludwigsburg
Eltern: Werner Striegel,
Rose Striegel (geb. Brosi)

Familienstand ledig

Schulbildung

1986-1990 August-Lämmle Grundschule in Ludwigsburg

1990-1999 Mörike Gymnasium Ludwigsburg

Juni 1999 Abitur

Berufsorientierung

November 1999 - Vorsemesterkurs Medizin
März 2000 Institut für Biologie und Medizin Köln

April 2000 - Tätigkeit als Pflegehilfskraft
September 2000 im Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart

Hochschulstudium

WS 00/01 - Studium der Humanmedizin an der Eberhard-
Karls-
WS 06/07 Universität zu Tübingen

September 2002 Physikum
September 2003 1. Staatsexamen

Anhang

September 2005

2. Staatsexamen

28. November 2006

3. Staatsexamen

**Oktober 2003 bis
Anleitung**

Arbeit am Physiologischen Institut I unter

April 2009

von Prof. Florian Lang

Promotion mit vorliegender Arbeit

Berufliche Tätigkeit

**Seit Mai 2007
für**

Assistenzärztin in Weiterbildung zur Fachärztin

**Anästhesie und Intensivmedizin
im Klinikum Schwäbisch Gmünd unter Leitung
CA Dr.med. Trompisch**